



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Sebastião Vieira de Moraes

**Ação do Cuminaldeído em modelo experimental de osteoartrite em
ratos**

Rio de Janeiro
2024

Sebastião Vieira de Moraes

Ação do Cuminaldeído em modelo experimental de osteoartrite em ratos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Ricardo de Souza Domingues

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

Rio de Janeiro

2024

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/ REDE SIRIUS/ CB/A

M828 Morais, Sebastião Vieira de
Ação do Cuminaldeído em modelo experimental de osteoartrite em
ratos / Sebastião Vieira de Morais. – 2024.
65 f.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Ricardo de Souza Domingues
Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Ciências Médicas.

1. Osteoartrite do Joelho – Tratamento farmacológico – Teses.
2. Medicamento fitoterápico. 3. Anti-Inflamatórios não esteroides –
Farmacocinética. 4. Analgésicos – Farmacocinética – Teses.
I. Domingues, Gerson Ricardo de Souza. II. Cartágenes, Maria do
Socorro de Sousa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.72-002

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Sebastião Vieira de Moraes

Ação do Cuminaldeído em modelo experimental de osteoartrite em ratos

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de março de 2024.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes
Universidade Federal do Maranhão

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gerson Ricardo de Souza Domingues (Orientador)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof^a. Dra. Maria Helena Faria Ornellas de Souza
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof^a. Dra. Sueli Coelho da Silva Carneiro
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ

Prof. Dr. Orlando Jorge Marins Torres
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Gutemberg Fernandes de Araújo
Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro

2024

DEDICATÓRIA

A Deus, por tudo que tem feito em minha vida, pelas recompensas que tenho recebido em dobro.

Aos meus pais, Mariano de Moraes e Maria Lígia Vieira de Sousa Moraes (*in memoriam*), pelo amor e dedicação permitindo que eu realizasse este sonho.

A minha amada esposa Regina de Fátima Cruz de Moraes, pela compreensão, incentivo, exemplo e pelo seu amor e apoio nas horas de maior dificuldade.

Aos meus filhos Angélica Cruz de Moraes e Pedro Lucas Cruz de Moraes, fontes de inspiração e ensinamentos de vida. A cada dia tento ensinar e aprender, ao mesmo tempo, com eles.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGS) e em especial aos professores Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes e Dr. João Batista Santos Garcia que com experiência, carinho, entusiasmo e paciência conduziram a orientação desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Gerson Ricardo de Souza Domingues por todo apoio e dedicação, serenidade inconfundível e pelo enorme comprometimento que teve desde o início deste trabalho.

A Prof^a. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes pela coorientação e oportunidade de participarmos dessa linha de pesquisa, onde podemos compartilhar novas conquistas na luta contra a pior sensação que acomete o ser humano que é a dor.

A toda a equipe do trabalho experimental, em especial aos colegas Alberto Jorge Oliveira Lopes, Breno Facundes Bonfim, Paloma Larissa Arruda Lopes, Priscilla Gouveia Mendonça e Kevin Waquim Pessoa Carvalho, cuja participação foi a essência dessa pesquisa.

“Um homem não envelhece até que seus arrependimentos tomem o lugar dos seus sonhos”.

John Barrymore.

RESUMO

MORAIS, Sebastião Vieira de. **Ação do Cuminaldeído em modelo experimental de osteoartrite em ratos**. 2024. 65 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Osteoartrite (OA) é uma doença crônica degenerativa de grande impacto mundial, caracterizada pela falência articular generalizada, sendo associada com o aumento da idade. Portanto, encontrar novas formas de tratamento dessa doença é de fundamental importância. O cuminaldeído é um componente biologicamente ativo dos óleos essenciais de *Cuminum cyminum*, *Carum alcaravia*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum verum*, sendo que estudos farmacológicos apontam a utilização dessa substância em modelo experimental de diabetes, câncer, inibição da lipoxigenase e inflamação. A partir desses estudos hipotetizamos que o cuminaldeído possui potencial analgésico e anti-inflamatório. O estudo objetivou avaliar os efeitos do cuminaldeído em modelo experimental de osteoartrite em joelhos de ratos com monoiodoacetato de sódio (MIA). Foram utilizados 24 ratos *Wistar* que tiveram OA induzida e tratados via oral com cuminaldeído (5 mg/kg), soro fisiológico (0,1mL/kg), indometacina via (2,5 mg/kg) e grupo SHAM (sem indução de OA e sem intervenção). O cuminaldeído mostrou-se eficiente ao reduzir a dor dos animais com OA nos testes de deambulação forçada, alodínea táctil, incapacidade funcional da distribuição de peso nas patas e na dor espontânea avaliada através das mudanças nas expressões faciais dos ratos *pele Mouse Grimace Scale* - MSG sendo superior à indometacina em todos os testes avaliados. A análise radiográfica e os dados histológicos não demonstraram alterações significativas entre o grupo controle e os grupos que receberam tratamento. O cuminaldeído também modulou a produção de citocinas pró-inflamatórias. O ensaio *in vitro* de inibição da ciclo-oxigenase evidenciou uma relativa preferência por inibição à enzima COX-2. O estudo de docagem molecular indicou que o cuminaldeído possui parâmetros de afinidade energética satisfatórios com receptores opióides, embora inferiores a fármacos tradicionalmente utilizados para esse fim. Os dados de predição de atividade sugerem que esta molécula possui atividade anestésica em nível central e é substrato de enzimas do complexo CYP, assim como outros anestésicos conhecidos. O tratamento da OA com cuminaldeído na dosagem (50 mg/kg) não alterou os parâmetros hematológicos. O cuminaldeído modula a resposta imune do processo inflamatório e pode ser considerado um composto promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos.

Palavras-chave: dor; osteoartrite; cuminaldeído; modelos experimentais.

ABSTRACT

MORAIS, Sebastião Vieira de. *Cuminaldehyde action in an experimental model of osteoarthritis in rats*. 2024. 65 f. Doctoral Thesis in Medical Sciences - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative disease of great impact worldwide, characterized by generalized joint failure, and is associated with increasing age. Therefore, finding new ways to treat this disease is of fundamental importance. Cuminaldehyde is a biologically active component of the essential oils of *Cuminum cyminum*, *Carum alcaravia*, *Cinnamomum cassia*, and *Cinnamomum verum*. Pharmacological studies indicate the use of this substance in experimental models of diabetes, cancer, lipoxygenase inhibition, and inflammation. From these studies we hypothesized that cuminaldehyde has analgesic and anti-inflammatory potential. The study aimed to evaluate the effects of cuminaldehyde in an experimental osteoarthritis model in rat knees with sodium monoiodoacetate (MIA). We used 24 Wistar rats that had induced OA and treated orally with couminaldehyde (5 mg/kg), saline (0.1mL/kg), indomethacin via (2.5 mg/kg) and SHAM group (no induction of OA and no intervention). Cuminaldehyde proved to be efficient in reducing the pain of OA animals in the tests of forced walking, tactile allodynia, functional disability of weight distribution on the legs, and in spontaneous pain evaluated through changes in facial expressions of the rats by the Mouse Grimace Scale - MGS, being superior to indomethacin in all tests evaluated. Radiographic analysis and histological data showed no significant changes between the control group and the groups that received treatment. The *in vitro* cyclooxygenase inhibition assay showed a relative preference for inhibition of the COX-2 enzyme. The molecular docking study indicated that cuminaldehyde has satisfactory energy affinity parameters with opioid receptors, although lower than drugs traditionally used for this purpose. Activity prediction data suggest that this molecule possesses anesthetic activity at the central level and is a substrate of CYP complex enzymes, as are other known anesthetics. Thus, it is concluded that cuminaldehyde has relevant analgesic and anti-inflammatory activity in the treatment of experimental osteoarthritis in rat knees.

Keywords: pain; osteoarthritis; cuminaldehyde; experimental models.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho esquemático mostrando alterações na patogênese da OA.....	17
Figura 2 -	Esquema das vias da dor nociceptiva.....	19
Figura 3 -	Planta <i>Cuminum Cyminum</i> (A), sementes (B), e estrutura molecular (C).....	21
Figura 4 -	Fluxograma ilustrativo do protocolo experimental do tratamento da osteoartrite com cuminaldeído.....	24
Figura 5 -	Punção intra-articular do joelho através do tendão patelar.....	25
Figura 6 -	Animais em deambulação forçada no <i>rotarod</i>	26
Figura 7 -	Animais no aparelho <i>Von Frey</i> , demonstrando a estimulação do membro pélvico entre as malhas da rede. (A e B).....	27
Figura 8 -	Animais no aparelho <i>weight bearing</i> , demonstrando a distribuição do peso em plataformas (A e B).....	28
Figura 9 -	Avaliação subjetiva das mudanças dos olhos pela MGS em ratos.....	29
Figura 10 -	Avaliação subjetiva das mudanças da protuberância do nariz pela MGS em ratos.....	29
Figura 11 -	Avaliação subjetiva das mudanças nas orelhas pela MGS em ratos.....	30
Figura 12 -	Avaliação subjetiva das mudanças nos bigodes pela MGS em ratos.....	30
Figura 13 -	Radiografias em AP mostrando congruência.....	31
Figura 14 -	Radiografias mostrando lesão unicompartimental somente lateral (A, B, C e D).....	31
Figura 15 -	Radiografias em AP mostrando distrofia osteopenia, perda óssea e incongruência.....	32
Figura 16 -	Radiografia mostrando destruição completa da articulação do joelho.....	32
Figura 17 -	Ressecção da membrana sinovial indicado pela seta.....	33
Figura 18 -	Comparação entre joelhos, grupo controle aspecto normal e com osteoartrite.....	33
Figura 19 -	Fotomicrografia da membrana sinovial do joelho de ratos <i>wistar</i> GC28 e GOA28 com processo inflamatório.....	35
Figura 20 -	Resumo dos sistemas de avaliação histopatológica da cartilagem de acordo com a Osteoarthritis Research Society International (OARSI) em diferentes grupos de animais.....	44
Figura 21 -	Conformação espacial dos ORs kappa, mu e delta (IDs PDB 6B73, 6DDF e 6PT3, respectivamente) interagindo com o cuminaldeído.....	47

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1 - Efeitos do cuminaldeído na atividade motora/deambulação forçada de ratos com OA induzida, avaliados pelo escore do teste do <i>Rotarod</i>	39
Gráfico 2 - Efeito cuminaldeído sobre alodínea tátil em ratos com osteoartrite induzida (OA), mensurada por avaliação indireta com o teste de <i>Von Frey</i>	40
Gráfico 3 - Efeitos do cuminaldeído na extensão da incapacidade em ratos com osteoartrite induzida (OA), avaliados pelo teste de distribuição de peso.....	41
Gráfico 4 - Efeito do cuminaldeído na avaliação da dor espontânea pelo escore da Escala de Grimace em ratos.....	41
Gráfico 5 - Grau de envolvimento articular em ratos tratados com cuminaldeído, seguindo a Escala de Alhback.....	42
Gráfico 6 - Resultados das avaliações histopatológicas da cartilagem, classificadas pelo sistema de pontuação da Osteoarthritis Research Society International (OARSI).....	43
Gráfico 7 - Concentração das citocinas IL-6 (A), INF- γ (B) e IL-10 (C) avaliadas por ELISA no soro dos animais utilizados nos experimentos.....	45
Gráfico 8 - Inibição percentual in vitro das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2).....	46
Tabela 1 - Energias de ligação livre obtidas por docking molecular do cuminaldeído e/ou drogas nos ORs de tipo kappa, mu e delta.....	47
Tabela 2 - PASS.....	49
Tabela 3 - Resultado dos parâmetros hematológicos, série eritrocitária e leucocitária por grupos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórias Não Esteroidais
GC	Grupo Cuminaldeído
GCN	Grupo Controle Negativo
GCS	Grupo Sham
GI	Grupo Indometacina
IASP	<i>International Association for Study of Pain</i>
LNRP	Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata
LNRPA	Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata Afetada
LNRPC	Limiar Nociceptivo de Retirada da Pata Contralateral
MIA	Monoiodoacetato de Sódio
MGS	<i>Mouse Grimace Scale</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
OA	Osteoartrite
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão Arterial
HAS	Pressão Arterial Sistêmica
PPA	Peso da Pata Afetada
PPC	Peso da Pata Contralateral

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1 Epidemiologia	15
1.2 Patogênese	16
1.3 Tratamento da osteoartrite	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Cuminaldeído	23
3.2 Animais	23
3.3 Procedimento ético	23
3.4 Caracterização do tipo de estudo, seleção da amostra e delineamento experimental	24
3.5 Modelo experimental de osteoartrite	25
3.6 Análise comportamental	25
3.6.1 <u>Deambulação forçada - Teste de Rotarod</u>	26
3.6.2 <u>Alodínea Táctil - Teste de Von Frey</u>	26
3.6.3 <u>Incapacidade funcional - Teste de Weight Bearing</u>	27
3.6.4 <u>Mouse Grimace Scale (MGS)</u>	28
3.6.5 <u>Avaliação radiográfica</u>	31
3.6.6 <u>Coleta da membrana sinovial e análise histopatológica</u>	33
3.6.7 <u>Avaliações de citocinas</u>	35
3.6.8 <u>Atividade enzimática da ciclooxigenase 1 (COX 1) e ciclooxigenase 2 (COX 2)</u>	35
3.7 Estudo in Silico	36
3.7.1 <u>Predição in silico de atividade</u>	36
3.7.2 <u>Estruturas dos compostos</u>	36
3.7.3 <u>Estruturas dos alvos</u>	36
3.7.4 <u>Docagem molecular</u>	37
3.7.5 <u>Análise toxicológica</u>	37

3.7.6	<u>Análise Estatística</u>	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Avaliação da atividade motora/deambulação forçada – <i>Rotarod</i> teste	39
4.2	Avaliação da alodínea táctil - <i>Von Frey</i>	40
4.3	Teste de incapacitação/distribuição de peso nas patas traseiras (teste de apoio de peso)	40
4.4	Análises radiográficas	42
4.5	Análise histopatológica	43
4.6	Análise de citocina	45
4.7	Inibição da ciclo-oxigenase 1 e 2	45
4.8	Acoplamento molecular	46
4.9	Análise Bioquímica	50
5	DISCUSSÃO	51
	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO – Certificado Comitê de Ética	65

INTRODUÇÃO

A dor, um dos maiores dilemas da medicina, é relatado como o sintoma mais comum das doenças. Apesar dos vários medicamentos analgésicos disponíveis que são usados regularmente no tratamento da dor, há uma grande preocupação em relação ao controle inadequado da dor¹. As reações adversas dos medicamentos analgésicos são os principais desafios que podem restringir sua aplicação clínica².

Investimentos recente em pesquisa clínica nas últimas décadas forneceu dados importantes sobre os fatores de risco associados ao desenvolvimento da progressão das doenças. Novas descobertas em relação à fisiopatologia da OA têm permitido uma melhor compreensão do processo da doença e identificado potenciais drogas terapêuticas. Os avanços recentes em compreender a origem e mecanismo da dor na OA ponto de vista clínico e estrutural ajudará no desenvolvimento de terapia com risco benefício mais direcionado que também poderá melhorar a qualidade de vida dos pacientes³.

A osteoartrite é definida pelo Colégio Americano de Reumatologia como um conjunto de alterações heterogêneas que induzem sinais e sintomas articulares dolorosos associados a defeitos na integridade da cartilagem articular e membrana sinovial em associação às alterações relacionadas ao tecido ósseo situado na margem articular⁴.

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. Ocorre mais frequentemente em mulheres, sendo diagnosticada basicamente com avaliação clínica e radiográfica, sendo a dor a queixa mais frequente durante a consulta médica^{5,6}. O padrão álgico varia entre os pacientes, de intermitente a constante, podendo ter caráter nociceptivo ou neuropático⁷.

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. Em modelos experimentais com animais podem-se traçar paralelos com as alterações químicas e histológicas observadas na doença, podem-se realizar manipulações experimentais para testar novos medicamentos ou procedimentos, com controle maior das variáveis envolvidas, como exclusão do placebo, homogeneidade do grupo entre outros⁸.

A osteoartrite induzida por iodoacetato monossódico intra-articular no joelho de ratos é um bom modelo a ser utilizado em pesquisas relacionadas, pois fornece mudanças mensuráveis nos movimentos articulares, alodínia tátil, degeneração radiológica progressiva e inflamação microscópica da membrana sinovial, que representam marcadores para avaliação de osteoartrite⁹.

Não existe cura para a osteoartrite. A doença resulta em um impacto direto na economia em decorrência dos elevados gastos públicos com hospitais e medicamentos¹⁰. 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 invalidez¹¹.

Não há consenso a respeito do tratamento ideal da osteoartrite. Várias alternativas terapêuticas têm sido utilizadas visando à melhoria da dor e do padrão funcional dos pacientes. Dentre esses métodos destaca-se os farmacológicos (que estão relacionados a diversos efeitos colaterais), os agentes físicos, os de terapia alternativa (homeopatia, acupuntura e medicamentos fitoterápicos) e os cirúrgicos^{12,13,14}.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Epidemiologia

A osteoartrite é a doença articular mais comum em todo o mundo, afetando cerca de 10% dos homens e 18% de mulheres com mais de 60 anos. A dor e a perda de a função constitui o principal sintoma podendo ser debilitante e progressivo; em países desenvolvidos, o prejuízo socioeconômico resultante é grande, custando entre 1 · 0% e 2 · 5% do produto interno bruto¹⁵.

A OA é considerada a principal causa de dor e incapacidade em idosos, sendo uma das principais causas de redução da expectativa de vida devido à incapacidade^{16,17,18}. Além disso, a OA gera gastos onerosos para o sistema de saúde, atribuídos principalmente ao uso de medicamentos para o controle do quadro algico e a realização da artroplastia do quadril e do joelho¹⁸.

A (OA) é a uma doença de caráter progressiva na maioria dos casos irreversível podendo levar a incapacidade funcional dos indivíduos, afetando a qualidade de vida, além de produzir altos custos para os serviços de saúde, relacionados, principalmente, ao controle do quadro algico e a realização de artroplastias^{19,20,21} no que tange os cuidados hospitalares; perda da produtividade por afastamento do trabalho e elevado índice de cirurgias de artroplastia de joelho são comuns¹⁰.

A OA é uma das doenças que mais causam dor musculoesquelética frequente e persistente, podendo atingir um a cada cinco indivíduos, principalmente idosos, causando dor crônica e incapacidade articular, principalmente nos joelhos²². No Brasil, os estudos epidemiológicos são escassos e não mostram a amplitude do impacto da OA na sociedade, além disso, as estimativas de ocorrência de OA variam com a definição usada para categorizar a doença e, também características da população do estudo incluindo a idade²³. Dados da previdência mostram que as doenças reumáticas representam 18,5% dos casos totais de auxílio-doença. desses a OA representa 8,2 sendo que OA de joelho e mais correspondendo quase metade dos casos²⁴. E a Organização Mundial de Saúde estima que no mundo haja 9,6% dos homens e 18% das mulheres acima de 60 anos com OA²⁵.

Nos Estados Unidos²⁶ estimam que 43 milhões de pessoas são afetadas, onde 36% dos indivíduos com mais de 60 anos possuem OAJ²⁷, apresentando um custo anual de aproximadamente 60 bilhões de dólares². Estima-se que a OA sintomática do joelho afeta

aproximadamente 12% da população idosa (≥ 60 anos), a OA sintomática de mão (6,8% ≥ 26 anos) e quadril (9,2%, ≥ 45 anos)^{21,29}.

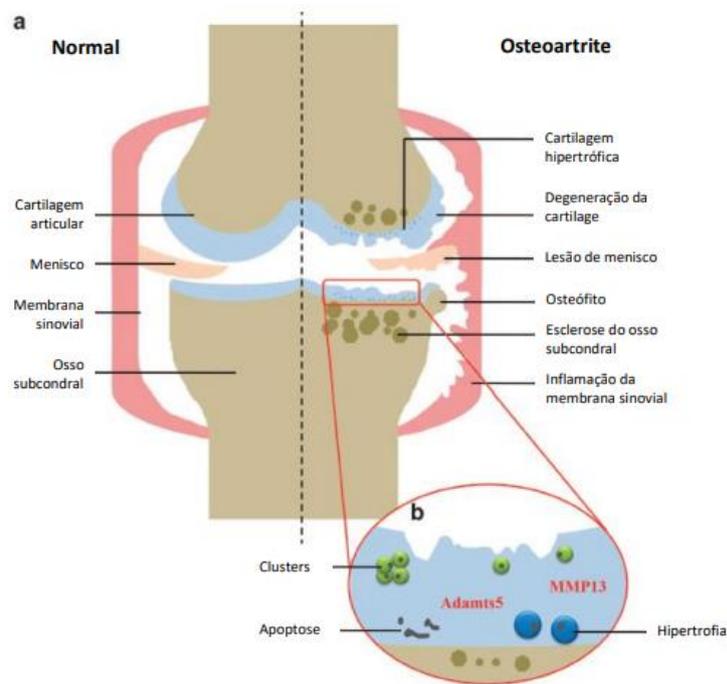
1.2 Patogênese

A cartilagem articular é composta principalmente de água, colágeno, proteoglicans e condrócitos (as únicas células residentes). Ele também contém outros colágenos menores (tipo VI, IX e XI) e várias proteínas não colágenas e glicoproteínas. Os condrócitos são responsáveis por manter uma renovação da cartilagem equilibrada e responder às mudanças induzidas pela carga articular, citocinas, fatores de crescimento e a pressão presença de moléculas de matriz fragmentadas na ECM da cartilagem. Durante a embriogênese, os condrócitos são responsáveis pelo crescimento ósseo longitudinal dentro da placa de crescimento epifisária³⁰. Os condrócitos diferenciam-se dos formadores de colônias fibroblasto e células-tronco mesenquimais posteriores e inicialmente expressam colágeno tipo I antes da diferenciação em condrócitos fetais³¹.

Os condrócitos são células totalmente diferenciadas, responsáveis pela função da cartilagem articular hialina adulta, mantendo o equilíbrio preciso entre as funções anabólica e catabólica da cartilagem. Esse equilíbrio requer estabilidade fenotípica que é perdida na osteoartrite (OA), uma doença que afeta e envolve todos os tecidos articulares e, principalmente, impacta a integridade estrutural da cartilagem articular. Na OA, os condrócitos articulares respondem ao acúmulo de insultos prejudiciais bioquímicos e biomecânicos, mudando para um estado de hipertrofia e degradação, envolvendo produção de uma matriz extracelular anormal e aumento das atividades de agreganas e colagenase. Durante o crescimento hipertrofia é um estágio de desenvolvimento transitório necessário nos condrócitos na placa fisária que culmina na formação óssea; entretanto, na AO, a hipertrofia dos condrócitos é catastrófica pois ela inicia e perpetua uma cascata de eventos que, em última análise, resulta em dano permanente à cartilagem. Estudos mostram que metilação do DNA e alterações na sinalização de NF- κ B em OA, leva a perda de estabilidade fenotípica e a diferenciação hipertrófica dos condrócitos como fatores contribuintes centrais para a patogênese da OA³².

A progressão da OA (Figura 1-b). Respostas celulares na cartilagem com OA.

Figura 1 - Desenho esquemático mostrando alterações na patogênese da OA.



Fonte: Adaptação³³.

A OA é uma doença multifatorial⁷. Uma complexa interação de fatores genéticos, metabólicos, bioquímicos e biomecânicos, seguida pela ativação da resposta inflamatória resulta em degeneração crônica do tecido cartilaginoso, além de alterações no osso subcondral e sinóvia³⁴.

Trata-se de uma doença inflamatória, com elevação de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 β (IL1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que diminuem a síntese de colágeno e promovem o aumento de mediadores catabólicos, como metaloproteinases, que degradam componentes da matriz extracelular e do osso subcondral^{4,35}.

O aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α é determinado pela secreção por condrócitos e sinoviócitos semelhantes a macrófagos (MLS). Estas citocinas afetam também os condrócitos e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS), aumentando a produção de citocinas e enzimas proteolíticas, e inibindo a síntese de componentes da matriz extracelular, sendo que a IL-1 inibiria a síntese de agreganos e suprimiria a síntese dos colágenos II e IX, que são constituintes mais importantes da cartilagem, e aumentaria a produção dos colágenos I e III, resultando numa reparação tecidual deficiente^{4,36}.

À nível histológico, 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 funcional³⁷.

Caracteriza-se por ser uma afecção dolorosa das articulações, multifatorial e crônica^{38,39} com destruição da cartilagem e do osso subcondral, redução do espaço articular, sinovite e formação de osteófitos que leva a incapacidade funcional progressiva⁴⁰ principalmente nas articulações dos membros inferiores (joelhos)⁴¹. Vários processos celulares e moleculares estão envolvidos nessas alterações patológicas. Quando o mecanismo fisiológico normal que mantém o equilíbrio da matriz extracelular falha, os componentes da matriz extracelular são perdidos, os condrócitos expandidos se aglomeram nas regiões depletadas, um estado oxidativo é induzido no ambiente celular estressado e, por fim, ocorre a apoptose de condrócitos^{42,43}.

A doença apresenta características multifatoriais, incluindo fatores genéticos, metabólicos e traumáticos, levando a alterações anatômicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas, que resultam em lesão da cartilagem articular, remodelação e esclerose do osso subcondral, com formação de osteófitos marginais. Pode afetar qualquer articulação sinovial, contudo, acomete principalmente joelhos, quadris, mãos e coluna, e pode ocorrer em mais de uma articulação ao mesmo tempo^{34,44}.

O processo degenerativo da doença não afeta apenas a cartilagem articular, mas também envolve toda a articulação e todos os seus componentes, ligamentos, cápsula, membrana sinovial e músculos peri-articulares. A ativação das células sinoviais inflamadas produz o excesso de líquido sinovial, levando ao edema capsular. Este inchaço, através de um reflexo espinhal, inibe a ativação completa de músculos que ligam a articulação (inibição artrogênica) e isso, combinado com a falta de uso, leva à fraqueza muscular e atrofia⁴⁵.

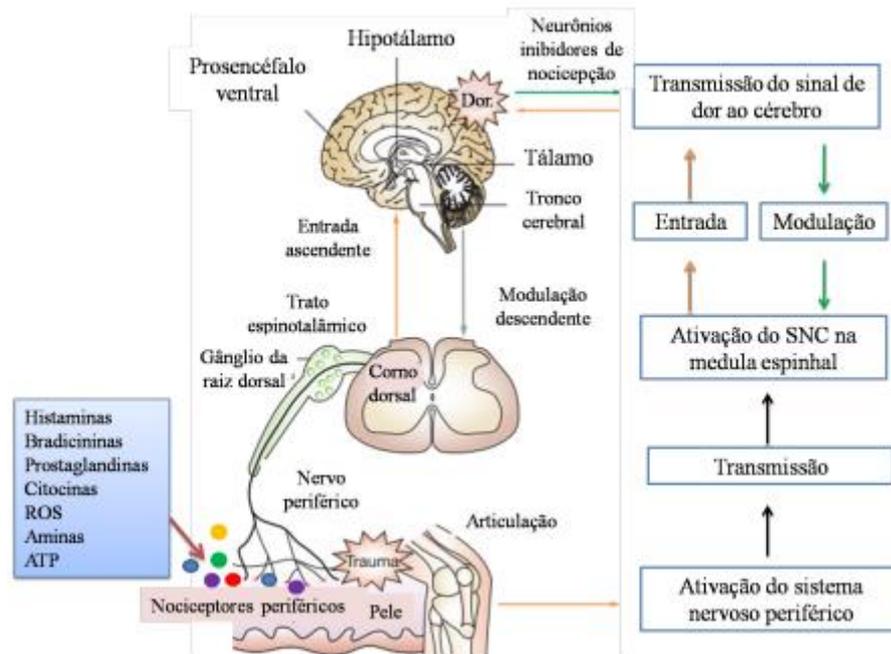
Embora vários fatores de risco estejam associados à OA, a etiologia exata da doença permanece em grande parte desconhecida. Contudo, a compreensão da etiologia da doença parece ser determinante para caracterizar a sequência das alterações patológicas na OA. Em indivíduo obeso, por exemplo, a alteração inicial pode ser a formação óssea aumentada, seguida pela destruição articular e sinovite. No caso de lesões traumáticas, tem-se a inflamação articular aguda seguida por sinovite e destruição da cartilagem e por último, alterações ósseas^{46,47,48}.

Ocorre mais frequentemente em mulheres, sendo diagnosticada basicamente com avaliação clínica e radiográfica, sendo a dor a queixa mais frequente durante a consulta médica^{5,6}. O padrão algíco varia entre os pacientes, de intermitente a constante, podendo ter caráter nociceptivo ou neuropático⁷.

Após a fase aguda e cronificação da doença existe a sensibilização dos estímulos nocivos que são transmitidos pelos nociceptores periféricos em atividade eletroquímica – pela

despolarização dos terminais periféricos de neurônios sensoriais primários de alto limiar, com os potenciais de ação (APs) resultantes conduzidos ao sistema nervoso central (SNC) pelos axônios sensitivos aferentes primários. Ao chegar no neurônio pré-ganglionar e feito a sinapse com os neurônios de projeção secundária no corno dorsal da medula espinhal que transmitem informações para o tronco cerebral e o tálamo, córtex, hipotálamo e sistema límbico. A partir destes iniciam-se as vias descendentes, que possuem um papel importante na modulação da dor. Elas são projetadas a uma região mesocefálica denominada de substância cinzenta, e destas para diferentes núcleos bulbares, e destes ao corno dorsal da medula. Estimulações farmacológicas ou elétricas desses núcleos podem inibir a transmissão sináptica, provocando o bloqueio da dor (Figura 2)^{49,50,51}.

Figura 2 - Esquema das vias da dor nociceptiva.



Fonte: adaptação⁵².

1.3 Tratamento da osteoartrite

Os tratamentos disponíveis para OA são baseados principalmente na utilização de analgésicos, inibidores da enzima ciclo-oxigenase - 2 (COX-2) e drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES), contudo ainda é muito insuficiente, uma vez que não conseguem reverter o avanço da doença e apresentam efeitos colaterais importantes, além da dor ser refratária aos

tratamentos atuais^{53,54}. O uso prolongado de AINES, apesar de promover alívio momentâneo, eleva o risco de disfunção renal, complicações gastrointestinais e doenças cardiovasculares^{28,55}. Um problema que deve ser considerado no caso das comorbidades é a interação medicamentosa. O uso crônico de medicações para o controle álgico por pacientes com OA podem interferir no controle da PA, especialmente em pacientes hipertensos. Estudos recentes, mostraram que a incidência da HAS foi significativamente maior nos pacientes com OA de joelho. Indicando que os pacientes com OA de joelho tem maior risco de desenvolver a HAS⁵⁶. Um estudo de meta-análise mostrou relação significativa entre a HAS e a OA de joelho (radiográfica e sintomática)⁵⁷.

Dada a alta prevalência de dor e complicações no seu tratamento, há uma necessidade perceptível de desenvolver novos medicamentos analgésicos, melhorando sua eficácia e segurança. Na medicina tradicional, vários remédios à base de ervas têm sido usados em a fim de controlar a dor por décadas. Estudos recentes têm focado em ervas medicinais como uma das fontes mais importantes de descoberta de drogas devido aos seus efeitos benéficos no tratamento da dor⁵⁸.

Desde os primórdios da humanidade, as plantas fitoterápicas têm sido utilizadas como importante recurso terapêutico, visto que possuem uma grande variedade de metabólitos que apresentam atividades biológicas e farmacológicas relevantes, com grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios⁵⁹.

As especiarias não só são usadas como condimentos alimentares, também é utilizado na área da indústria de perfumaria, cosmética e na produção de artigos de higiene pessoal. Além disso, reconhece-se que várias especiarias possuem propriedades medicinais sendo usadas desde há muito tempo na medicina tradicional com diferentes benefícios para a saúde, os quais foram reconhecidos nas últimas décadas através de estudos de investigação que permitiram documentar atividades tais como ação como analgésicos, anti-inflamatório, estimulante digestiva, efeito hipolipidêmico, atividade antidiabética, atividade antimicrobiana, antioxidante, antimutagênico e anticarcinogênico, entre outras.

No laboratório da universidade federal do maranhão várias plantas têm sido testadas no tratamento da OA entre elas a *Arrabidaea chica* Humb. e Bonpl. Verlot⁶⁰, *Chenopodium ambrosioides*⁶¹ e *Scoparia dulcis*⁶⁰.

Cuminum cyminum é uma espécie vegetal utilizada como especiaria e é vulgarmente conhecida como cominho. Rica em óleos essenciais, a planta já foi amplamente utilizada como aperitivo, anti-helmintico, carminativo, diurético, estomáquico, emenagogo, eupéptico, espasmolítico, sedante, analgésico e anti-inflamatório. É uma espécie rica em minerais, tais

como fósforo, potássio e magnésio. Também é rico em vitamina A, C e K⁶². Sua composição química se dá basicamente por terpenos e flavanóides. Porém, o principal componente químico encontrado na espécie vegetal é o cuminaldeído. O cuminaldeído também pode ser encontrado nos óleos essenciais de *Carum alcaravia*, *Cinnamomum cassia* e *Cinnamomum verum*⁶³.

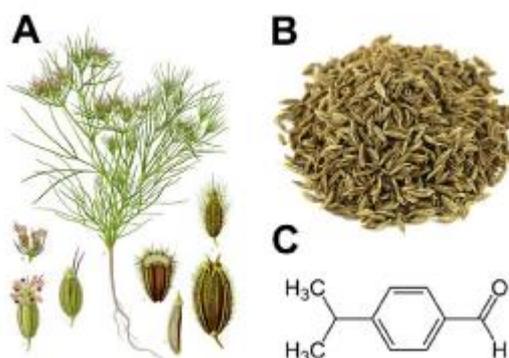
Também denominado de 4-isopropilbenzaldeído, o cuminaldeído é um benzaldeído com um grupo isopropilo substituído na posição 4. Estudos recentes indicam que essa substância inibe a fibrilação da alfa-sinucleína que em condições patológicas formam fibrilas insolúveis caracterizadas por corpos de Lewy, como na doença de Parkinson e outras doenças degenerativas do sistema nervoso⁶⁴. Além disso, o cuminaldeído também já foi utilizado para o tratamento de melanomas⁶⁵.

Estudos mostraram que a administração de cuminaldeído melhorou as alterações na morfologia hepática e no peso do fígado em ratos, diminuiu níveis de enzimas hepáticas e inibiu a lipogênese. Dessa forma, sugere-se que o cuminaldeído é um composto aromático potencial no tratamento da doença hepática gordurosa não alcoólica⁶⁶. Esses dados corroboram com estudos realizados, onde concluiu-se que o cuminaldeído possuía um potente efeito de antiobesidade em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica⁶⁷.

Resultados de estudos demonstraram que cuminaldeído apresenta efeitos antinociceptivos e antineuropáticos ao longo da estimulação de receptores opióides, L-arginove guanilil ciclase / via cGMP e supressão de citocinas inflamatórias⁶⁸.

Abaixo, uma imagem ilustrativa da planta, sementes e estrutura molecular (Figura 3).

Figura 3 - Planta *Cuminum Cyminum* (A), sementes (B), e estrutura molecular (C).



Fonte: Adaptação⁶⁸

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito do cuminaldeído em modelo experimental de osteoartrite em ratos.

2.2 Específicos

- a) Avaliar o efeito do cuminaldeído sobre o grau de incapacitação articular, através de parâmetros clínicos;
- b) Verificar o efeito do cuminaldeído sobre as alterações radiológicas articulares;
- c) Averiguar histologicamente o efeito do cuminaldeído sobre a lesão da cartilagem articular;
- d) Avaliar e quantificar o efeito do cuminaldeído na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.
- e) Verificar o efeito in vitro do cuminaldeído sobre a inibição da ciclo-oxigenase 1e 2;
- f) Avaliar os parâmetros da interação molecular do cuminaldeído com receptores opióides através de *docking* molecular.
- g) Analisar parâmetros bioquímicos e hematológicos em todos os grupos do experimento;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cuminaldeído

O reagente utilizado no presente estudo foi obtido comercialmente (135178 Sigma-Aldrich), com 98% de pureza, armazenado em temperatura ambiente até o momento de sua utilização. Foi utilizado dose de 50mg/kg por gavagem.

3.2 Animais

Neste estudo foram utilizados 24 ratos machos da linhagem Wistar, espécie *Rattus norvegicus* (variedade albinus) adultos com aproximadamente 30 dias, com variação de peso entre 280g a 330g fornecidos pelo Biotério Central da UFMA. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Prédio Pesquisa e Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e Saúde (CCBS/UFMA), sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de ar 40 a 60%, com ração comercial da marca Labina® e água *ad libitum*.

3.3 Procedimento ético

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal do Maranhão (CEUA/UFMA) sob o número 23115.031386/2019-28. Para realização dos procedimentos experimentais foram obedecidas às normas éticas da *International Association for Study of Pain* (IASP), que regulam experimentos realizados em animais (COMMITTEE FOR RESEARCH AND ETHICAL ISSUES OF THE IASP, 1983).

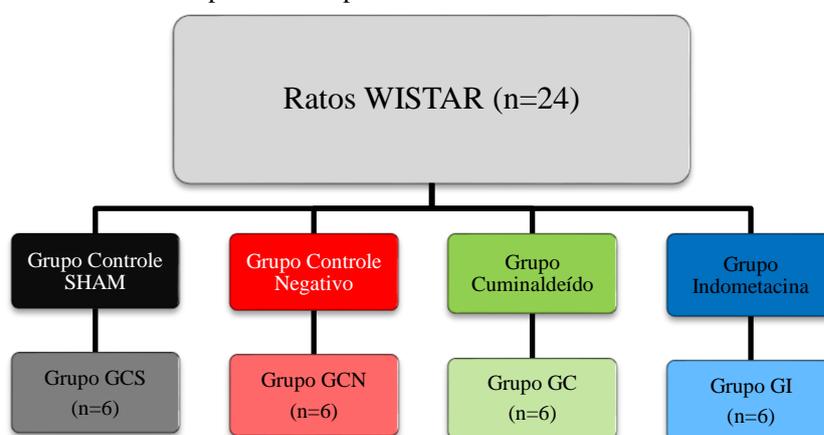
3.4 Caracterização do tipo de estudo, seleção da amostra e delineamento experimental

Este estudo foi caracterizado como ensaio pré-clínico experimental, com distribuição aleatória dos grupos de animais. Como controle positivo no estudo para testar o cuminaldeído se utilizou o anti-inflamatório indometacina administrado oralmente. Esse anti-inflamatório é um medicamento com mecanismo de ação que abrange a inibição da síntese de todas as PGs, por bloqueio reversível da via mediada pelas cicloxigenases.

Os 24 animais foram divididos em quatro grupos experimentais, cada um com seis animais.

1. GRUPO SHAM (GCS n=06): animais sadios não tratados e não submetidos à indução para OA;
2. GRUPO CONTROLE NEGATIVO (GCN n=06): animais induzidos no dia zero (D0) (2mg de MIA no joelho direito) e tratados por via oral do primeiro dia (D1) ao vigésimo dia (D28) de forma terapêutica com 1mL/Kg/dia com cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%;
3. GRUPO CUMINALDEÍDO (GC n=06): animais induzidos no D0 (2mg de MIA no joelho direito) e tratados por via oral do D3 ao D28 de forma terapêutica com 5 mg/Kg/dia de cuminaldeído;
4. GRUPO INDOMETACINA (GI n=06): animais induzidos no D0 (2mg de MIA no joelho direito) e tratados por via oral do D3 ao D28 de forma terapêutica com 2.5mg/Kg/dia de indometacina.

Figura 4 - Fluxograma ilustrativo do protocolo experimental do tratamento da osteoartrite com cuminaldeído.



Fonte: Elaboração própria

Foram feitos testes de aclimação durante sete dias e testes basais em todos os grupos. A eutanásia foi feita um dia depois de terminar os testes clínicos e comportamentais através da administração, por via intraperitoneal de sobredosagem de cetamina 300mg/kg + xilazina 30mg/kg, após confirmação da perda de consciência e morte. A dose adotada para a indometacina foi de 2,5mg/kg.

3.5 Modelo experimental de osteoartrite

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 2,5% - (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina 1,75% - (10 mg/kg). A lesão articular foi induzida por uma única injeção intra-articular de 2mg de monoiodoacetato de sódio (MIA) diluídos em um volume máximo de 25 μ L de solução. Para o procedimento o rato foi posicionado com a perna flexionada na altura do joelho em um ângulo de 90°, sendo a solução de MIA injetada através do ligamento patelar, no espaço intra-articular entre a tíbia e o fêmur^{69,70}.

Figura 5 - Punção intra-articular do joelho através do tendão patelar.



Fonte: Próprio autor

3.6 Análise comportamental

3.6.1 Deambulação forçada - Teste de Rotarod

Os animais foram colocados no rotarod (modelo 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 varia 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 afetada⁷¹.

Figura 6 - Animais em deambulação forçada no *rotarod*.



Fonte: Próprio autor

3.6.2 Alodínea Táctil - Teste de Von Frey

A alodínea táctil foi realizada com um analgesímetro digital (modelo Insight, São Paulo, Brasil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata dos animais foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao aparelho^{71,72}.

Para adaptação ao ambiente, os animais foram colocados em caixas de acrílico medindo 12 x 20 x 17cm, cujo assoalho consiste em uma rede de malha de 5mm², constituída de arame não maleável de 1mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento. Espelhos foram

posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais.

O experimentador aplicou, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da região plantar de pata do rato até o animal produzir uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, nas patas ipsilateral e contralateral, até o animal apresentar três medidas similares de resposta “*flinch*” após a retirada da pata^{71,72}. O limiar nociceptivo de retirada da pata (LNRP) foi definido como o percentual de força para provocar uma suspensão ativa na pata ipsilateral afetada e foi determinado da seguinte maneira:

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

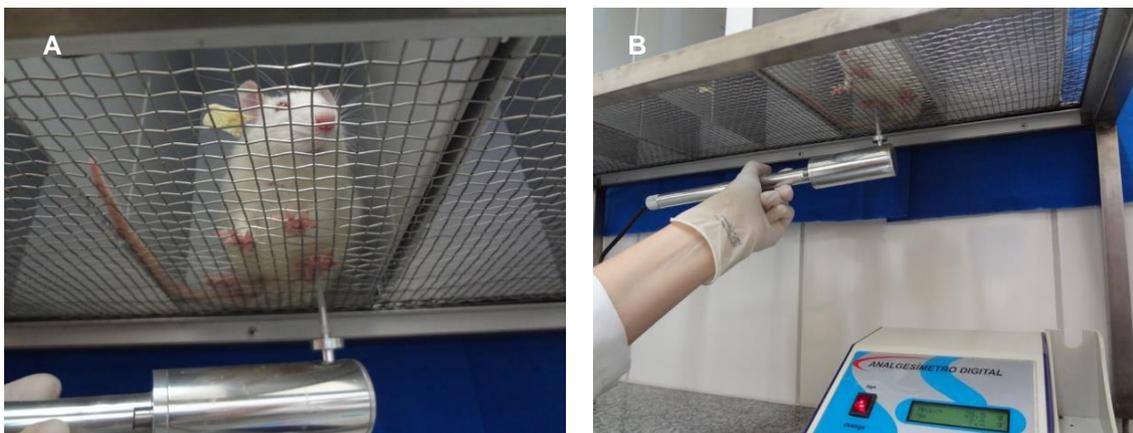
Onde:

LNRP é o limiar nociceptivo de retirada da pata;

LNRPA é limiar nociceptivo de retirada da pata afetada;

LNRPC limiar nociceptivo de retirada da pata contralateral.

Figura 7 – Animais no aparelho *Von Frey*, demonstrando a estimulação do membro pélvico entre as malhas da rede. (A e B).



Fonte: Próprio autor

3.6.3 Incapacidade funcional - Teste de Weight Bearing

Os animais são colocados em uma câmara de vidro angulada e posicionados, de modo que cada pata traseira repousasse sobre plataformas diferentes. O peso exercido sobre cada pata traseira (mensurado em gramas) foi avaliado em um período de cinco segundos. A aferição final da distribuição do peso foi dada por uma média de três aferições. As alterações na distribuição do peso nas patas traseiras foram calculadas da seguinte maneira:

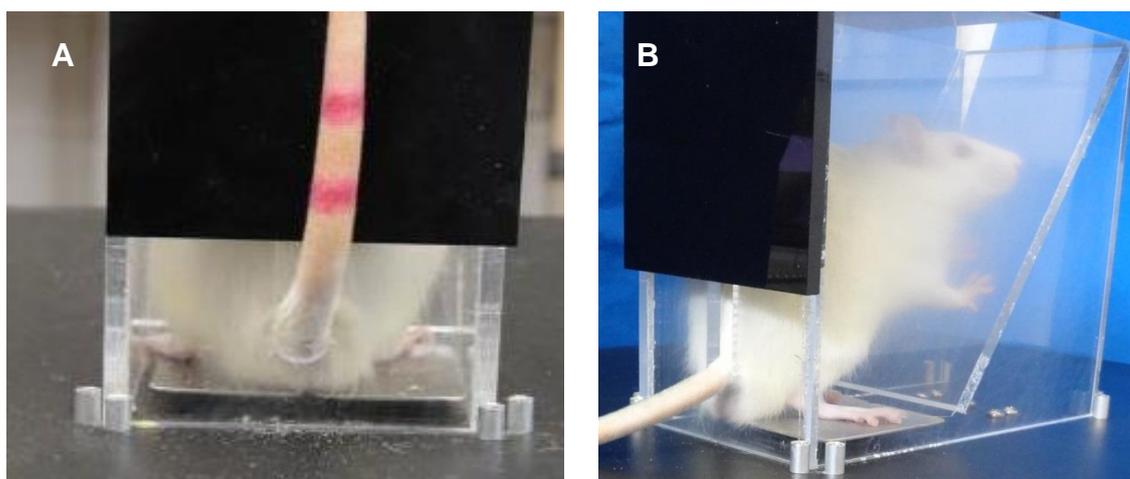
$$\text{Distribuição do peso (\%)} = \frac{\text{PPA}}{\text{PPA} + \text{PPC}} \times 100$$

Onde:

PPA é o peso da pata afetada;

PPC o peso da pata contralateral.

Figura 8 - Animais no aparelho *Weight Bearing*, demonstrando a distribuição do peso em plataformas (A e B).



Fonte: Próprio autor

3.6.4 Mouse Grimace Scale (MGS)

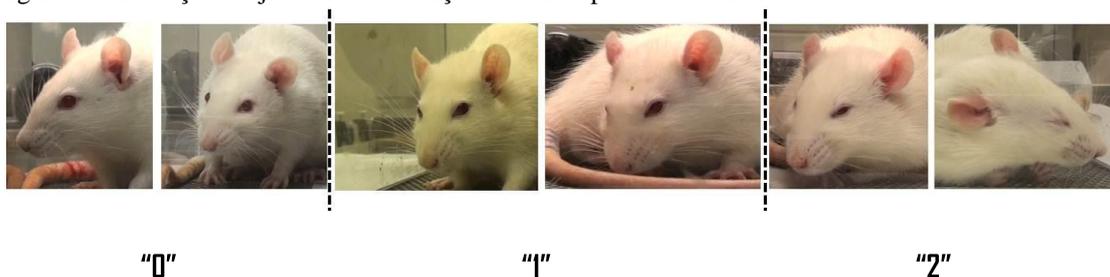
A MGS tem se constituído um novo método para avaliar a dor espontânea em animais no laboratório através das mudanças nas expressões faciais^{73,74,75,76,77,78}. Esse método foi baseado em um sistema de codificação de faces humanas⁷⁴ para a quantificação de dor não verbal em adultos⁷⁹ e neonatos⁸⁰.

Por exibirem expressões faciais similares aos estados emocionais em seres humanos, a MGS tem sido utilizada em animais⁷⁴. É considerada uma escala confiável, precisa e sensível em três espécies: humanos, ratos e camundongos⁷⁵, avaliando a dor espontânea⁷³.

Para discriminar a sensação subjetiva de dor facial, se adotou os seguintes critérios de avaliação⁷⁴: dor ausente é igual a “0”; dor moderada é igual a “1” e dor intensa é igual a “2” através da identificação das mudanças dos olhos, mudanças na protuberância do nariz/bochecha, mudanças nas orelhas e mudanças nos bigodes. O escore geral de dor facial foi dado pela soma da média dos escores dos dois avaliadores como descrito abaixo:

1. Mudança dos olhos: Os ratos com dor exibem um estreitamento da área orbital, uma pálpebra firmemente fechada ou um aperto nos olhos. Como orientação, qualquer fechamento que reduza o tamanho do olho em mais da metade deve ser codificado como “2”, pela metade como “1” e olhos abertos “0”. Fotografias de ratos dormindo não devem ser tomadas e/ou codificadas (Figura 9).

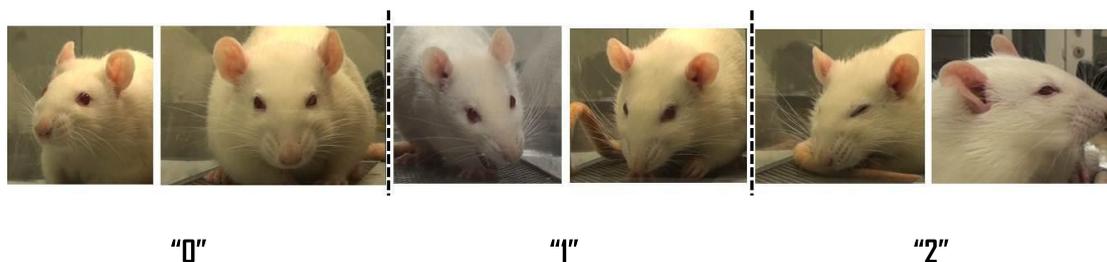
Figura 9 - Avaliação subjetiva das mudanças dos olhos pela MGS em ratos.



Fonte: Próprio autor

- 2.
3. Mudanças na protuberância do nariz/bochecha: Os ratos com dor exibem uma falta de protuberância no topo do nariz (isto é, um achatamento do nariz). Na condição “sem dor”, uma protuberância clara está presente na ponte do nariz. As bochechas também são arredondadas e levemente estufadas. Quando existe dor, a ponta do nariz se achata e se alonga, fazendo com que as bochechas do bigode achatem (Figura 10).

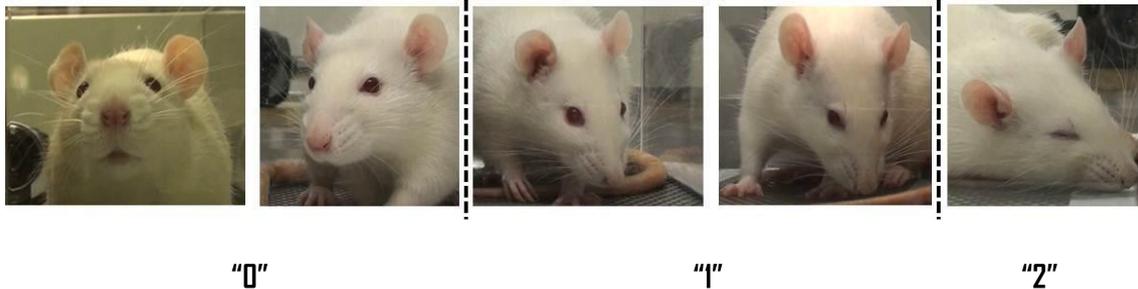
Figura 10 - Avaliação subjetiva das mudanças da protuberância do nariz pela MSG em ratos.



Fonte: Próprio autor

4. Mudanças nas orelhas: As orelhas dos ratos com dor tendem a dobrar, enrolar para dentro e são inclinadas para a frente. Em estados de dor acentuados, as orelhas são inclinadas para fora e são mantidas perto de 45 ° tanto do eixo perpendicular quanto do nariz. Como resultado, o espaço entre as orelhas pode parecer mais amplo em relação à linha de base (figura 11).

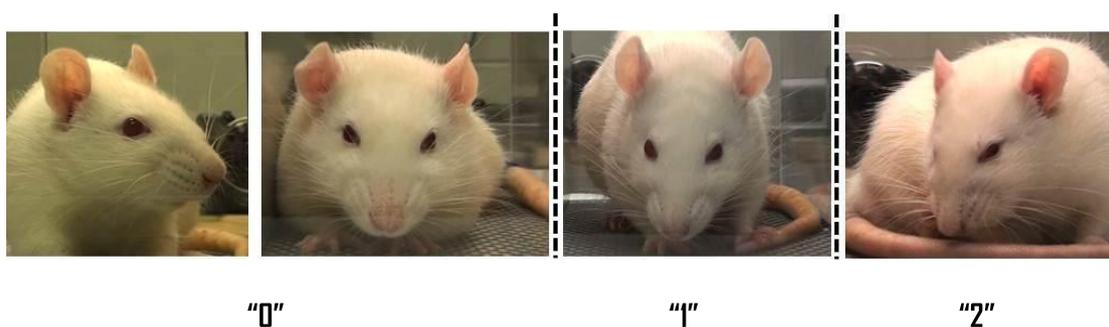
Figura 11 - Avaliação subjetiva das mudanças nas orelhas pela MGS em ratos.



Fonte: Próprio autor

5. Mudanças nos bigodes: Os ratos com dor têm bigodes angulados para trás ao longo da cabeça. Na dor, o bigode é contraído, fazendo com que eles se agrupem e sejam direcionados para fora do rosto. Isso dá a aparência dos bigodes como “em pé”. Conforme os folículos se tornam tensos, os bigodes ficam mais próximos e são menos distintos (Figura 12).

Figura 12 - Avaliação subjetiva das mudanças nos bigodes pela MGS em ratos.



Fonte: Próprio autor

Para evitar vieses na pesquisa por falsos positivos nos testes comportamentais, através do manejo de rotina (limpeza), pesquisa (administração de medicamentos), manipulação do animal e condições ambientais (temperatura, ruídos e iluminação)⁷⁷, todos os testes de avaliação da dor nociceptiva e espontânea no estudo foram feitos antes da gavagem nos animais fazendo

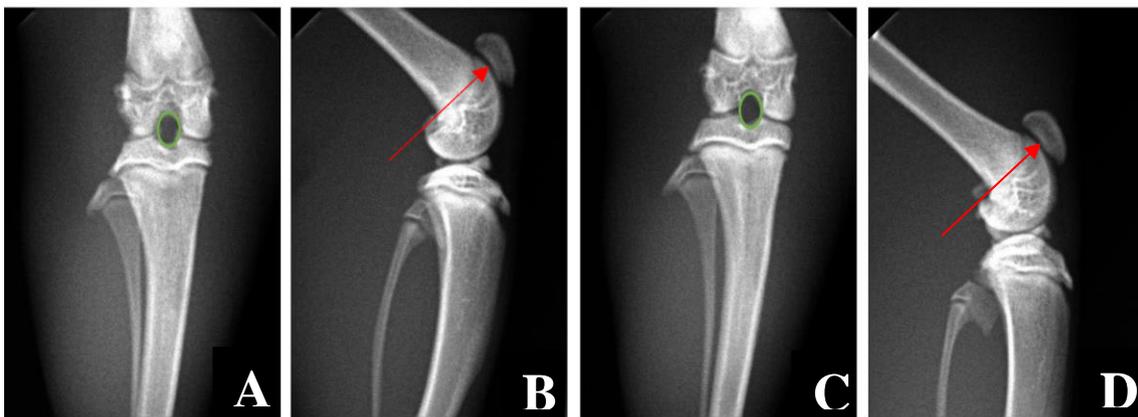
com que o manejo para administrar a medicação, o extrato e a solução salina não intervissem nas mesmas. Outra precaução foi manter uma temperatura e iluminação na sala de avaliação a mais próxima possível do biotério setorial, assim como um ambiente silencioso permanecendo na sala somente dois avaliadores para os testes comportamentais.

No estudo os ratos foram manipulados pelo dorso, pois o método padrão envolve muitas vezes sua coleta pela base da sua cauda, o que pode resultar em altos níveis de ansiedade e estresse nos animais produzindo um aumento de intensidade dor no grupo estudado^{76,77}.

3.6.5 Avaliação radiográfica

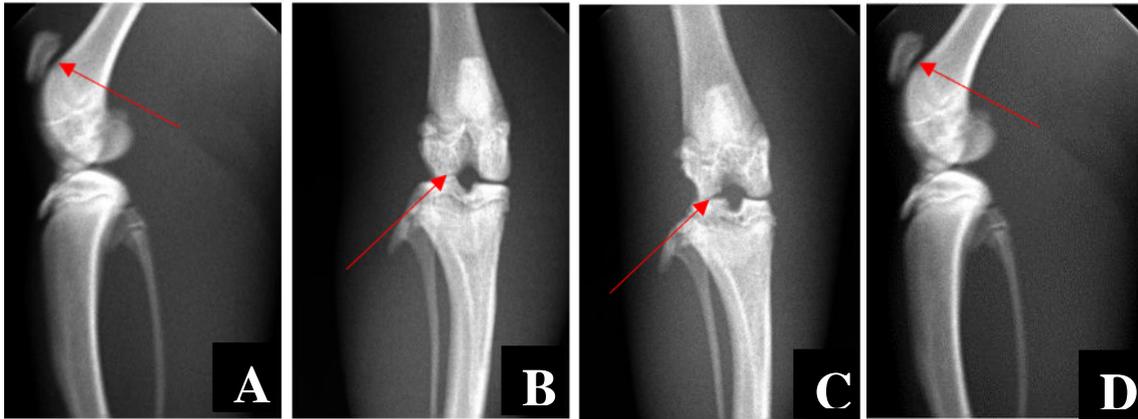
As radiografias do membro inferior dos animais foram obtidas através de aparelho de raios-X PHILIPS Medical Systems Ltda, unidade seladora Rotax, KVP 125, #Série PADXJL.10.001. Equipamento de raios-X com proteção radiológica de acordo com a NBR IEC 60601-1-3-2001. Modelo KL.90.30/50. Reveladora DIRECT DIGITIZER, Model DRYPRO SIGMA S/N 002650, P/N 9G9001, REF A4A9. As imagens foram realizadas no D28. No D28 já haviam sido eutanasiados e apenas o membro foi levado para raio x. Foram posicionados sobre o chassi a uma distância de 115cm do foco de acordo com a Figura 13 (A, B, C e D).

Figura 13 - Radiografias em AP mostrando congruência



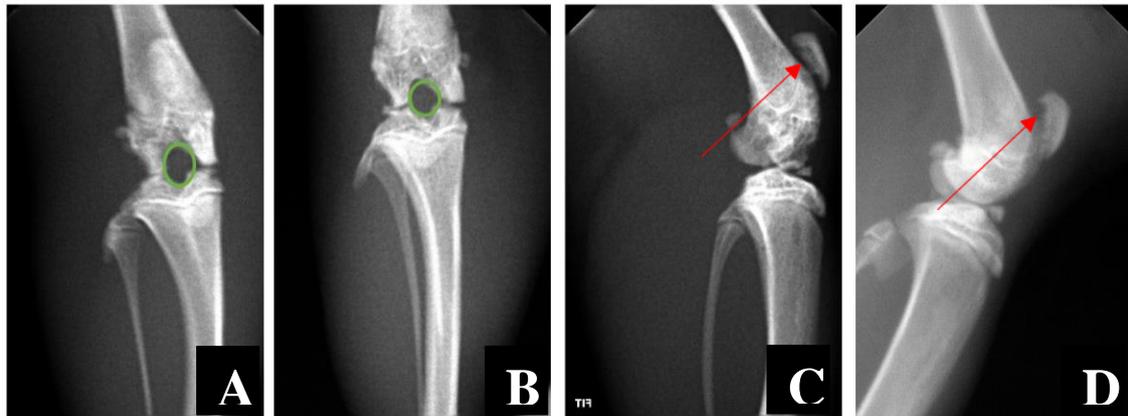
Nota: Radiografias mostrando congruência entre os côndilos femorais tibiais e o espaço intercondilar no perfil mostrando espaço íntegro entre a patela e fêmur (A, B, C e D). Fonte: Próprio autor

Figura 14 - Radiografias mostrando lesão unicompartimental somente lateral (A, B, C e D).



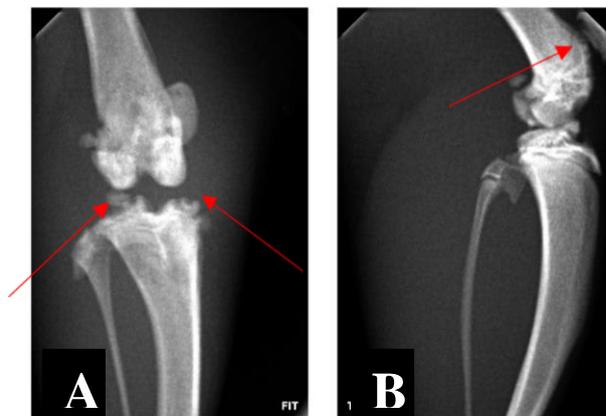
Fonte: Próprio autor.

Figura 15 - Radiografias em AP mostrando distrofia osteopenia, perda óssea e incongruência.



Nota: Radiografias em AP mostrando distrofia osteopenia, perda óssea e incongruência entre o tamanho dos côndilos e espaço intercondilar associado a diminuição do espaço articular, no perfil visualizamos destruição da cartilagem articular e perda óssea da patela (A, B, C e D). Fonte: Próprio autor.

Figura 16 - Radiografia mostrando destruição completa da articulação do joelho.



Nota: Radiografia mostrando destruição completa da articulação do joelho induzido com mia com calcificações e subluxação articular (A e B). Fonte: Próprio autor

3.6.6 Coleta da membrana sinovial e análise histopatológica

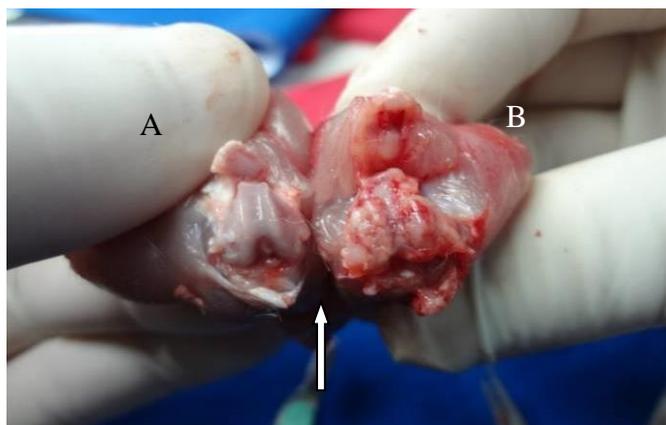
Após eutanásia e avaliação radiográfica, os animais foram colocados em decúbito dorsal. Com uma pinça de dente tipo *Adssen*, levantou-se a pele e o subcutâneo, sendo retirados em um bloco único com uma tesoura, deixando todo o tendão patelar e a face anterior da articulação expostos. Rebatia-se superiormente o tendão patelar da porção inferior na sua inserção na tuberosidade anterior da tíbia junto com a patela para cima. Com auxílio de um bisturi lâmina 15, foi feita a artrotomia que permitiu a identificação da membrana sinovial e, em seguida, sua ressecção em bloco (Figura 17). Depois de retirada da cápsula avaliava-se o aspecto da lesão macroscópica ao nível da cartilagem articular (Figura 18).

Figura 17 - Ressecção da membrana sinovial indicado pela seta.



Fonte: Próprio autor

Figura 18 - Comparação entre joelhos, grupo controle aspecto normal e com osteoartrite.



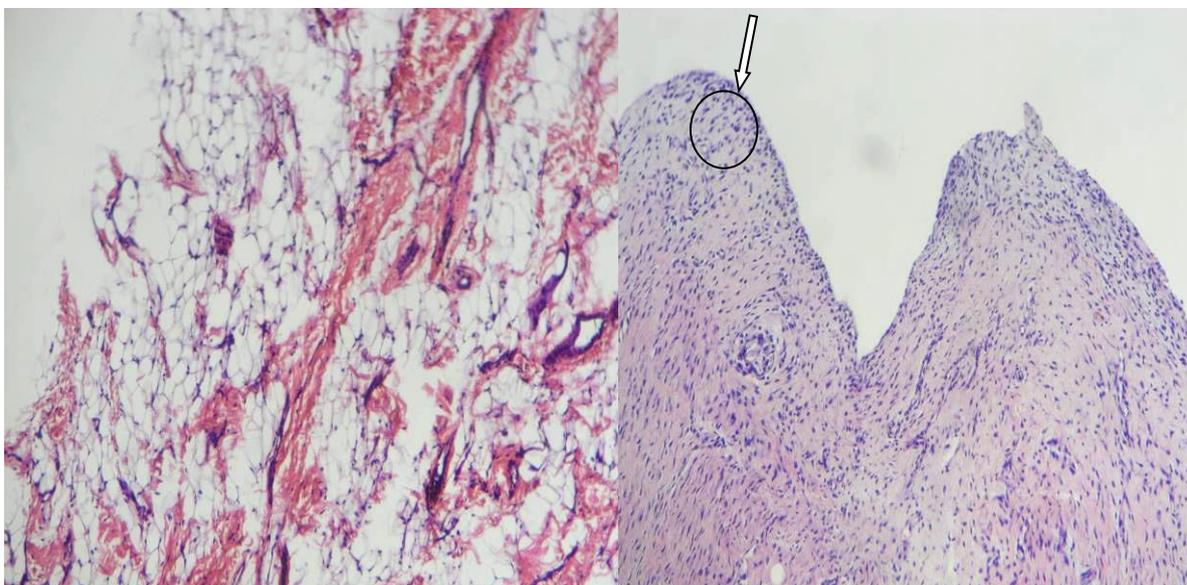
Nota: Comparação entre joelhos, grupo controle aspecto normal (A) e com osteoartrite grupo osteoartrite onde após ressecção da cápsula pode-se ver lesão condral (B) indicada pela seta. Fonte: Próprio autor

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 onde foram corados por hematoxilina e eosina (HE). Por fim os cortes foram colocados em moldes retangulares, formando blocos que foram seccionados em micrótomo na espessura de 4 μ m. Como controle histológico da cartilagem será realizada também a coloração por Azul de Toluidina, que cora especificamente os proteoglicanos da matriz orgânica da cartilagem, empregando-se interpretação subjetiva de vários parâmetros como o exsudato inflamatório, comprometimento do exsudato inflamatório (perivascular, intersticial e epitélio sinovial), depósitos fibrinóides e necrose, escolhidos com base em achados de autores que empregaram modelos experimentais de osteoartrite em ratos *wistar*⁸¹.

Foi utilizada o Score da Osteoarthritis Research Society International (OARSI). O sistema de avaliação histopatológica OARSI para a cartilagem com OA é baseado nas características histológicas de progressão da OA. O score OARSI é um método semi-quantitativo de avaliação do grau e extensão das lesões osteoártríticas. O grau é definido como a profundidade de progressão da OA dentro da cartilagem, sendo um índice da gravidade ou da progressão biológica do processo osteoártrítico. O grau é avaliado observando-se o presente grau mais avançado no interior da cartilagem, independente de sua extensão horizontal. A gravidade da OA é dividida em seis graus. Com a cartilagem normal o grau é zero. Grau 1-4 envolve alterações apenas na cartilagem articular. Já os graus 5 e 6 envolvem o osso subcondral também⁸².

Figura 19 - Fotomicrografia da membrana sinovial do joelho de ratos wistar GC28 e GOA28 com processo inflamatório.



Nota: Fotomicrografia da membrana sinovial do joelho de ratos wistar GC28 tecido normal (A) e GOA28 com processo inflamatório (B) coloração hematoxilina-eosina indicado pela seta. Fonte: Próprio autor

3.6.7 Avaliações de citocinas

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para quantificar citocinas (IFN- γ , IL-6 e IL-10) em amostras de soro sanguíneo coletadas dos ratos no momento da eutanásia, seguindo as instruções técnicas dos kits e equipamentos de dosagem de citocinas. O kit ELISA usado neste estudo foi adquirido da R&D Systems® (MN, EUA).

3.6.8 Atividade enzimática da ciclooxigenase 1 (COX 1) e ciclooxigenase 2 (COX 2)

O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (*Cox Colorimetric Inhibitor Screening - Cayman chemical*®). A placa de 96 poços foi inicialmente identificada, sendo os testes de inibição realizados em triplicata, para cada concentração testada (2, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$) do EHPA e para os controles da reação: **BW** – controle sem enzima; **A**- com enzima

somente, sem inibidor. Os 3 poços “**BW**” receberam 160 μL do tampão Tris-HCl, 10 μL do Heme e 10 μL do solvente – etanol 70%, utilizados para diluir as amostras. Os 3 poços “**A**” receberam 150 μL do tampão Tris-HCl, 10 μL do Heme, 10 μL da enzima (COX-1 ou Cox-2) e 10 μL do solvente – etanol 70%. Os poços com o cuminaldeído receberam 150 μL do tampão Tris-HCl, 10 μL do heme, 10 μL da enzima (COX-1 ou Cox-2) e 10 μL da amostra do cuminaldeído diluído com solvente – etanol 70%, nas concentrações 2, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Após a mistura de todos estes reagentes em cada poço, a placa foi agitada cuidadosamente por alguns segundos, sendo incubada por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 μL da solução com substrato colorimétrico, em cada poço da placa e após isso, foram adicionados 20 μL do ácido araquidônico, substrato da reação enzimática, catalisada pela COX. A placa foi novamente agitada, e incubada por 2 minutos a 25°C e foi lida em leitor Elisa (EPOCH) e então sendo lida a 590 nm.

3.7 **Estudo in Silico**

3.7.1 Predição in silico de atividade

A previsão das atividades biológicas e mecanismos de ação foi realizada usando o servidor online PASS⁸³.

3.7.2 Estruturas dos compostos

O cuminaldeído ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$) e demais fármacos foram estruturalmente esquematizados em três dimensões (3D) com o software GaussView 5.0.8⁸⁴ e tiveram suas propriedades geométricas e vibracionais calculadas (otimização) no vácuo em nível método da Teoria do Funcional da Densidade (TFD) utilizando o funcional híbrido B3LYP combinado com a base 6-31 ++ G (d, p) com o software Gaussian 09⁸⁵, para obtenção das propriedades eletrônicas atômicas e moleculares que estejam correlacionadas com a possível atividade biológica.

3.7.3 Estruturas dos alvos

Foram utilizadas as estruturas dos receptores opióides (ROp) do tipo kappa (κ OR - id #6B73), mu (μ OR – id #6DDF) e delta (δ OR – 6PT3) obtidos por técnicas experimentais (cristalografia de raios-x, microscopia eletrônica, ressonância nuclear magnética) disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB).

3.7.4 Docagem molecular

A docagem foi realizada com o pacote AutoDock Vina⁸⁶. O módulo AutoDock Tools 1.5.7 foi utilizado para preparar e analisar os cálculos computacionais. Após otimização, as estruturas dos compostos (cuminaldeído ou fármacos) foram posicionadas na porção central do respectivo sítio catalítico do OR selecionado (Asp128 para ROp-delta; Asp138 para ROp-kappa e Asp147 para ROp-mu).

As cargas Gasteiger e os hidrogênios polares, necessários para os cálculos de potencial, foram adicionados após a remoção de moléculas de água, fármacos e/ou artefatos das estruturas dos alvos⁸⁷. As estruturas dos alvos (ROp) foram mantidas rígidas, enquanto os ligantes não tiveram sua mobilidade restringida, permanecendo livres. As conformações de melhor energia de interação dos complexos ‘ligante + receptor’ identificados na docagem molecular foram selecionados com base em energia livre de ligação e constantes de inibição, por inspeção visual e análises de resíduos que melhor interagiram com o ligante^{61,88}. Análises moleculares e representações complexas foram obtidas usando o pacote UCSF *Chimera*⁸⁹.

3.7.5 Análise toxicológica

Antes do início do tratamento no D0 e no D28 após tratamento com cuminaldeído foi coletado amostras de sangue. O sangue coletado foi colocado em tubos de plástico de 4ml da marca BD com EDTA a vácuo para realização do hemograma completo e tubos Gel a vácuo de 3,5ml com gel separador e ativador de coagulo para dosagens bioquímicas. Submetidos a centrifugação para obtenção do soro, sendo em seguida separados e acondicionados em fracos

tipo *Eppendorf*®. Os parâmetros bioquímicos foram as proteínas plasmáticas totais. No hemograma completo foram utilizados dados da série leucocitária, eritrocitária e plaquetária.

3.7.6 Análise Estatística

A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada pelo teste *t de Student* ou análise de bivariância (*TWO-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Tukey*. Na avaliação de duas fontes de variabilidade, foi utilizado 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 Instal*® (*Graph Pad software 7.0*, San Diego, CA).

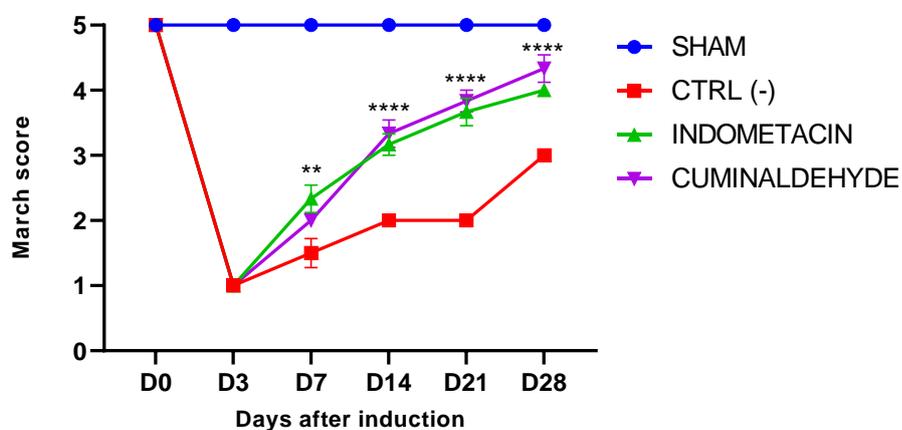
4 RESULTADOS

Vinte e quatro animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, animais cada: Grupo sham (GCS); animais saudáveis não tratados não induzidos para OA; grupo salina (GCN): animais OA tratados por via oral a 1 mL / kg / dia com cloreto de sódio a 0,9% (NaCl); Grupo cuminaldeído (GC): OA animais tratados por via oral com 5 mg / kg / 72 horas de cuminaldeído; grupo indometacina (GI): OA animais tratados por via oral com 2,5 mg / kg / 72 horas de indometacina relatados nos resultados a seguir.

4.1 Avaliação da atividade motora/deambulação forçada – *Rotarod* teste

A avaliação da atividade motora/deambulação forçada (teste do *Rotarod*) mostrou uma redução semelhante na pontuação de deambulação de todos os grupos induzidos com OA no D3 (Figura 1), demonstrando uma indução efetiva. O tratamento com cuminaldeído apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$) em comparação com o tratamento com solução salina, conforme evidenciado por uma melhora progressiva no parâmetro da marcha em relação ao grupo controle negativo. A melhora foi estatisticamente igual ao tratamento com indometacina, a partir do sétimo dia após a indução da OA durante todo o período experimental (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Efeitos do cuminaldeído na atividade motora/deambulação forçada de ratos com OA induzida, avaliados pelo escore do teste do *Rotarod*.



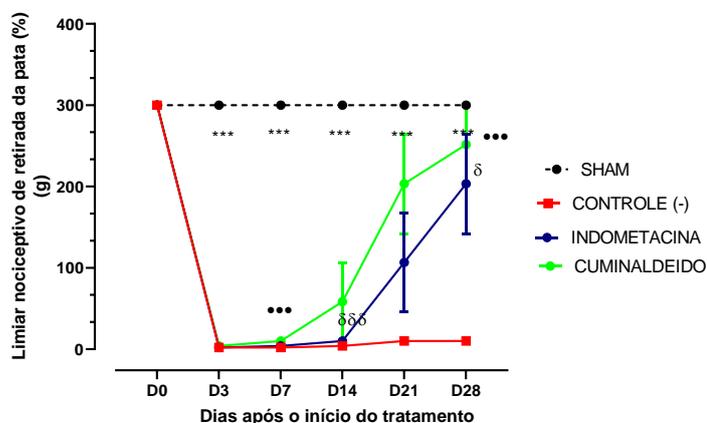
Nota: Os animais receberam administração oral de solução salina (CTL-), indometacina (CTL+) e cuminaldeído (50 mg/kg) do D3 ao D28, e foram avaliados nos dias 7, 14, 21 e 28 após a indução da OA. Os dados são

representados como médias \pm erro padrão da média (SEM). O grupo SHAM representa animais sem osteoartrite e sem nenhum tratamento. A análise estatística foi realizada usando análise de variância bidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Diferenças significativas foram indicadas por *** para $p < 0,001$ e **** para $p < 0,0001$. (D = dia).

4.2 Avaliação da alodínea tátil - *Von Frey*

A indução de OA reduziu o limiar nociceptivo da retirada da pata em todos os grupos de forma semelhante. A partir do D14 com o tratamento com cuminaldeído 5mg/kg/72h, foi possível observar uma tendência no aumento do limiar nociceptivo e diminuição da alodínea tátil no grupo tratado com cuminaldeído. Este aumento nos dias D7 e D28 mostrou-se estatisticamente significativo quando comparado ao grupo Controle (-) ($p < 0,05$). O tratamento com cuminaldeído também mostrou-se estatisticamente igual ao tratamento com indometacina (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Efeito cuminaldeído sobre alodínea tátil em ratos com osteoartrite induzida (OA), mensurada por avaliação indireta com o teste de *Von Frey*.



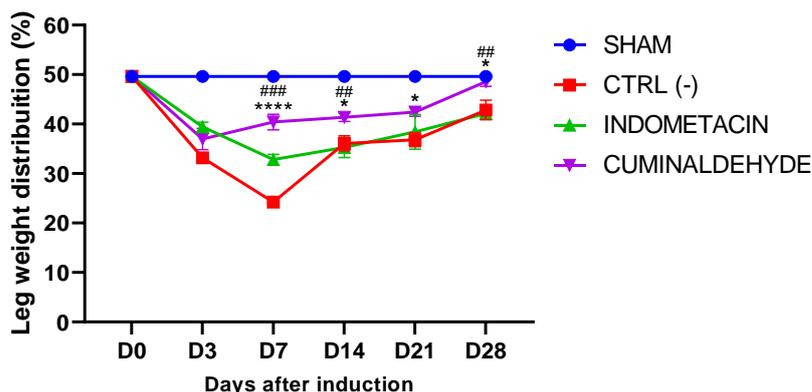
Nota: Os resultados foram expressos como média \pm erro médio padrão. Os símbolos *□□ representam diferenças significativas dos grupos tratados com cuminaldeído (□) indometacina (□) e grupo SHAM (□) comparado ao grupo controle negativo, com $p < 0,05$ e ***; □□□ para $p < 0,0001$ comparando o grupo tratado com cuminaldeído vs o grupo controle negativo.

4.3 Teste de incapacitação/distribuição de peso nas patas traseiras (teste de apoio de peso)

O grupo SHAM, que não recebeu nenhum tratamento, demonstrou suporte simétrico em ambas as patas traseiras no início e no final do experimento, com uma pontuação de aproximadamente 50%, indicando a ausência de dor nas articulações. Por outro lado, nos dias 7, 14 e 28,

os animais tratados com cuminaldeído mostraram melhorias significativas ($p < 0,05$) na distribuição de peso nas duas patas em comparação com os grupos de solução salina e indometacina. No dia 28, a distribuição de peso nas patas dos animais tratados com cuminaldeído foi normalizada (Gráfico 3).

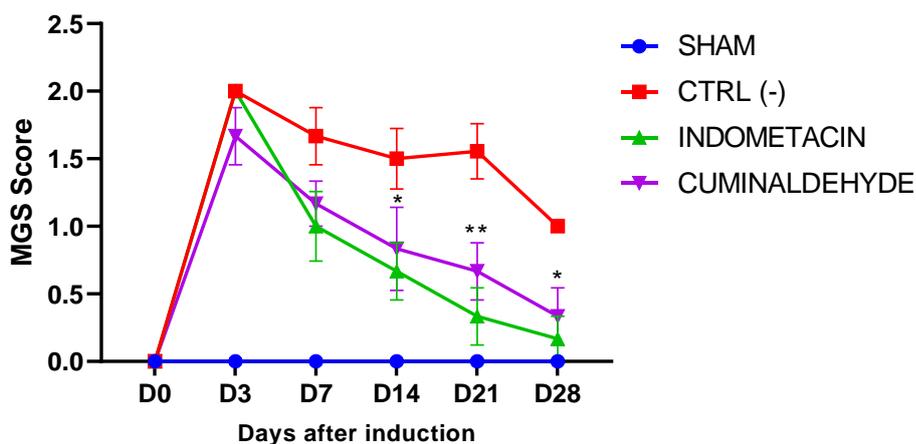
Gráfico 3 - Efeitos do cuminaldeído na extensão da incapacidade em ratos com osteoartrite induzida (OA), avaliados pelo teste de distribuição de peso.



Nota: Os resultados são expressos como médias \pm erro padrão da média (SEM). O grupo saudável (SHAM) representa animais sem osteoartrite ou qualquer tratamento. A análise estatística, realizada por meio de ANOVA de duas vias seguida do teste de Tukey, revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os animais tratados com cuminaldeído e o grupo controle com solução salina (CTRL -) e o grupo tratado com indometacina (controle positivo) nos dias 7, 14 e 28. O símbolo * indica diferenças significativas em comparação com o grupo com solução salina, e o símbolo # indica diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com indometacina. Além disso, o símbolo **** representa $p < 0,0001$, ## representa $p < 0,01$ e ### representa $p < 0,001$. (D = dia).

Após a indução da OA, todos os grupos demonstraram aumento semelhante na dor espontânea, conforme evidenciado pela Escala de Grimace em ratos (MGS). No entanto, a partir do dia 14, os animais tratados com cuminaldeído apresentaram uma melhora significativa ($p < 0,05$) nos escores de dor em comparação ao grupo CTRL (-). Além disso, o cuminaldeído demonstrou atividade analgésica comparável à indometacina durante todo o período experimental (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Efeito do cuminaldeído na avaliação da dor espontânea pelo escore da Escala de *Grimace* em ratos.

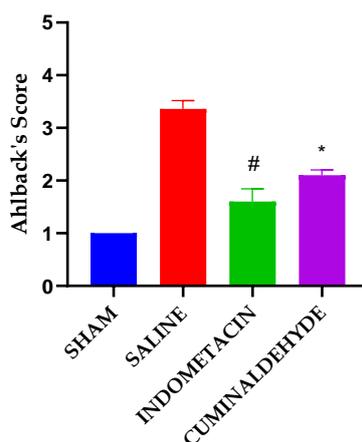


Nota: Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). *Diferenças significativas, em $p < 0,05$; ** em $p < 0,01$. *em comparação com o grupo com solução salina (CTRL -). (ANOVA de duas vias; Tukey). (D = dia).

4.4 Análises radiográficas

Exames radiográficos dos joelhos dos ratos mostraram diferenças no Escore de Ahlback, indicando o grau de danos nas articulações. Os ratos induzidos com OA apresentaram perda significativa do espaço articular. Em comparação ao grupo de controle negativo, tanto os grupos de tratamento com indometacina quanto com cuminaldeído mostraram uma diferença estatisticamente significativa, com uma pontuação mais baixa indicando menor perda óssea, a 7 mm ao longo das margens articulares externa ou interna a partir de uma linha desenhada perpendicularmente ao eixo tibial e tangente à superfície articular não afetada. No entanto, o teste estatístico de Sidak foi utilizado para confirmar a significância da diferença (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Grau de envolvimento articular em ratos tratados com cuminaldeído, seguindo a Escala de Ahlback.

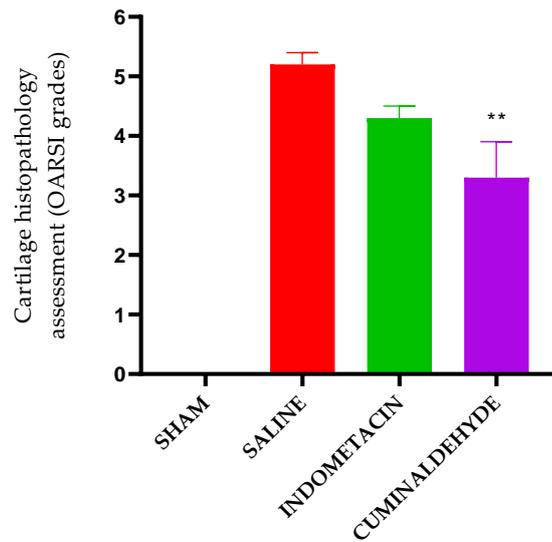


Nota: Os dados são representados como média \pm erro padrão da média (SEM). Essa análise foi realizada nos joelhos coletados no dia 29 após a indução da OA. *Diferenças significativas em $p < 0,05$ em comparação ao grupo CTRL (-) (salina). (ANOVA de uma via; Dunnett).

4.5 Análise histopatológica

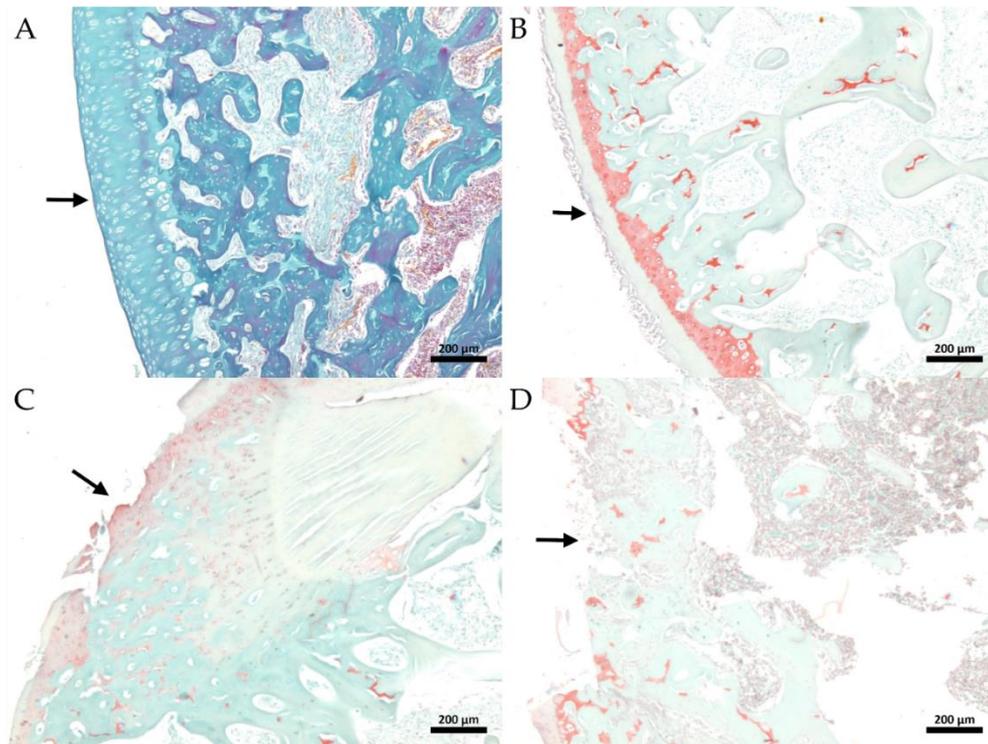
A gravidade ou progressão biológica do processo osteoartítico foi classificada de acordo com a pontuação da Osteoarthritis Research Society International (OARSI). Animais tratados com cuminaldeído mostraram significância estatística na progressão da OA, com uma pontuação média de 3,3 ($\pm 0,6$), que foi significativamente menor do que o grupo controle de salina (CTL-) com uma pontuação média de 5,2 ($\pm 0,2$). O grupo indometacina apresentou uma pontuação média de 4,3 ($\pm 0,2$) (Gráfico 6 e Figura 21). Assim, os animais tratados com cuminaldeído exibiram um perfil histológico melhor da cartilagem do joelho, com uma classificação de pontuação OARSI mais baixa em comparação ao grupo de salina.

Gráfico 6 - Resultados das avaliações histopatológicas da cartilagem, classificadas pelo sistema de pontuação da Osteoarthritis Research Society International (OARSI).



Nota: A análise foi realizada nos joelhos coletados no 29º dia após a indução da OA. Os grupos incluíram o grupo não tratado e não induzido de OA (SHAM), o grupo induzido de OA e não tratado (CTL-), o grupo induzido de OA e tratado com indometacina, e o grupo induzido de OA e tratado com cuminaldeído. O eixo Y representa a avaliação histopatológica da cartilagem de acordo com o sistema de classificação histológica OARSI: Grau 0 - superfície intacta e cartilagem intacta; Grau 1 - superfície intacta; Grau 2 - descontinuidade da superfície; Grau 3 - fissuras verticais; Grau 4 - erosão; Grau 5 - desnudamento; e Grau 6 - deformação). **Diferenças significativas em $p < 0,005$ em comparação ao grupo de salina (CTL-) (ANOVA de uma via; Tukey).

Figura 20 - Resumo dos sistemas de avaliação histopatológica da cartilagem de acordo com a Osteoarthritis Research Society International (OARSI) em diferentes grupos de animais.

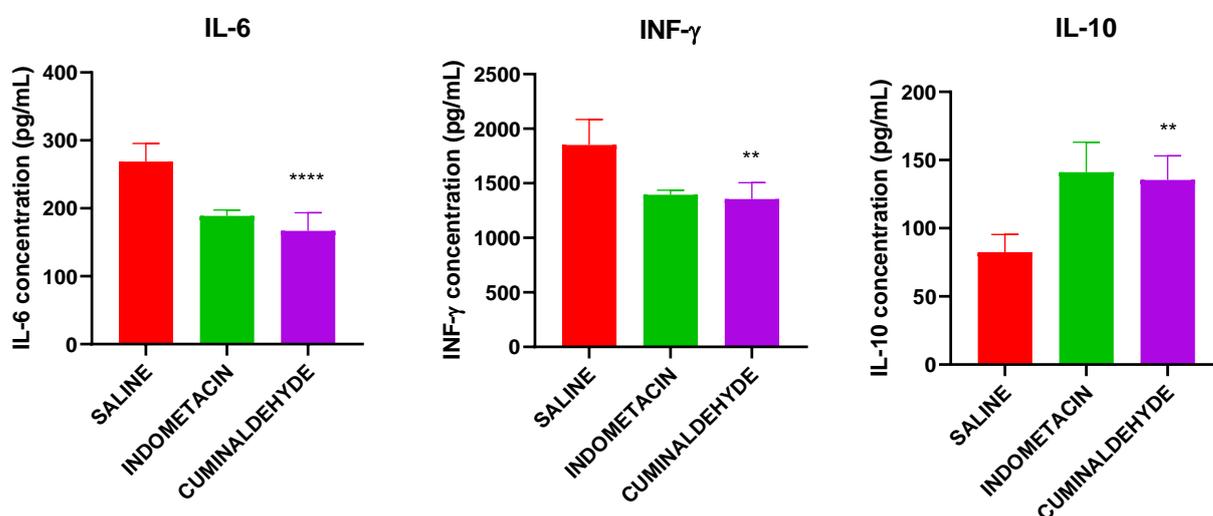


Nota: O painel A retrata o grupo sham com largura normal da cartilagem, classificado como grau 0. O painel B mostra um animal do grupo cuminaldeído com degeneração moderada, classificado como grau 3. O painel C mostra um animal do grupo indometacina com erosão da cartilagem calcificada que se estende por aproximadamente 75% da superfície articular, classificado como grau 4/5. O painel D mostra um animal do grupo salina com processos de microfratura, reparação e remodelação óssea, classificado como grau 5/6. A matriz da cartilagem foi corada com Safranina-O, e a ampliação original foi de 50x. A barra representa 200 μ m. A seta indica a face superficial da cartilagem articular.

4.6 Análise de citocina

A concentração de IL-6 e INF- γ em animais tratados com cuminaldeído foi significativamente menor do que nos animais do grupo de salina ($p < 0,0001$ e $p < 0,001$, respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas nessas citocinas entre os grupos de cuminaldeído e indometacina. A concentração de IL-10 foi significativamente maior nos animais tratados com cuminaldeído em comparação ao grupo de salina ($p < 0,001$) (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Concentração das citocinas IL-6 (A), INF- γ (B) e IL-10 (C) avaliadas por ELISA no soro dos animais utilizados nos experimentos.

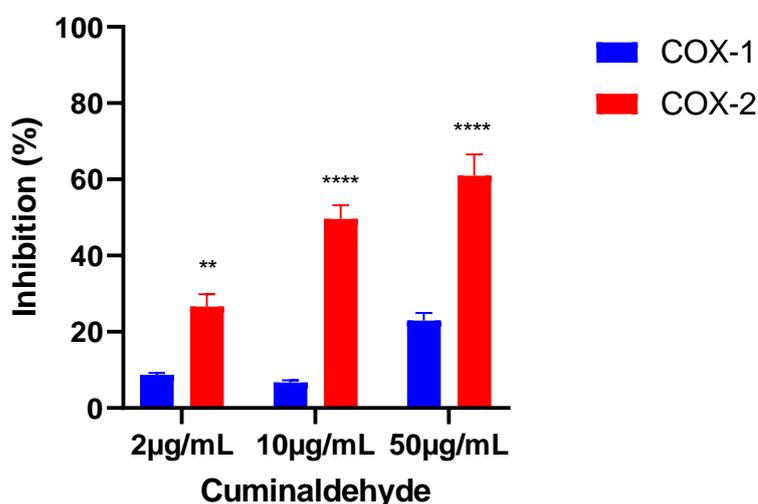


Nota: **, **** Diferenças significativas em $p < 0,005$ e $0,0001$, respectivamente, em comparação ao grupo de salina (CTL-); # $p < 0,05$ em comparação com a indometacina (ANOVA de uma via; Tukey).

4.7 Inibição da ciclo-oxigenase 1 e 2

Os resultados dos testes de inibição da ciclo-oxigenase 1 e 2 mostraram que o cuminaldeído apresentou baixa inibição para COX-1 em todas as três concentrações testadas, com a maior inibição observada na concentração mais alta (50 $\mu\text{g/mL}$). Por outro lado, o cuminaldeído mostrou inibição mais pronunciada para COX-2, inibindo 60,9% da atividade dessa isoforma na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Esses resultados sugerem que o cuminaldeído apresenta maior seletividade para COX-2 em relação à COX-1, com diferenças estatisticamente significativas na inibição observada entre as duas isoformas ($p < 0,0001$) (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Inibição percentual in vitro das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2).



Nota: - A inibição percentual in vitro das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) produzida pelo cuminaldeído em três concentrações testadas: 2 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os asteriscos indicam diferenças significativas, com * representando $p < 0,005$ e **** representando $p < 0,0001$ ao comparar a inibição da COX-2 com a COX-1. A análise estatística foi realizada usando o teste de ANOVA de duas vias com comparação múltipla de Sidak.

4.8 Acoplamento molecular

O cuminaldeído mostrou parâmetros de afinidade eletrônica significativos com a COX-2 (-7,2 kcal/mol) e todos os tipos de receptores opioides (OR) avaliados, com destaque para os tipos kappa (-6,80 kcal/mol), delta (-6,70 kcal/mol) e mu (-6,00 kcal/mol). Para validar o protocolo utilizado, foi realizada a redocking de CVV, Morfina e Naltrindole nos ORs kappa, mu e delta, respectivamente. O desvio médio quadrático (RMSD) entre as conformações de redocking previstas e a estrutura cristalográfica observada por raios-X foi sempre inferior a 1,54

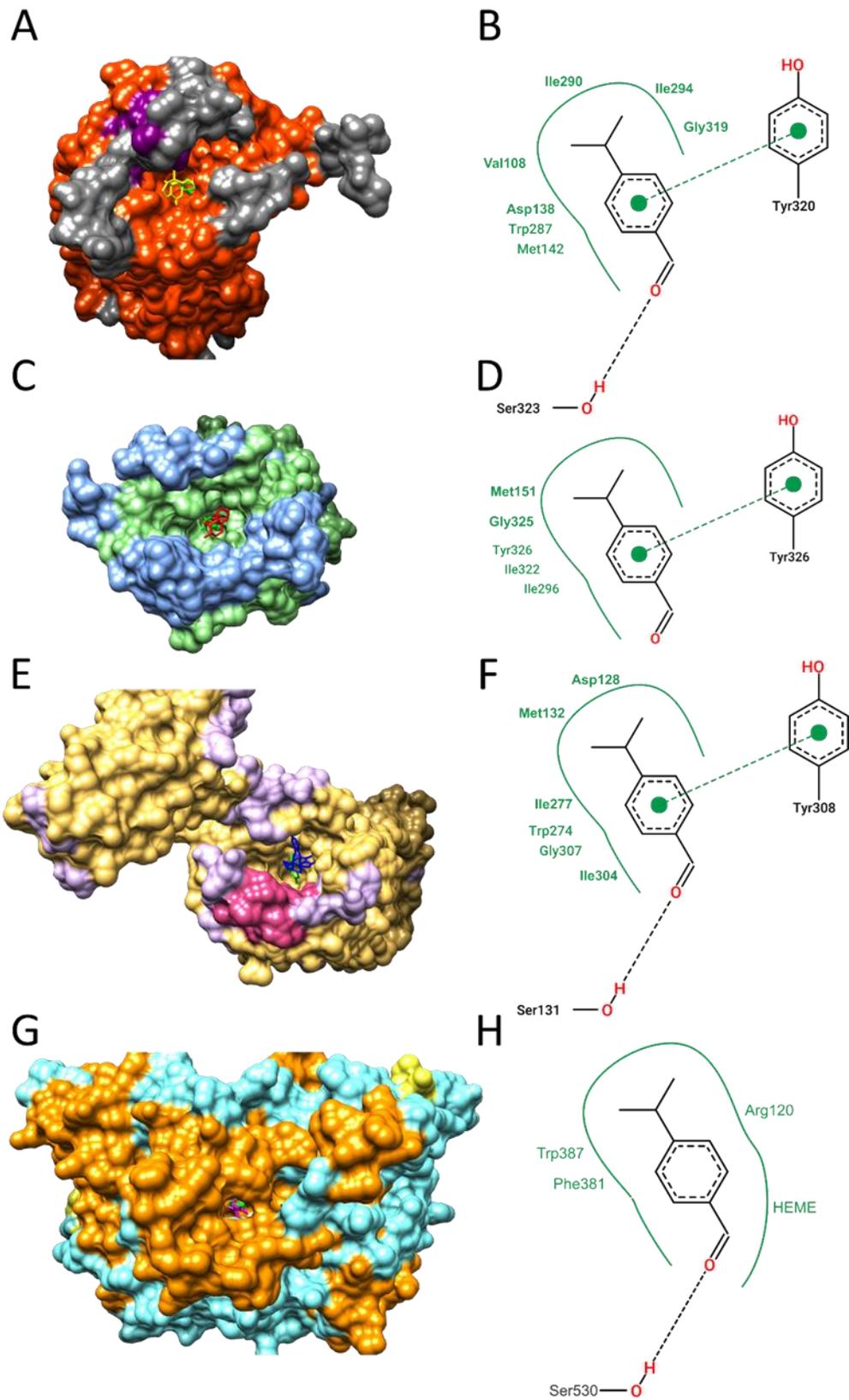
À para todas as drogas, indicando que o protocolo de docking é válido pois previu com sucesso a conformação espacial do ligante no sítio ativo do alvo. Durante o redocking, constatou-se que todas as drogas apresentaram parâmetros de afinidade energética mais altos do que o cuminaldeído, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Energias de ligação livre obtidas por docking molecular do cuminaldeído e/ou drogas nos ORs de tipo kappa, mu e delta.

Ligante	Alvo / ΔG_{bind} (kcal/mol)			
	kappa (κ OR) (#6B73)	mu (μ OR) (#6DDF)	delta (δ OR) (#6PT3)	COX-2 (#1DDX)
Cuminaldeído	-6.80	-5.60	-6.71	-7.2
Morfina	-	-8.0	-	-
JDtic	-10.70	-	-	-
CVV	-11.80	-	-	-
Naltrindole	-	-	-12.00	-
Indometacina	-	-	-	-8.1

Além disso, os resultados do docking molecular indicaram que o cuminaldeído apresentava parâmetros favoráveis de energia de ligação livre e previa-se que se ligasse à mesma região que as drogas opioides tradicionais, como mostrado na Figura 22. Isso sugere que o cuminaldeído pode ter potencial como um agonista do receptor opioide e inibidor da COX-2.

Figura 21 - Conformação espacial dos ORs kappa, mu e delta (IDs PDB 6B73, 6DDF e 6PT3, respectivamente) interagindo com o cuminaldeído.



Nota: Os painéis B, D, F e H mostram o diagrama bidimensional dos contatos feitos pelo cuminaldeído com os resíduos de aminoácidos do sítio ativo dos ORs kappa, mu, delta e COX-2, respectivamente, obtidos por docking molecular. Drogas opioides tradicionais, como CVV (mostrado em amarelo na Figura 1A), morfina (em vermelho na Figura 1C) e naltrindole (em azul na Figura 1E), assim como indometacina (em magenta na Figura 1G), também estão representadas. As ligações de hidrogênio são representadas por linhas pretas tracejadas, interações de van der Waals por linhas verdes contínuas e interações π - π por linhas verdes tracejadas.

Os dados de predição de atividade pelo PASS sendo Pa rates (probability “to be active”) and Pi (probability “to be inactive”) reportam em primeiro lugar como atividade provável (Pa > Pi) o potencial uso do cuminaldeído como anestésico de uso geral. Destaca-se também o potencial desta molécula de atuar como substratos de citocromo P450 das famílias 2B6, 2A6, 2E1 e 2C9 (Tabela 2).

Tabela 2 – PASS

Pa	Pi	
0.906	0.003	Anestésicos em geral
0.894	0.006	Inibidor de ubiquinol-cytochrome-c reductase
0.844	0.015	Inibidor da testosterona 17beta-de-hidrogenase (NADP+)
0.825	0.006	Substrato CYP2B6
0.821	0.011	Inibidor da cinase do receptor beta-adrenérgico
0.821	0.011	Inibidor de quinase do receptor acoplado à proteína G
0.818	0.004	Inibidor de transaminase aspartato-fenilpiruvado
0.803	0.032	Tratamento de distúrbios fóbicos
0.802	0.007	5-O-(4-coumaroyl)-D-quinato 3'- inibidor da mono oxigenase
0.792	0.011	Inibidor de glutamil endopeptidase II
0.791	0.023	Substrato CYP2J
0.790	0.010	Inibidor de aldeído oxidase
0.789	0.006	Substrato CYP2A
0.788	0.018	Inibidor de fosfatase de açúcar
0.786	0.004	Inibidor de fosfatase
0.785	0.023	Protetor Mucomembranoso
0.784	0.006	Substrato CYP2A6
0.783	0.011	Inibidor de alquilacetilglicerofosfatase
0.777	0.014	Inibidor de esterase de feruloyl
0.766	0.005	Substrato CYP2E1
0.766	0.011	Inibidor de 3-epimerase de fosfato de ribulose-fosfato
0.764	0.004	Carminativo
0.762	0.018	Inibidor de acilcarnitina hidrolase
0.760	0.005	Substrato CYP2E
0.760	0.018	Inibidor de permeabilidade da membrana
0.759	0.008	Inibidor de Monodehydroascorbate reductase (NADH)
0.758	0.003	Inibidor do uroporfirinogênio-III sintetase
0.755	0.013	Substrato CYP2C
0.753	0.007	Inibidor do fator de coagulação B do limitulus
0.751	0.002	Substrato de álcool desidrogenase
0.751	0.030	Antieczematic
0.750	0.003	Inibidor de nitrilase
0.749	0.016	Inibidor de descarboxilase do Dehidro-L-gulonato-L
0.748	0.009	Substrato CYP2C9

4.9 Análise Bioquímica

Os parâmetros hematológicos da série vermelha obtidos encontram-se na Tabela 3. Observou-se diferença significativa na hemoglobina do grupo tratado com indometacina quando comparada a todos os demais grupos. A avaliação da série branca mostra que não ocorreu diferenças significativas quando comparadas entre os grupos da Tabela 3. Os resultados apresentados caracterizam as condições fisiológicas dos ratos Wistar utilizados na pesquisa e sendo submetido aos tratamentos estabelecidos pelo protocolo proposto, mantidos no biotério setorial do PP Graduação.

Tabela 3 - Resultado dos parâmetros hematológicos, série eritrocitária e leucocitária por grupos.

Série Eritrocitária				
ERITROGRAMA	SHAM	CUMINALDEÍDO	INDOMETACINA	CONTROLE
ERITRÓCITOS (/mm ³)	6515000 ± 176776,69	6520000 ± 452548,33	5520000 ± 1301076,47	6390000 ±
HEMOGLOBINA (g/dl)	132,5 ± 2,12	132,5 ± 3,53	106,5 ± 27,57	129 ±
HEMATÓCRITO (%)	410 ± 14,14	405 ± 7,07	345 ± 77,78	390 ±
V.G.M. (fl)	629,5 ± 38,89	622 ± 32,52	625,5 ± 6,36	610 ±
C.H.G.M. (%)	323 ± 5,65	327 ± 2,82	307,5 ± 10,60	330 ±
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS (g/dl):	65 ± 4,24	64 ± 5,65	71 ± 12,72	60 ±
PLAQUETAS	393100 ± 25597,26	307500 ± 121,32	333500 ± 30405,59	204000 ±

Série Leucocitária				
	SHAM	CUMINALDEÍDO	INDOMETACINA	CONTROLE
MIELÓCITOS	0	0	0	0
METAMIELÓCITOS	0	0	0	0
BASTÕES	0	0	0	0
SEGMENTADOS % /mm ³	55,5 ± 19,09	56,5 ± 13,43	62,5 ± 7,77	70
LINFÓCITOS % /mm ³ .	41 ± 16,97	42 ± 12,72	32 ± 4,24	30
EOSINÓFILOS	41 ± 16,97	42 ± 12,72	32 ± 4,24	30
BASÓFILOS	3,5 ± 2,12	1,5 ± 0,70	4 ± 5,65	0
MONÓCITOS	0	0	0	0
	0	0	0	0

Cabe ressaltar, que os valores obtidos não devem ser extrapolados para outros biotérios, pois os parâmetros variam consideravelmente conforme a metodologia empregada na análise hematológica.

5 DISCUSSÃO

No campo experimental do estudo da dor na osteoartrite, usando animais como modelo, tem gerado grandes frustrações, pois enormes ganhos de conhecimentos da ciência obtidos com experimentos em animais não têm levado ao desenvolvimento de novos compostos clínicos eficazes, embora hoje os pesquisadores tenham uma ampla gama de animais mutantes para estudar a dor em ensaios que se assemelham a dor clínica. A complexidade do fenômeno da dor ainda é difícil de avaliar, pois vários moduladores como sexo, genótipo e comunicação social devem ser levados em conta. Por isto novos modelos de dor devem ser revistos e aprimorados bem como o desenvolvimento de novos medicamentos analgésicos⁹⁰.

Portanto, mensurar a dor do ponto de vista sensorial e perceptivo em conjunto em experimentos com animais é extremamente importante, pois o estímulo doloroso não pode ser considerando somente em sua magnitude como uma simples dimensão univariável e unitária variando em qualidade e intensidade sensoriais e também não pode ser considerada somente do ponto de vista da percepção como uma experiência multidimensional⁹¹, logo, a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na geração, modulação, amplificação e perpetuação da dor, assim como sua inibição, desempenham um papel importante na determinação do melhor esquema terapêutico para osteoartrite, não só do ponto de vista de seu controle sintomático, mas dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos melhorando a dor, a função e qualidade de vida.

A injeção intra-articular do MIA, como avaliado em outros estudos, provoca a degeneração dos condrócitos através da inibição do 3-fosfato-gliceraldeído, resultando em OA. Neste estudo, esse efeito levou a uma redução do escore de marcha dos animais induzidos, em que a utilização do cuminaldeído melhorou a deambulação forçada a partir do sétimo dia após a indução. Com a progressão da OA, a dor torna-se contínua, difusa e basicamente mecânica, isto é, protocinética⁹².

O modelo OA em joelho de rato induzido pelo monoiodoacetato de sódio é uma ferramenta valiosa para pesquisas relacionadas à osteoartrite, pois produz mudanças significativas nos movimentos articulares, alodínea tátil, degeneração radiológica progressiva e inflamação microscópica da membrana sinovial. Esse modelo causa degeneração de condrócitos ao inibir o 3-fosfato-gliceraldeído, que serve como um marcador para avaliar a osteoartrite^{9,92}.

Na osteoartrite (OA), a patogênese envolve a ação de neuromoduladores inflamatórios nos terminais nociceptivos, levando à sensibilização periférica. Isso resulta em alodínea e hiperalgesia, que são caracterizadas por um limiar de dor diminuído, indução de descargas ectópicas e aumento dos canais de sódio^{93,94}.

O cuminaldeído é um composto natural presente em várias plantas, incluindo o cominho, uma especiaria comumente utilizada. Vários estudos sugerem que o cuminaldeído pode possuir propriedades analgésicas ao inibir a atividade de um tipo específico de receptor de dor, conhecido como TRPA1, que desempenha um papel crítico na transmissão da dor⁹⁵. No entanto, há evidências limitadas para apoiar os efeitos analgésicos do cuminaldeído, e são necessárias investigações adicionais para compreender completamente seu potencial terapêutico como agente de controle da dor.

Estudos em animais mostraram que o cuminaldeído pode reduzir a sensibilidade à dor em modelos de dor neuropática. O composto foi testado em testes de placa quente, formalina e contorções induzidas por ácido acético, todos os quais mostraram atividade analgésica, indicando efeitos tanto centrais quanto periféricos. As propriedades antinociceptivas do cuminaldeído foram demonstradas nesses modelos animais, sugerindo que ele pode ter potencial como tratamento para a dor em humanos⁶⁸.

O teste do rota-rod foi usado para avaliar a atividade motora e forneceu evidências de que a indução da OA foi eficaz. A primeira avaliação após a indução revelou uma diferença significativa entre os grupos induzidos, evidenciada pela diminuição da atividade motora dos animais e pelos escores de marcha prejudicados⁹⁶. Devido à dor, os animais afetados pela OA apresentam mobilidade articular significativamente reduzida⁹⁷. O tratamento com cuminaldeído mostrou uma melhora significativa na atividade motora em comparação com o grupo salina, sugerindo que o cuminaldeído, na concentração testada, melhorou a mobilidade dos animais. O teste de mobilidade demonstrou que os animais tratados com cuminaldeído apresentaram uma melhora notável na atividade motora a partir do sétimo dia de avaliação, o que persistiu até o período de avaliação final (D28). Esses achados sugerem que o cuminaldeído possui atividade analgésica potencial, resultando em uma melhora na mobilidade dos animais com OA.

A avaliação da dor alodínea tátil pelo teste de *Von Frey*, demonstrou uma resposta bifásica mostrando que o cuminaldeído apresenta um efeito melhor na fase crônica da doença, corroborando outros estudos⁶⁸.

Diferenças na distribuição de peso entre as patas traseiras são consideradas indicadores importantes de desconforto articular, inflamação e dor resultantes da indução de osteoartrite⁹⁶. A distribuição de peso entre as patas é usada como indicador de atividade antinociceptiva, pois

diferenças na distribuição de peso podem indicar a presença de desconforto articular e inflamação causados pela osteoartrite induzida. Os animais tratados com cuminaldeído apresentaram melhora significativa na distribuição de peso na pata afetada em comparação com o grupo salina e o grupo indometacina nos dias 7, 14 e 28 do experimento, com mais de 40% de distribuição de peso na pata afetada. No dia 28, os animais tratados com cuminaldeído exibiram distribuição de peso igual aos animais saudáveis, enquanto os grupos de salina e indometacina ainda apresentavam diferenças significativas na distribuição de peso entre as patas.

A Escala de Expressão Facial em Ratos (Mouse Grimace Scale - MGS) é um método padronizado para quantificar a dor em camundongos com base na observação das expressões faciais. A escala consiste em mudanças específicas nas características faciais, como posição das orelhas e dos olhos, movimento dos bigodes e forma geral do rosto, que se acredita refletirem mudanças no estado subjacente de dor ou desconforto do camundongo. A MGS é usada como uma ferramenta para avaliar a dor associada à osteoartrite em camundongos, bem como para avaliar a eficácia de intervenções para alívio da dor. Essa ferramenta é particularmente útil em pesquisas pré-clínicas, onde é importante avaliar a eficácia de novos tratamentos para alívio da dor antes que sejam testados em humanos.

A MGS é uma ferramenta usada para avaliar a dor em camundongos com osteoartrite e permite quantificar a dor em camundongos com osteoartrite observando mudanças específicas em suas expressões faciais⁶⁰. Essas mudanças refletem alterações subjacentes no estado de dor ou desconforto do camundongo e são pontuadas em uma escala padronizada⁷⁴. A MGS é especialmente útil em pesquisas pré-clínicas para avaliar a eficácia de tratamentos para alívio da dor na osteoartrite em camundongos. Ela avalia objetivamente a dor em camundongos e determina a eficácia de novos tratamentos antes que sejam testados em humanos. O uso da MGS ajuda a melhorar a precisão e confiabilidade da avaliação da dor em camundongos com osteoartrite e garante que esses animais sejam protegidos de sofrimento desnecessário em pesquisas⁹⁸. A MGS demonstra que o cuminaldeído reduziu eficientemente a dor nos animais, pois sua reação foi estatisticamente equivalente à dos animais tratados com indometacina e consideravelmente melhor do que a dos animais tratados com salina após 14 dias de terapia.

O sistema de pontuação de Ahlback é um método utilizado para avaliar a gravidade da osteoartrite (OA) na articulação do quadril. Esse sistema de pontuação é baseado em mudanças radiográficas observadas na articulação do quadril, sendo que pontuações mais altas indicam OA mais grave. Na pesquisa sobre osteoartrite em ratos, o sistema de pontuação de Ahlback é usado para acompanhar a progressão da doença ao longo do tempo. Ao comparar as pontuações antes e após a indução da osteoartrite, os pesquisadores podem avaliar a eficácia de diferentes

tratamentos em retardar ou reverter a progressão da doença⁹⁹. A validação do método pode depender da presença de sinais radiológicos de osteoartrite. Neste estudo subcrônico, todos os grupos de animais apresentaram degeneração articular, estreitamento do espaço articular, esclerose óssea e osteófitos. Análises estatísticas do sistema de pontuação de *Ahlbäck* usado para avaliar imagens de raio-X mostraram uma diferença estatisticamente significativa, indicando que a dose de cuminaldeído utilizada altera a remodelação óssea em comparação com o controle negativo. Além disso, dados radiográficos de patas afetadas por osteoartrite demonstraram que a indometacina e o cuminaldeído produziram melhorias significativas no grau de envolvimento articular.

A cartilagem hialina é um tecido articular crítico no desenvolvimento da osteoartrite. A doença é caracterizada por esclerose do osso subcondral, que se refere ao espessamento e aumento da densidade da camada óssea localizada abaixo da cartilagem em uma articulação. Na osteoartrite, o osso subcondral torna-se mais espesso e denso devido ao aumento da formação óssea, resultando em menor flexibilidade e maior rigidez da articulação. Essas mudanças podem causar dor e limitar o movimento. Além disso, o espessamento do osso subcondral pode levar à formação de esporões ósseos ou osteófitos, que podem agravar ainda mais os sintomas¹⁰⁰. A avaliação histopatológica mostrou que o cuminaldeído resultou em uma melhora significativa na gravidade ou progressão biológica do processo osteoartítico em comparação com a salina, indicando a eficácia potencial do cuminaldeído no tratamento da osteoartrite.

Além disso, a diminuição dos níveis das citocinas IFN- γ e IL-6 observada em animais tratados com cuminaldeído sugere uma redução na neuroinflamação da medula espinhal, o que pode levar a uma diminuição dos sinais de dor e uma melhora na hipersensibilidade e hiperalgia¹⁰¹. O IFN- γ está associado à ativação de células microgliais e sensibilização de nervos. Por outro lado, a IL-6 é uma citocina que promove a maturação e ativação de neutrófilos e macrófagos, bem como a diferenciação e manutenção de linfócitos T citotóxicos e células natural killer¹⁰². Além disso, a IL-6 também ativa astrócitos e microglia na região dorsal da medula espinhal¹⁰³.

Aumento dos níveis de IL-10 no fluido sinovial pode estar associado a níveis mais baixos de IL-6 e IFN- γ no estudo e pode estar relacionado a melhores indicadores clínicos, incluindo uma possível redução na inflamação e aumento na circulação periférica e limiar nociceptivo devido ao tratamento com cuminaldeído. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que suprime citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6. Ela também promove a proliferação de mastócitos e inibe a produção de IFN- γ por células natural killer¹⁰¹.

Os resultados de PCR em tempo real do óleo essencial de *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae) rico em cuminaldeído (48%) mostraram que o óleo essencial inibiu significativamente a expressão de mRNA do óxido nítrico sintase induzível (iNOS), ciclo-oxigenase (COX-2), interleucina-1 (IL-1) e IL-6 em células RAW 264.7 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). Os resultados de Western blotting também demonstraram que o óleo essencial bloqueou a ativação transcricional induzida pelo LPS do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e inibiu a fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e da quinase c-Jun N-terminal (JNK), indicando que este óleo essencial rico em cuminaldeído possui atividade anti-inflamatória¹⁰⁴. O cuminaldeído também demonstrou atividade anti-inflamatória ao diminuir os níveis séricos de TNF- α e IL-1 β em ratos⁶⁸ e inibir 15-LOX¹⁰⁵. Nossos resultados revelam pela primeira vez o potencial inibitório do cuminaldeído na enzima COX, com preferência pela COX-2.

Ao investigar o possível mecanismo da atividade antinociceptiva do cuminaldeído, descobriu-se que a atividade foi revertida pela naloxona, levando à conclusão de que essa molécula funciona como um agonista dos receptores opioides (OR), particularmente do tipo μ ⁶⁸. É amplamente reconhecido que a naloxona é um antagonista competitivo dos OR, sem ação agonista, podendo antagonizar os efeitos adversos dos opioides ou no tratamento de overdose de morfina¹⁰⁶. De acordo com os resultados *in silico*, o cuminaldeído apresentou interações favoráveis com os três receptores opioides utilizados, o que corrobora a literatura experimental anterior. Além disso, observou-se que o cuminaldeído também apresenta interações igualmente favoráveis com a COX-2, o que é uma descoberta inovadora neste estudo.

Para garantir a segurança de uso de um composto é necessário haver um estudo para mostrar os perfis de segurança de qualquer composto / produto que seja considerado benéfico para um organismo vivo. E em seguida é avaliar os constituintes químicos do agente medicinal tradicional. E, por último, é definir as diretrizes para investigar a aplicação do folclore proposta, que é um passo em direção ao desenvolvimento e descoberta de drogas. Assim, toda planta ou produto medicinal é validado, visando a verificação para aceitação pública e conseqüentemente a necessidade de laudos toxicológicos¹⁰⁷.

A avaliação toxicológica é um aspecto importante do desenvolvimento de medicamentos e para a extensão de seus potenciais terapêuticos, pois fornece informações sobre as reações adversas que são potencialmente relevantes para a substância que está sendo avaliada¹⁰⁸. Esses efeitos potenciais podem incluir alterações comportamentais, psicológicas, bioquímicas, morfológicas, neurológicas, metabólicas, teratológicas, mutagênicas e histológicas¹⁰⁹.

Na prática, a substância é administrada por via oral ou, em alguns casos, por via parenteral e, em seguida, observada para as condições acima mencionadas. As abordagens de dose e duração ajudaram a compreender a avaliação da toxicidade, bem como os riscos de exposição^{108,110,111}. Neste estudo a administração oral de cuminaldeído na dose de 50mg/Kg a cada 72 horas durante 27 dias não originou nenhuma variação significativa de massa corpórea e ainda, nos parâmetros hematológicos em relação ao grupo controle e com os outros grupos tratados com salina. Estes resultados corroboram com as predições realizada por Amorim¹¹².

Em relação à toxicidade, o óleo essencial de *Cuminum cyminum* L. (Apiaceae) rico em cuminaldeído não apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra células RAW 264.7 em concentrações de 0,0005% a 0,01%¹⁰⁴. Quando administrado em concentrações intraperitoneais (i.p.) de 12,5 a 200 mg/kg, nenhuma toxicidade aguda foi observada em animais⁶⁸. Durante todo o período de 28 dias do nosso estudo, não foram observadas mortes de animais, indicando que o uso prolongado ou crônico do cuminaldeído não parece causar toxicidade. Essa observação é consistente com descobertas anteriores na literatura.

CONCLUSÕES

O cuminaldeído apresenta uma atividade anti-inflamatória multifatorial, atuando por meio de múltiplas vias. Sua atividade antinociceptiva ocorre por meio de mecanismos centrais e periféricos e modula a resposta imune do processo inflamatório. Como resultado, o cuminaldeído representa um candidato promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos, dadas suas propriedades demonstradas e baixa toxicidade para organismos vertebrados. Pesquisas adicionais voltadas para explorar o pleno potencial terapêutico do cuminaldeído são necessárias.

REFERÊNCIAS

1. Rathmell, J. P., & Fields, H. L. (2015). Dor: fisiopatologia e gestão. In: Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (Eds.), *Princípios de Medicina Interna de Harrison*. McGraw-Hill Education, Nova York, pp. 87–123.
2. Volkow, N. D., & McLellan, A. T. (2016). Abuso de opióides na dor crônica - equívocos e estratégias de mitigação. *N. Engl. J. Med.* 374, 1253–1263. <https://doi.org/10.1056/NEJ-Mra1507771>.
3. Martel-Pelletier, J., Barr, A. J., Cicuttini, F. M., et al. (2016). Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16072.
4. Robinson, W. H., et al. (2016). Low-Grade Inflammation as a Key Mediator of the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Nature Reviews. Rheumatology*, 12(10), 580–592.
5. Tat, S. K. (2010). Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence?. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 24(1), 51-70.
6. Reginster, J. Y. (2014). Cardiac concerns associated with strontium ranelate. *Expert Opinion On Drug Safety*, 13(9), 1209-1213.
7. Neogi, T., & Zhang, Y. (2013). Epidemiology of Osteoarthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 39, 1–19.
8. Silva, M. D. (2014). Estudos comportamentais e farmacológicos com a diacereína no modelo de monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund (efa) em roedores. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.
9. Morais, S. V., Czezko, N. G., Malafaia, O., Ribas, J. M. Filho, Garcia, J. B., Miguel, M. T., Zini, C., & Massignan, A. G. (2016). Osteoarthritis model induced by intra-articular monosodium iodoacetate in rats knee. *Acta Cir Bras*, 31(11), 765-773. doi: 10.1590/S0102-865020160110000010. PMID: 27982265.
10. Olalekan, A. U., Windt, D. A. V., Jordan, J. L., Dziedzic, K. S., Healey, E. L., Peat, G. M., & F. Ne. (2013). Exercise for lower limb osteoarthritis: systematic review incorporating trial sequential analysis and network meta-analysis. *British Medical Journal*, v. 20.
11. Sociedade Brasileira de Reumatologia. (2019). Osteoartrite artrose. Disponível em: www.reumatologia.org.br/doencas/principaisdoencas/osteoartrite-artrose. Acesso em 11 de fevereiro de 2019.
12. Zhang, W., Nuki, G., Moskowitz, R. W., et al. (2010). OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis Cartilage*, 18, 476-499.
13. Bijlsma, J. W., Berenbaum, F., & Lafeber, F. P. (2011). Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*, 377, 2115-2126.
14. Lopes Júnior, O. V., & Inácio, E. A. M. (2013). Uso de glucosamina e condroitina no tratamento da osteoartrose: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 48(4), 300–306. doi:10.1016/j.rbo.2012.09.007.
15. Glyn-Jones, S., Palmer, A. J. R., Agricola, R., et al. (2015). Osteoartrite. *Lancet*, 386, 376–387. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60802-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60802-3).
16. March, L. M., & Bagga, H. (2004). Epidemiology of osteoarthritis in Australia. *Med J Aust*, 180(5), S6-10.
17. Michaud, C. M., McKenn, M. T., Begg, S., et al. (2006). The burden of disease and injury in the United States 1996. *Popul Health Metr*, 4, 11.
18. Losina, E., Walensky, R. P., Kessler, C. L., et al. (2009). Cost-effectiveness of Total Knee Arthroplasty in the United States. *Arch Intern Med*, 169(12), 1113-21.

19. Sharma, L., Kapoor, D., & Issa, S. (2006). Epidemiology of Osteoarthritis: An Update. *Current Opinion in Rheumatology*, 18(2), 147–156.
20. Rosis, R. G. De; Kairalla, M. O. (2010). Osteoartrite: avaliação clínica e epidemiológica de pacientes idosos em instituição de longa permanência. *Rev Bras Clin Med*, 8(2), 101–108.
21. Kawano, M. M., et al. (2015). Assessment of Quality of Life in Patients with Knee Osteoarthritis. *Acta Ortopédica Brasileira*, 23(6), 307–310.
22. Cunha-Miranda, L., F. A., Alves, C., Vicente, V., & Barbosa, S. (2015). Avaliação da magnitude da desvantagem da osteoartrite na vida das pessoas: estudo MOVES. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 55(1), 22-30.
23. Pereira, D., et al. (2011). The Effect of Osteoarthritis Definition on Prevalence and Incidence Estimates: A Systematic Review. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(11), 1270–1285.
24. Brasil. Ministério da Fazenda. Secretaria de Previdência. (2017). Acompanhamento Mensal dos Benefícios Auxílios-Doença Previdenciários Concedidos segundo os Códigos da CID-10 - Janeiro a Dezembro de 2017. Recuperado de http://www.previdencia.gov.br/wpcontent/uploads/2018/03/Auxilio-Doen%C3%A7a-Previdencia-rio_2017_completo_CID.pdf
25. World Health Organization (WHO). (2018). Chronic rheumatic conditions: Osteoarthritis. Disponível em: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>.
26. Man, G. S., & M. G. (2014). Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *Journal of Medicine and Life*, 7(1), 37-41.
27. Dillon, C. F., Rasch, E. K., Gu, Q., & H. R. (2006). Prevalence of knee osteoarthritis in the United States: arthritis data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey 1991-94. *Journal of Rheumatology*, 33(11), 2271-2279.
28. José, F. (2013). Osteoartrite: fisiopatologia e tratamento medicamentoso. *JBM*, 101(2), 47-52.
29. Maksimović, Z., & Samardžić, S. (2018). Herbal Medicinal Products in the Treatment of Osteoarthritis. In *Osteoarthritis Biomarkers and Treatments* (pp. 1–19).
30. Archer, C. W., & Francis-West, P. (2003). The chondrocyte. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, 401–404.
31. Goldring, M. B. (2012). Condrogênese, diferenciação de condrócitos e metabolismo da cartilagem articular na saúde e osteoartrite. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 4, 269–285. <https://doi.org/10.1177/1759720X12448454>.
32. Singh, P., Marcu, K. B., Goldring, M. B., & Otero, M. (2018). Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: on a path to hypertrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. doi:10.1111/nyas.13930.
33. Zhang, W., Ouyang, H., Dass, C. R., et al. (2016). Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Research*, 4:15040.
34. Haseeb, A., & Haqqi, T. M. (2013). Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clinical Immunology*, 146, 185-196.
35. Woodell-May, J. E., & Sommerfeld, S. D. (2020). Role of Inflammation and the Immune System in the Progression of Osteoarthritis. *J Orthop Res*, 38(2), 253-257.
36. Siebuhr, A. S., et al. (2016). Inflammation (or Synovitis)-Driven Osteoarthritis: An Opportunity for Personalizing Prognosis and Treatment? *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 45(2), 87–98.
37. Issa, R. I., & Griffin, T. M. (2012). Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. *Pathobiology of Aging & Age Related Diseases*, 2. <https://doi.org/10.3402/pba.v2i0.17470>. PMID: 22662293; PMCID: PMC3364606.

38. Coimbra, I. B., Pastor, E. H., Greve, J. M. D., Puccinelli, M. L. C., Fuller, R., Cavalcanti, F. S., & Maciel, F. M. B. (2004). Osteoartrite (artrose): tratamento. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 44(6), 450-453.
39. Vincent, K. R., Conrad, B., Fregly, B. J., & V. H. K. (2012). The Pathophysiology of osteoarthritis: a mechanical perspective on the knee joint. *American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation*, 4(5), 1-11.
40. Dieppe, P. A., & Lohmander, L. (2005). Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *The Lancet Journals*, 365, 965-973.
41. Lim, S. H., Hong, B. Y., Oh, J. H., & Lim, J. I. (2015). Relationship between knee alignment and the electromyographic activity of quadriceps muscles in patients with knee osteoarthritis. *Journal of Physical Therapy Science*, 27, 1261-1265.
42. Lee, A. S., et al. (2013). A Current Review of Molecular Mechanisms Regarding Osteoarthritis and Pain. *Gene*, 527(2), 440-447.
43. Nelson, A. E., et al. (2014). A Systematic Review of Recommendations and Guidelines for the Management of Osteoarthritis: The Chronic Osteoarthritis Management Initiative of the U.S. Bone and Joint Initiative. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 43(6), 701-712.
44. O'Neill, T. W., McCabe, P. S., & McBeth, J. (2018). Update on the Epidemiology, Risk Factors and Disease Outcomes of Osteoarthritis. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 32(2), 312-326.
45. Neogi, T., Felson, D., Niu, J., Lynch, J., Nevitt, M., Guermazi, A., et al. (2009). Cartilage loss occurs in the same subregions as subchondral bone attrition: a within-knee subregion-matched approach from the Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum*, 61, 1539-44.
46. Felson, D. T. (2006). Clinical Practice. Osteoarthritis of the Knee. *The New England Journal of Medicine*, 354(8), 841-848.
47. Krasnokutsky, S., Samuels, J., & Abramson, S. B. (2007). Osteoarthritis in 2007. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65(3), 222-228.
48. Loeser, R. F. (2009). Aging and Osteoarthritis: The Role of Chondrocyte Senescence and Aging Changes in the Cartilage Matrix. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17(8), 971-979.
49. Gottschalk, A., & Smith, D. S. (2001). New Concepts in Acute Pain Therapy: Preemptive Analgesia. *American Family Physician*, 63(10), 1979-1984.
50. Woolf, C. J., & Ma, Q. (2007). Nociceptors--Noxious Stimulus Detectors. *Neuron*, 55(3), 353-364.
51. Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2017). *Tratado de Fisiologia Médica*. 13ª Ed. Elsevier.
52. Bingham, B., et al. (2009). The Molecular Basis of Pain and Its Clinical Implications in Rheumatology. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 5(1), 28-37.
53. Nielsen, O. H., et al. (2006). Systematic Review: Coxibs, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs or No Cyclooxygenase Inhibitors in Gastroenterological High-Risk Patients? *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 23(1), 27-33.
54. Hunter, D. J., & Lo, G. H. (2008). The Management of Osteoarthritis: An Overview and Call to Appropriate Conservative Treatment. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 34(3), 689-712.
55. Atiqzaman, M., Karim, M. E., Kopec, J., Wong, H., & Anis, A. H. (2019). Role of Non-steroidal Antiinflammatory Drugs in the Association Between Osteoarthritis and Cardiovascular Diseases: A Longitudinal Study. *Arthritis Rheumatol*, 71(11), 1835-1843.
56. Veronese, N., Stubbs, B., & Solmi, M. (2018). Knee Osteoarthritis and Risk of Hypertension: A Longitudinal Cohort Study. *Rejuvenation Research*, 21(1), 15-21.
57. Zhang, Y., Wang, J., & Liu, X. (2017). Association between hypertension and risk of knee osteoarthritis: A meta-analysis of observational studies. *Medicine (Baltimore)*, 96(32), e7584.

58. Sarmiento-Neto, J. F., do Nascimento, L. G., Felipe, C. F. B., & de Sousa, D. P. (2016). Analgésico potencial dos óleos essenciais. *Molecules*, 21, 20. <https://doi.org/10.3390/molecules21010020>.
59. Aye, M. M., Aung, H. T., Sein, M. M., & Armijos, C. (2019). A Review on the Phytochemistry, Medicinal Properties and Pharmacological Activities of 15 Selected Myanmar Medicinal Plants. *Molecules*, 24(2), 293.
60. Lima, M. V. V., Freire, A. D. O., Sousa, E. L. F., Vale, A. A. M., Lopes, A. J. O., Vasconcelos, C. C., Lima-Aragão, M. V. V., Serra, H. O., Liberio, R. N. M. G., Santos, A. P. S. D. A. D., Silva, G. E. B., Rocha, C. Q. D., Moreira Lima, F. C. V., Cartágenes, M. D. S. D. S., & Garcia, J. B. S. (2019). Therapeutic Use of *Scoparia dulcis* Reduces the Progression of Experimental Osteoarthritis. *Molecules*, 24, 3474. <https://doi.org/10.3390/molecules24193474>.
61. Calado, G. P., et al. (2015). *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces synovial inflammation and pain in experimental osteoarthritis. *PLoS ONE*, 10(11), 5–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141886>.
62. Tabnut. (2019). Tabela de composição química dos alimentos. Disponível em: <http://tabnut.dis.epm.br/alimento/02005/condimento-semente-de-cominho>. Acesso em: 18 julho de 2019.
63. Vieira, J. N. (2016). CANDIDA SPP. Na cavidade oral de indivíduos hospitalizados e não-hospitalizados e ação antifúngica de óleos essenciais sobre isolados de candidíase atrófica crônica. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pelotas.
64. Morshedi, D. F., Aliakbari, A., & Marvian, A. T. (2015). Cuminaldehyde as the Major Component of *Cuminum cyminum*, a Natural Aldehyde with Inhibitory Effect on Alpha-Synuclein Fibrillation and Cytotoxicity. *Journal of Food Science*, 80.
65. Nitoda, T. (2008). Effects of cuminaldehyde on melanoma cells. *Phytother Res*, 22(6), 809-13.
66. Haque, M. R. (2019). Aromatic aldehyde compound cuminaldehyde protects nonalcoholic fatty liver disease in rats feeding high fat diet. *Human and Experimental Toxicology*, 38.
67. Ansari, H. S. (2018). Anti-Obesity Effect of Arq Zeera and Its Main Components Thymol and Cuminaldehyde in High Fat Diet Induced Obese Rats. *Drug Research*, 68.
68. Koohsari, S., et al. (2020). Antinociceptive and antineuropathic effects of cuminaldehyde, the major constituent of *Cuminum cyminum* seeds: Possible mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 255, 112786. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112786>.
69. Fernihough, J., Gentry, C., Malcangio, M., Fox, A., Rediske, J., Pellas, T., Kidd, B., B. S., & W. J. (2004). Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain*, 112(1), 83-93.
70. Silva, A., Andersen, M. L., & T. S. (2008). Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. *Pain*, 140, 446-455.
71. Kalff, K. M., El Mouedden, M., Van Egmond, J., Veening, J., Joosten, L., Scheffer, G. J., Meert, T., & Vissers, K. (2010). Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. *European Journal of Pharmacology*, 641, 108-113.
72. Vivancos, G. G., Verri, W. A. Jr., Cunha, T. M., Schivo, I. R., Parada, C. A., Cunha, F. Q., & S. H. Ferreira. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res*, 37, 391-399.
73. Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M. L., Matsumiya, L., Sorge, R. E., Sotocinal, S. B., Tabaka, J. M., Wong, D., Van Den Maagdenberg, A. M. J. M., Ferrari, M. D., Craig, K. D., & Mogil, J. S. (2010). Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*, 7, 447-449.

74. Sotocinal, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mapplebeck, J. C. S., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J. J., King, O. D., & M. J. S. (2011). The grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*, 7, 55.
75. Matsumiya, C. L., Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wieskopf, J. S., Zaloum, A., & King, O. D. M. J. (2012). Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of Postoperative Analgesics in Laboratory Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(1), 42-49.
76. Miller, A. L., & L. M. C. (2015). The mouse grimace scale: a clinically useful tool? *PLoS One*, 10(9), e0136000.
77. Miller, A. L., & L. M. C. (2016). The effect of handling method on the mouse grimace scale in two strains of laboratory mice. *Laboratory Animals*, 50(4), 305-307.
78. Tuttle, A. H., Molinaro, M. J., Jethwa, J. F., Sotocinal, S. G., Prieto, J. C., Styner, M. A., Mogil, J. S., & Z. M. J. (2018). A deep neural network to assess spontaneous pain from mouse facial expressions. *Mol Pain*, 4, 1-9.
79. Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2001). Anthocyanins and other flavonoids: Natural Products Report, 18, 310-333.
80. Grunau, R. V. E., & Craig, K. D. (1987). Pain expression in neonates: facial action and cry. *Pain*, 28(3), 395-410. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90073-x](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90073-x).
81. Gundogdu, G., Demirkaya Miloglu, F., Gundogdu, K., et al. (2020). Investigation of the efficacy of daidzein in experimental knee osteoarthritis-induced with monosodium iodacetate in rats. *Clinical Rheumatology*, 39, 2399-2408. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-04958-z>.
82. Pritzker, K. P., Gay, S., Jimenez, S. A., et al. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(1), 13-29.
83. Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Glorizova, T. A., et al. (2014). Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the PASS Online Web Resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 50, 444-457. <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>.
84. Dennington, R., et al. (2016). GaussView5. Shawnee Mission, KS: Semichem Inc.
85. Frisch, M. J., et al. (2016). Gaussian 09. Wallingford CT: Gaussian, Inc.
86. Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
87. Morris, G. M., et al. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639-1662. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B).
88. Lopes, A. J. O., et al. (2020). Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Pollen Extract Collected by *Scaptotrigona affinis postica*: in silico, in vitro, and in vivo Studies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(2). Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox9020103>.
89. Pettersen, E. F., et al. (2004). UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
90. Mogil, J. S. (2019). The translatability of pain across species. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 374(1785), 20190286. doi: 10.1098/rstb.2019.0286.
91. Rodrigues, I. A., Azevedo, M. M. B., Chaves, F. C. M., et al. (2014). *Arrabidaea chica* Hexanic Extract Induces Mitochondrion Damage and Peptidase Inhibition on *Leishmania* spp. *Biomed Res Int*, 2014:1-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/985171>.

92. Schuelert, N., & McDougall, J. J. (2009). Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. *Neuroscience Letters*, 465(2), 184-188.
93. Jordt, S. E., Bautista, D. M., Chuang, H. H., et al. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427(6971), 260-265. Recuperado de <http://pesquisa.bvsalud.org/regional/resources/mdl-14712238>.
94. Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., et al. (2009). TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(4), 1273-1278. Recuperado de <http://pesquisa.bvsalud.org/regional/resources/mdl-19144922>.
95. Legrand, C., Merlini, J. M., de Senarclens-Bezençon, C., & Michlig, S. (2020). New natural agonists of the Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) channel. *Scientific Reports*, 10, 11238. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68013-2>.
96. Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J. O., de Jesus Garcia Ataíde, E., Carvalho, K. W. P., de Brito, M. F. F., Rodrigues, M. S., ... & Garcia, J. B. S. (2021). Arrabidaea Chica Verlot fractions reduce MIA-induced osteoarthritis progression in rat knees. *Inflammopharmacology*, 29(3), 735-752. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00803-0>.
97. Bhatia, D., Bejarano, T., & Novo, M. (2013). Current interventions in the management of knee osteoarthritis. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(1), 30. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106561>.
98. Leung, V. S. Y., Benoit-Biancamano, M.-O., & Pang, D. S. J. (2019). Performance of behavioral assays: The rat grimace scale, burrowing activity and a composite behavior score to identify visceral pain in an acute and chronic colitis model. *PAIN Reports*, 4, e718. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000712>.
99. Ahlbäck, S. (1968). Osteoarthrosis of the knee: A radiographic investigation. *Acta Radiologica: Diagnosis*, (Stockholm), Suppl 277, 7-72.
100. Stewart, H. L., & Kawcak, C. E. (2018). The importance of subchondral bone in the pathophysiology of osteoarthritis. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 178. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00178>.
101. Molnar, V., Matišić, V., Kodvanj, I., Bjelica, R., Jeleč, Ž., Hudetz, D., ... & Vidović, D. (2021). Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9208. <https://doi.org/10.3390/ijms22179208>.
102. Scanzello, C. R. (2017). Chemokines and inflammation in osteoarthritis: Insights from patients and animal models. *Journal of Orthopaedic Research*, 35(4), 735-739. <https://doi.org/10.1002/jor.23471>.
103. Kraychete, D. C., Calasans, M. T. de A., & Valente, C. M. L. (2006). Citocinas Pró-Inflamatórias e Dor. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 46, 199-206. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042006000300007>.
104. Wei, J., et al. (2015). Anti-Inflammatory Effects of Cumin Essential Oil by Blocking JNK, ERK, and NF-κB Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/474509>.
105. Tomy, M. J., et al. (2014). Cuminaldehyde as a Lipxygenase Inhibitor: In Vitro and In Silico Validation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1), 388-397. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1066-0>.
106. Morais, B. S. de, et al. (2008). Administração inadvertida de 4 mg de morfina por via subaracnóidea: relato de caso. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 58(2). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-70942008000200008>.
107. Kale, O. E., & Awodele, O. (2016). Safety evaluation of Bon-santé cleanser® polyherbal in male Wistar rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 188.

108. Jordan, S. A., Cunningham, D. G., & Marles, R. J. (2010). Avaliação de medicamentos fitoterápicos: desafios e oportunidades para aumentar a base de conhecimento para avaliação de segurança. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(2), 198-216.
109. Krewski, D., Acosta, D., Jr., Andersen, M., Anderson, H., Bailar, J. C., III, Boekelheide, K. (2010). Teste de toxicidade no século 21: uma visão e uma estratégia. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 13(2-4), 51-138.
110. Awodele, O., Oreagba, I. A., Odoma, S., Da Silva, J. A. T., & Osunkalu, V. O. (2012). Toxicological evaluation of the aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2), 330-336.
111. Buenz, E. J., Schnepple, D. J., Bauer, B. A., Elkin, P. L., Riddle, J. M., & Motley, T. J. (2004). Techniques: bioprospecting historical herbal texts by hunting for new leads in old tomes. *Trends in Pharmacological Sciences*.
112. Amorim, P. S., Pestana, R., Mendes, J. F., & Ítallo, S. (2017). Predição do Metabolismo do Candidato a Fármaco Cinamaldeído: Uma abordagem in sílico. *Revista Ceuma Perspectivas*, 30. ISSN Eletrônico: 2525-5576 111.

ANEXO – Certificado Comitê de Ética

	UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA CIAEP: 01.0341.2014	
<small>Comissão de Ética no Uso de Animais</small>		
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que a proposta intitulada: "AÇÃO DO CUMINALDEÍDO EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATOS", Processo nº 23115.031386/2019-28, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes e Prof. Dr. João Batista Santos Garcia, 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, na reunião realizada em 20/09/2019.</p>		
<p>We certify that the proposal: "CUMINALDEIDE ACTION IN EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOARTRITE IN RATS", Processo nº 23115.031386/2019-28, under the responsibility of Prof. Dr. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes and Prof. Dr. João Batista Santos Garcia, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was APPROVED by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 09/20/2019.</p>		
Finalidade da Proposta: Pesquisa Área: Ciências da Saúde/Bioprospecção		
Vigência da Proposta: 01/08/2020 a 31/08/2024.		
Comissão de Ética no Uso de Animais		
Origem:	Biotério Central da UFMA	Amostra
Espécie:	Ratos <i>(Rattus norvegicus)</i>	Sexo: Machos Idade: 4-6 semanas 24 Peso: 250-350 g
Linhagem/Raça:	Wistar	
Local do experimento: Biotério setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS/UFMA e Laboratório Experimental em Estudo da Dor - LEED/CCBS/UFMA.		
São Luís, 03 de dezembro de 2019.		
		
Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA		