



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2013/2014

Tiago Miguel Dias Aguiar
Efeito antinociceptivo do Resveratrol
num modelo experimental de
osteoartrose

março, 2014

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Tiago Miguel Dias Aguiar
Efeito antinociceptivo do Resveratrol
num modelo experimental de
osteoartrose

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Neurociências

Trabalho efetuado sob a Orientação de:

Doutora Fani Lourença Moreira Neto

E sob a Coorientação de:

Dra. Joana Maria de Pinho Ferreira Gomes

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:

Acta Reumatológica Portuguesa

março, 2014

FMUP

Eu, Inago Miguel Dias Aguiar, abaixo assinado,
nº mecanográfico 080801232, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em
Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta
integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão,
assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as
frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou
redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/3/2019

Assinatura conforme cartão de identificação:

Inago Miguel Dias Aguiar

NOME

Tiago Miguel Dias Aguiar

CARTÃO DE CIDADÃO OU PASSAPORTE (se estrangeiro)

E-MAIL

TELEFONE OU TELEMÓVEL

13783158

tiagomdiasaguiar@gmail.com

916393680

NÚMERO DE ESTUDANTE

DATA DE CONCLUSÃO

080801232

2014

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Neurociências

TÍTULO DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA (riscar o que não interessa)

Efeito antinociceptivo do Resveratrol num modelo experimental de osteoartrose

ORIENTADOR

Doutora Fani Lourença Moreira Neto

COORIENTADOR (se aplicável)

Doutora Joana Maria de Pinho Ferreira Gomes

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Monografia (riscar o que não interessa) para efeitos de investigação e de divulgação pedagógica, em programas e projectos coordenados pela FMUP.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20/3/2014

Assinatura conforme cartão de identificação:

Tiago Miguel Dias Aguiar

Efeito antinociceptivo do Resveratrol num modelo experimental de osteoartrose

Antinociceptive effect of Resveratrol in an experimental model of osteoarthritis

Aguiar^{1,2,3}, T., Adães^{1,2}, S., Nascimento^{1,2}, D., Ferreira-Gomes^{1,2}, J., Neto^{1,2}, F.L.

¹Departamento de Biologia Experimental, Centro de Investigação Médica (CIM), Faculdade de Medicina do Porto, Universidade do Porto, Portugal

²Morphophysiology of the Somatosensory System Group, Instituto de Biologia Molecular e Celular (IBMC), Porto, Portugal

³MIMED, Faculdade de Medicina do Porto, Universidade do Porto, Portugal

Autor para correspondência:

Fani Lourença Moreira Neto

Departamento de Biologia Experimental, Centro de Investigação Médica (CIM) Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200 – 319, Porto, Portugal;

Telephone: 00 351 220426769

Fax: 00 351 5513655

E-mail: fanineto@med.up.pt

Título curto para rodapé: Resveratrol na dor osteoartrítica

Resumo

Objetivos: Avaliar os efeitos da administração sistêmica diária de Resveratrol no comportamento nociceptivo e na melhoria dos parâmetros histopatológicos associados ao desenvolvimento de osteoartrose.

Métodos: A osteoartrose foi induzida em ratos machos adultos pela injeção de mono-iodoacetato na articulação do joelho. Ao dia 14 foi iniciado o tratamento com duas administrações diárias de Resveratrol (10 mg/Kg, intraperitoneal), repetidas durante duas semanas. O grupo de animais osteoartríticos controle recebeu injeção idêntica de veículo. Os animais estiveram uma semana sem tratamento e foram depois sacrificados (aos 35 dias) para disseção das articulações osteoartríticas do joelho. O comportamento nociceptivo induzido pelo movimento, característico da osteoartrose, foi avaliado aos dias 0, 7, 14, 21, 28 e 35 de osteoartrose, através dos testes do Knee-Bend e do CatWalk. O possível efeito benéfico do Resveratrol na cartilagem foi avaliado pela análise das alterações histopatológicas em cortes das articulações do joelho afetadas corados com Safranina-O e Fast Green. Foram analisados 3 parâmetros: Largura da área de Perda da Matriz Cartilagínea, Razão da Profundidade Zonal e o Grau de Degeneração da Cartilagem.

Resultados: O Resveratrol associou-se a uma melhoria do comportamento nociceptivo, durante o período de tratamento, em ambos os testes comportamentais. Esta melhoria foi estatisticamente significativa para o teste do Knee-Bend quando comparada com os resultados obtidos antes do início do tratamento, no mesmo grupo experimental. A nível histológico, o Resveratrol associou-se também a melhores resultados, tendo sido verificadas reduções estatisticamente significativas nos três parâmetros histopatológicos analisados nos joelhos dos animais que receberam Resveratrol, comparativamente com os ratos osteoartríticos controle.

Conclusão: O Resveratrol produz uma atenuação do comportamento nociceptivo associado ao movimento da articulação afetada nos animais osteoartríticos, bem como uma melhoria dos parâmetros histopatológicos na cartilagem. Estes dados corroboram outros estudos que evidenciam propriedades condroprotetoras para o Resveratrol, as quais se correlacionam com uma atenuação do desenvolvimento do processo fisiopatológico característico da osteoartrose. Assim, o Resveratrol pode representar uma alternativa terapêutica que permita o tratamento mais eficaz da osteoartrose, comparativamente com os métodos atuais, dada a sua capacidade para atuar quer ao nível da sintomatologia quer ao nível dos mecanismos que desencadeiam a degeneração da articulação.

Palavras-chave:

Osteoartrose, Resveratrol, dor, histopatologia, articulação do joelho, teste do Knee-Bend, teste do CatWalk

Abstract

Objectives: To evaluate the effects of a daily systemic administration of Resveratrol in the nociceptive behaviour and in the improvement of histopathological parameters associated to the development of osteoarthritis.

Methods: Osteoarthritis was induced in male adult rats by mono-iodoacetate injection in the knee joint. The treatment with two daily injections of Resveratrol started at day 14(10 mg/Kg, intraperitoneal) and was repeated during two weeks. The group of control osteoarthritic animals received similar injections of vehicle. The animals rested for one week without any treatment and were sacrificed afterwards (at day 35) for dissection of the osteoarthritic knee joints. The nociceptive behaviour was evaluated at days 0, 7, 14, 21, 28 and 35 of disease, by the Knee-Bend and CatWalk tests. The possible beneficial effect of Resveratrol in the cartilage was evaluated through an analysis of the histopathological changes in sections of the affected knee joint stained with Safranin-O and Fast Green. Three parameters were evaluated: Cartilage matrix loss width, Zonal depth ratio of lesions and Cartilage degeneration score.

Results: Resveratrol was associated with an improvement of the nociceptive behaviour, during the period when the animals received treatment, in both behavioural tests. This improvement was statistically significant for the Knee-Bend test when compared with data obtained before starting treatment, within the same experimental group. At a histological level, Resveratrol was also associated with better results, with statistically significant reductions observed for the three histopathological parameters analysed in the knees of the animals receiving Resveratrol, in comparison with control osteoarthritic rats.

Conclusion: Resveratrol produces not only an attenuation of the nociceptive behaviour associated with the movement of the affected joint in osteoarthritic animals, but also an improvement of the cartilage histopathological parameters. These data corroborate other studies evidencing chondroprotector properties for Resveratrol, which are correlated with an attenuation of the development of the physiopathologic process characteristic of osteoarthritis. Therefore, Resveratrol may represent a therapeutic alternative allowing a more effective treatment of osteoarthritis, comparatively with the present therapies, given its ability to act both at the symptomatology level and at the level of the mechanisms leading to articular degeneration.

Key Words:

Osteoarthritis, Resveratrol, pain, histopathology, knee joint, Knee-Bend test, CatWalk test

1. Introdução

A osteoartrose (OA) afeta diferentes estruturas da articulação levando à degenerescência cartilaginosa e à dor, sendo este o principal motivo que leva os doentes a recorrerem ao médico. Cerca de 80 a 90% da população com mais de 65 anos de ambos os sexos apresenta alterações osteoartrosicas que acarretam importantes consequências socioeconómicas na vida dos doentes e familiares ^{1,2}.

Fisiopatologicamente a OA divide-se em duas fases. Inicialmente verifica-se um aumento da atividade biossintética onde os condrócitos são estimulados a produzir matriz extracelular por ação de diversas citocinas anabólicas. Posteriormente ocorre uma fase destrutiva na qual intervêm diversas citocinas, que levam a uma diminuição da matriz, quer por provocarem aumento da sua degradação através das metaloproteinases, quer por diminuírem a sua síntese. A perda do equilíbrio entre estas duas fases origina modificações estruturais que levam à degeneração articular com perda funcional ^{3,4}.

Para compensar a perda de função desenvolvem-se na articulação um conjunto de respostas adaptativas desadequadas, que levam ao aparecimento da sintomatologia associada a OA, destacando-se a dor que surge devido à ativação de recetores nociceptivos nos diferentes componentes articulares. A existência de um estímulo nociceptivo constante e de um ambiente inflamatório intenso nas estruturas lesadas promovem alterações metabólicas, neuroquímicas e estruturais ao nível dos sistemas nervosos periférico e central (SNC) ^{2,5-8}. Estas alterações traduzem-se posteriormente numa hiperexcitabilidade das vias aferentes nociceptivas perpetuando e exacerbando a OA e a dor associada e eventualmente provocando alodínia e hiperalgesia.

Atualmente, o tratamento mais radical para a OA passa pela artroplastia total. Contudo, esta não garante uma total eficácia na eliminação da dor pois é impossível garantir uma total reversão das alterações fisiopatológicas ocorridas, nomeadamente a nível do SNC ². Assim, considera-se que a OA não tem cura, pelo que a terapêutica assenta essencialmente no controlo da dor, com vista à melhoria da qualidade de vida dos doentes. À medida que se vão conhecendo melhor os mecanismos da OA, abrem-se novas perspectivas para a utilização de fármacos que possam atuar não apenas ao nível da dor mas também na cascata de eventos que desencadeiam a doença, impedindo a sua progressão ou provocando a sua reversão. Neste contexto surge o Resveratrol, um polifenol natural encontrado numa grande variedade de frutos, nomeadamente nas uvas pretas e amendoins.

O Resveratrol tem sido estudado no contexto de diversas patologias, pois possui propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias, antioxidantes, anticarcinogénicas e neuroprotectoras ⁹⁻¹¹. No âmbito da OA, diversos estudos têm avaliado um possível efeito anti-osteoartrosico, como resultado das suas capacidades anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e antioxidantes ¹². Existem evidências de que o Resveratrol funciona como um protetor dos tecidos cartilaginosa, modulando o funcionamento dos condrócitos ^{13,14}. Assim, existe a possibilidade deste poder representar uma alternativa eficaz no tratamento da OA, atuando diretamente nos processos que a desencadeiam e não apenas minimizando a sua sintomatologia. Apesar de um possível efeito benéfico do Resveratrol na cartilagem, ignora-se ainda se este se refletirá numa melhoria da dor associada à OA, já que a dor induz alterações fisiopatológicas no sistema nervoso que podem ser total ou parcialmente irreversíveis. Assim, este trabalho teve como principal objetivo avaliar os efeitos da

administração sistémica diária de Resveratrol no comportamento nociceptivo associado ao desenvolvimento de OA. Para esse intuito utilizámos um modelo experimental de OA amplamente usado em estudos de dor associada à osteoartrose, induzido em ratos pela injeção de mono-iodoacetato (MIA) na articulação do joelho, e avaliamos a nocicepção induzida pelo movimento, característica da OA, através dos testes do Knee-Bend e do CatWalk, dois testes comportamentais previamente validados por nós ¹⁵. Para avaliar o efeito benéfico diretamente na articulação afetada, foi feita uma análise das alterações histopatológicas observadas em cortes das articulações do joelho de animais OA tratados com Resveratrol.

2. Métodos:

2.1 Animais

Foram usados 12 ratos machos, adultos Wistar Han (Charles River, França) pesando entre 250 e 300 g no início das experiências. Os animais foram mantidos em gaiolas do tipo III (3 ratos por gaiola) com comida e água *ad libitum* durante o decurso das experiências, numa sala (Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto) com temperatura (22°C) e humidade constantes e iluminação controlada (ciclos alternados de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo da dor experimental em animais conscientes¹⁶, bem como com as diretrizes 2010/63/EU da UE para experimentação animal, tendo sido tomadas todas as medidas para minimizar o desconforto dos animais.

2.2. Indução da osteoartrite

A indução da osteoartrose experimental (dia 0) foi feita pela injeção intra-articular de 2 mg de monoiodoacetato (MIA, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) dissolvidos em soro fisiológico, após breve anestesia com isoflurano, como descrito previamente{Adaes, 2014 #44}. A injeção foi administrada através do ligamento rotuliano, no espaço intra-articular do joelho esquerdo.

Para todos os ratos, foi analisada a nocicepção induzida pelo movimento, com os testes comportamentais do Knee-Bend e do CatWalk, para avaliação do normal desenvolvimento da patologia, como descrito adiante (Ver 2.4).

2.3 Tratamento com Resveratrol

Catorze dias após a indução da OA, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=6 por grupo). Num grupo foi administrada uma injeção intraperitoneal de 10

mg/Kg de uma solução de 5 mg/mL de Resveratrol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (grupo OA-Resveratrol), duas vezes por dia (manhã e fim da tarde, sempre à mesma hora), durante catorze dias. O outro grupo de animais foi tratado de forma idêntica, durante o mesmo período, com um volume igual de veículo do Resveratrol (solução de 10 % de DMSO em soro fisiológico; grupo OA-Veículo). Uma semana após o fim do tratamento os animais foram sacrificados por perfusão transcardíaca (aos 35 dias após injeção de MIA). Durante todo o período foram monitorizados o estado de saúde e comportamento normal dos animais com atenção para eventuais ganhos ou perdas de peso significativas, sinais de desidratação e estresse, e outras alterações comportamentais.

2.4 Avaliação do comportamento nociceptivo

A nociceção induzida pelo movimento foi avaliada em todos os animais pelos testes CatWalk e Knee-Bend, já validados e descritos previamente em animais com OA ¹⁵. Os testes de CatWalk e Knee-Bend foram realizados previamente à injeção intra-articular com MIA (dia 0), para determinar os valores basais de nociceção, e posteriormente nos dias 7 e 14 (antes de iniciar tratamento com Resveratrol ou com veículo, para monitorizar o desenvolvimento e progressão da OA), 21 e 28 (uma e duas semanas após tratamento com Resveratrol ou veículo, respetivamente) e 35 (uma semana após interromper o tratamento com Resveratrol ou veículo) após a injeção com MIA. As avaliações do comportamento foram realizadas sem conhecimento do grupo experimental em estudo por parte do investigador e sempre pelo mesmo observador, para minimizar a variabilidade. O teste CatWalk foi realizado sempre antes do teste Knee-Bend para minimizar o efeito que a manipulação da articulação afetada poderá ter sobre a locomoção do animal.

O teste Knee-Bend consiste em aplicar no joelho afetado 5 movimentos de extensão e 5 movimentos de flexão, sendo atribuído um valor para a reação do animal a cada movimento, tendo em conta a maior ou menor amplitude do movimento e o tipo de resposta (fuga ou vocalização), como descrito ¹⁵. A soma de todos os valores, com um máximo de 20, indica a pontuação do Knee-Bend e é uma indicação da nociceção em resposta ao movimento da articulação afetada.

Para o teste CatWalk, os animais são colocados sobre uma plataforma de vidro iluminada, de maneira a que nos locais de contacto das patas com a plataforma é refletido um sinal luminoso de área e intensidade proporcionais à área de contacto e à pressão exercida pela pata. A plataforma encontra-se monitorizada com uma câmara de vídeo colocada sob si e conectada a um computador equipado com um programa de aquisição de imagem (Ulead Video Studio, USA). Para cada rato, em cada avaliação, são escolhidos de forma aleatória 6 fragmentos dos vídeos. Em 3 deles o animal encontra-se em movimento e nos restantes 3 em repouso. O número e a intensidade dos pixéis que se encontram acima de um determinado limite são quantificados usando o programa Image J1.37 (disponível em www.tucows.com/preview/510562), para comparação entre ambas as patas. A força exercida sobre cada pata traseira é obtida através da fórmula intensidade total = área do sinal luminoso refletido (número de pixéis) x intensidade luminosa média de cada pixel. Os resultados são expressos como percentagem da força total aplicada pela pata ipsilateral à

injeção de MIA (pata esquerda) em relação à força total aplicada por ambas as patas traseiras.

2.5 Processamento histológico das articulações

No dia 35 de OA, após avaliação comportamental, os animais foram anestesiados com pentobarbital (Eutasil; 100 mg/Kg, i.p., em solução salina 0,9 %) e perfundidos com Tyrode's seguido de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2¹⁵. Os joelhos foram dissecados, pós-fixados em paraformaldeído 4% (72 horas) e descalcificados durante 8 horas como descrito¹⁵. Posteriormente os joelhos foram lavados em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 e armazenados no mínimo durante 24 horas, a 4°C, em sacarose a 30%, até serem cortados num criostato Microm HM 560 (Microm International, Alemanha). As articulações foram depois cortadas pelo meio ao longo do ligamento colateral medial, num plano frontal, e de cada metade foram feitas 12 secções frontais com 10 µm de espessura e distando 200 µm entre elas¹⁷. As secções da articulação foram coradas com Fast Green e Safranina-O^{15,17}. As lâminas foram montadas com Eukitt (Kindler, Alemanha) e foi captada uma imagem de cada uma das três secções mais severamente afetadas na zona do prato tibial medial (PTM), usando o microscópio Axioskop-40 equipado com uma câmara digital AxioCam-MRc5 (Carl Zeiss MicroImaging).

2.6 Análise histopatológica das articulações

Com recurso ao programa Image J1.37 (disponível em www.tucows.com/preview/510562), numa imagem selecionada para cada animal foram avaliados 3 parâmetros relativamente à cartilagem da hemi-câmara articular medial, segundo critérios definidos pela *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) para avaliação e pontuação das alterações histopatológicas osteoartíticas em modelos em rato¹⁸. Foi avaliada a Largura da área de Perda da Matriz Cartilagínea (LPMC), com medições efetuadas a nível superficial (0 % de profundidade, correspondendo ao nível superior da cartilagem intacta), na zona média (50 % da profundidade) e ao nível da base (100% de profundidade) na estrutura cartilagínea. Apenas as áreas de perda completa da matriz cartilagínea foram medidas e os resultados foram apresentados para cada nível sob a forma da razão entre a largura de matriz perdida nesse nível sobre a largura total do prato tibial medial (PTM). O segundo parâmetro avaliado foi a Razão da Profundidade Zonal (RPZ) das lesões. Para tal o PTM foi dividido em 3 zonas (medial, central, e lateral) de forma a avaliar a patologia de diferentes áreas de carga na articulação. No ponto médio de cada zona foi medida a profundidade da zona degenerada e a espessura total da cartilagem articular. O resultado foi apresentado sobre a forma de uma razão entre a profundidade da área degenerada e a espessura total da cartilagem. Por fim, foi analisado o Grau de Degeneração da Cartilagem (GDC) que avalia a patologia geral da cartilagem articular através da atribuição de uma pontuação que tem como critério principal a perda de condrócitos. Para a zona avaliada no parâmetro anterior foi feita uma reconstrução virtual da cartilagem e mediram-se a área da cartilagem degenerada e a área da cartilagem intacta (correspondente à área de cartilagem previamente à indução da OA). À razão obtida entre a área degenerada e a área intacta foi posteriormente atribuída uma pontuação de acordo com a escala: 0- Razão <5%, sem degeneração; 1- Razão compreendida entre 5 a 10%,

degeneração mínima; 2- Razão compreendida entre 11 a 25%, degeneração ligeira; 3- Razão compreendida entre 26 a 50%, degeneração moderada; 4- Razão compreendida entre 51 a 75%, degeneração marcada; 5- Razão > 75%, degeneração severa.

2.7 Análise Estatística

Todos os valores estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Para os valores da pontuação do teste do Knee-Bend e da percentagem da força total aplicada pela pata ipsilateral em relação à força total aplicada pelas duas patas, obtida pelo teste CatWalk, foi feita uma análise de variância de uma via (ANOVA de uma via) seguida do teste post-hoc Newman-Keuls de comparações múltiplas, para comparação, dentro do mesmo grupo experimental, dos tempos 21, 28 (durante o tratamento) e 35 (final do tratamento) dias de OA com o tempo de OA imediatamente antes do início do tratamento (14 dias). Para a análise estatística da pontuação dada às alterações histopatológicas foi usado o teste Mann-Whitney para comparação dos valores obtidos entre os dois grupos experimentais

3. Resultados:

3.1 Comportamento nociceptivo

Antes do tratamento com Resveratrol ou com veículo, ambos os grupos de animais injetados com MIA evidenciaram comportamentos indicativos de dor associada ao movimento da articulação osteoartrítica quando esta foi avaliada através dos testes Knee-Bend e Catwalk. Assim, a partir do dia 0 até ao dia 14 após injeção com MIA, verificou-se um aumento da pontuação no teste Knee-Bend, semelhante em ambos os grupos, e com um máximo de $8,8 \pm 0,8$ para o grupo OA-Veículo e de $8,4 \pm 1$ para o grupo OA-Resveratrol, ao dia 7, com posterior estabilização até ao dia 14 ($6,8 \pm 1,2$ para o grupo OA-Veículo e $7,8 \pm 0,8$ para o grupo OA-Resveratrol; Fig. 1A). No teste CatWalk (Fig. 1B), durante o mesmo período, verificaram-se também respostas semelhantes em ambos os grupos com uma diminuição da percentagem de carga aplicada sobre a pata ipsilateral à lesão, com valores mínimos ao dia 7 de $36,4\% \pm 2,1\%$ para o grupo OA-Veículo e de $32,7\% \pm 2,5\%$ para o grupo OA-Resveratrol, com posterior estabilização dos valores no dia 14 ($39,7\% \pm 1,9\%$ e $37,8\% \pm 3,6\%$ para os grupos OA-Veículo e OA-Resveratrol, respetivamente). Os resultados comprovaram que a OA foi induzida com sucesso havendo o desenvolvimento da sintomatologia nociceptiva associada.

Nos dias 21 e 28 de OA (respetivamente, final das primeira e segunda semana de injeções), observaram-se claras melhorias em ambos os testes no grupo OA-Resveratrol comparativamente com o grupo OA-Veículo. No teste Knee-Bend, verificou-se uma diminuição progressiva da pontuação no grupo OA-Resveratrol. Esta redução foi estatisticamente significativa, quando comparada com o obtido no dia 14, atingindo valores

de $4,7 \pm 1,2$ ($p < 0,01$) no dia 21 e $3,3 \pm 1,0$ ($p < 0,001$) no 28º dia, reveladores da diminuição do comportamento nociceptivo. Em contraste, no grupo OA-Veículo, verificou-se uma manutenção da pontuação do teste, tendo sido registados valores semelhantes aos anteriores ao tratamento (dia 14), com uma pontuação mínima de $7,1 \pm 1,1$, no dia 21. No teste CatWalk os resultados foram semelhantes aos do teste Knee-Bend, embora as diferenças não tenham atingido significância estatística quando comparados com o período anterior ao tratamento. Assim, no grupo OA-Resveratrol, as duas semanas de tratamento induziram uma melhoria gradual na nocicepção, com valores crescentes da pressão exercida sobre a pata ipsilateral durante a locomoção nos dias 21 e 28 (respetivamente $44,6\% \pm 3,4\%$ e $44,5\% \pm 1,8\%$). No grupo OA-Veículo, as medições efetuadas nestes dias não divergiram significativamente do registado no dia 14, tendo-se mantido constantes com valores mínimos de $37,7\% \pm 2,0\%$, no dia 28.

Uma semana após o final do tratamento (dia 35), ambos os testes demonstraram um agravamento do comportamento nociceptivo do grupo OA-Resveratrol, tendo sido atenuadas as melhorias que haviam sido registadas durante as semanas de tratamento. No teste Knee-Bend, houve aumento da pontuação no grupo OA-Resveratrol ($5,0 \pm 1,3$), e apesar da resposta à dor causada pelo movimento da articulação continuar a ser significativamente menos intensa do que nas primeiras semanas após a injeção de MIA ($p < 0,01$, comparativamente ao dia 14), esta aproximou-se da verificada no grupo OA-Veículo, que manteve uma pontuação ($6,9 \pm 0,6$) semelhante à registada anteriormente. No teste CatWalk, verificou-se também que com o término do tratamento ocorreu uma regressão da melhoria do grupo OA-Resveratrol, com um valor de pressão da pata ipsilateral no dia 35 ($41,4\% \pm 1,5\%$) inferior aos registados nos dias 21 e 28, e praticamente sobreponível ao medido antes do início da administração de Resveratrol (dia 14). No grupo OA-Veículo, o valor registado ao dia 35 ($39,9\% \pm 1,6\%$) não foi estatisticamente diferente dos obtidos nos dias anteriores.

3.2. Análise histopatológica

O tratamento com Resveratrol promoveu uma melhoria notória na histologia da cartilagem da articulação do joelho afetada pela osteoartrose (Figura 2). Em cada um dos três critérios usados observou-se uma diminuição significativa do grau de degeneração da cartilagem no grupo OA-Resveratrol comparativamente ao grupo OA-Veículo (Figura 3).

Relativamente à LPMC, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa da largura de degeneração cartilágnea no grupo OA-Resveratrol comparativamente ao grupo OA-Veículo, nas duas profundidades onde se verificou perda de matriz, a 0 e a 50% de profundidade. A perda de matriz cartilágnea à profundidade de 100% foi de 0% em ambos os grupos experimentais, indicando que a degeneração da cartilagem não alcançou o osso em nenhum animal com 35 dias de OA (dados não apresentados). A 0% de profundidade a extensão da degeneração da matriz cartilágnea ocorreu em $78\% \pm 1,6\%$ da largura total no grupo OA-Veículo, enquanto no grupo OA-Resveratrol este valor foi de $71,5\% \pm 2,1\%$ ($p < 0,05$) (Figura 3A). A 50% de profundidade da matriz, mais uma vez a percentagem de largura cartilágnea degenerada foi significativamente superior no grupo OA-Veículo, com $55,1\% \pm 0,9\%$ comparativamente com os $31,3\% \pm 3,45\%$ ($p < 0,01$) do grupo OA-Resveratrol (Figura 3A).

Os valores obtidos para a RPZ foram semelhantes para as três zonas de carga avaliadas, com uma diminuição estatisticamente significativa da espessura total da matriz cartilágnea atingida pelas lesões, no grupo OA-Resveratrol (Z1- 45,1% ± 4,4%; Z2- 45,6% ± 1,8%; Z3- 47,2% ± 3,2%; p <0,01 para todas as zonas) comparativamente com grupo OA-Veículo (Z1- 67,% ± 2,1%; Z2- 70,7% ± 2,2%; Z3- 68,3% ± 1,9%) (Figura 3B).

Por fim, a pontuação obtida no GDC, foi também significativamente inferior no grupo OA-Resveratrol nas três zonas avaliadas (Z1- 3,2 ± 0,2; Z2- 3,4 ± 0,11; Z3- 3,3 ± 0,2; p <0,01 para Z1 e Z2 e p <0,05 para Z3) comparativamente ao grupo OA-Veículo (Z1- 4,2 ± 0,1; Z2- 4,3 ± 0,1; Z3- 4,1 ± 0,1) (Figura 3C), indicativo de uma menor degeneração da cartilagem nos animais tratados com Resveratrol.

4. Discussão:

A administração de Resveratrol induziu uma melhoria do comportamento nociceptivo avaliada pelos testes Knee Bend e CatWalk. Estes dados comportamentais foram corroborados pela avaliação histopatológica dos joelhos osteoartrosicos, tendo-se registado melhorias significativas no grupo tratado com Resveratrol comparativamente ao grupo controlo, nos 3 parâmetros avaliados. Estes dados evidenciam que a administração sistémica repetida de Resveratrol tem um efeito benéfico, protegendo a articulação de uma degenerescência na cartilagem, e atuando na sintomatologia de dor associada à osteoartrose.

A avaliação do comportamento nociceptivo até aos 14 dias após injeção do MIA permitiu aferir se a dor na osteoartrose se desenvolvia da forma esperada, sendo que em todos os animais foi notório um comportamento indicativo da existência de dor associada ao movimento e carga sobre a articulação afetada, quando analisado pelos testes Knee-Bend e CatWalk. Estes testes foram já validados neste modelo de osteoartrose como sendo os mais apropriados para a avaliar a dor dependente do movimento articular, e não a dor referida avaliada com outros testes nociceptivos¹⁵. Os dados de comportamento obtidos durante este período de instalação e desenvolvimento da patologia estão de acordo com a bibliografia, indicando que a OA foi induzida convenientemente¹⁵. Durante o período de tratamento, ocorreu uma diminuição dos comportamentos indicativos de dor associada ao movimento nos animais que receberam Resveratrol, sugerindo uma melhoria significativa da dor. No entanto, o efeito benéfico do Resveratrol foi mais acentuado no teste Knee-Bend comparativamente ao CatWalk, o que pode ser devido ao facto de os animais poderem adotar durante a marcha posturas que lhes minimizem a dor. Desta forma, no teste CatWalk o estímulo doloroso não é tão acentuado pelo que é também de esperar que o efeito antinociceptivo não seja tão evidente como no teste Knee-Bend.

A análise histopatológica dos joelhos osteoartrosicos permitiu apurar até que ponto a administração sistémica do Resveratrol, num período tão curto, poderia interferir na progressão da degenerescência cartilágnea já iniciada ao longo das duas primeiras semanas após indução da OA. Foram observadas melhorias significativas do grau de degeneração da cartilagem da articulação afetada, quando avaliado pelos três parâmetros descritos, comparativamente aos ratos osteoartrosicos controlo. Existiam já algumas evidências de que isto poderia acontecer, nomeadamente em estudos em coelho onde se

usaram ou o modelo cirúrgico de corte dos ligamentos cruzados para induzir OA ¹⁹ ou a injeção de lipopolissacarídeo para induzir artrite inflamatória ²⁰. Em ambos, o Resveratrol foi administrado durante duas semanas, verificando-se melhorias na cartilagem. Nestes, o tratamento foi feito por injeção intra-articular do joelho afetado ¹⁹, e portanto levantava-se a questão de o mesmo efeito se poder observar, quando a via de tratamento é sistêmica. Em termos de possibilidade de translação clínica este é um assunto pertinente visto que as administrações sistêmicas são mais facilmente toleradas e aceites pelos doentes do que injeções intra-articulares. Em termos moleculares, o Resveratrol exhibe propriedades condroprotectoras sendo capaz de inibir a apoptose dos condrócitos, nomeadamente quando esta ocorre num ambiente inflamatório mediado pela IL-1 β ^{13, 21-26}. Este efeito anti-apoptótico ocorre através de vários mecanismos, nomeadamente pela inibição de cascatas que levam à síntese e atividade de moléculas pró-apoptóticas ^{22-24, 26}. Como antioxidante, o Resveratrol diminui a produção de espécies reativas de oxigénio e neutraliza-as, o que também se associa a uma diminuição da apoptose ^{9, 22, 27}. As propriedades anti-inflamatórias do Resveratrol contribuem também para o seu efeito condroprotetor. Através da ativação de sirtuínas, o Resveratrol é capaz de inibir o factor nuclear kappa b (NF-KB) bem como o activador de proteínas 1 (AP1), ambos envolvidos na síntese de mediadores inflamatórios importantes na fisiopatologia da osteoartrose ^{9, 11, 21, 23, 24, 28}. Além de inibir a produção de mediadores inflamatórios, a inibição do NF-KB associa-se à diminuição da produção das metaloproteínases 3, 9 e 13 ^{11, 28}, protegendo a matriz cartilagínea ^{14, 19}.

Apesar dos efeitos protetores que o Resveratrol apresenta na articulação, é pouco provável que as melhorias histológicas sejam a única causa da diminuição da dor verificada. Se assim fosse, seria expectável que esta diminuição da dor se mantivesse após as duas semanas de administração, como consequência da menor degeneração cartilagínea. No entanto, as melhorias no comportamento nociceptivo dos animais OA-Resveratrol limitaram-se praticamente ao período da sua administração, com posterior agravamento das manifestações álgicas após cessação do tratamento, sugerindo que o Resveratrol apresenta efeitos benéficos que atuam especificamente nos mecanismos da dor. O efeito antinociceptivo do Resveratrol foi descrito previamente em vários modelos de dor neuropática e inflamatória. ²⁹⁻³², mas nunca em modelos animais de osteoartrose. É provável que as suas propriedades anti-inflamatórias tenham desempenhado um papel fundamental na evolução do efeito antinociceptivo ao longo das duas semanas de administração. Ao inibir a síntese e ação de diversas moléculas pró-inflamatórias, nomeadamente a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), o Resveratrol atenua o importante papel que estas desempenham no desenvolvimento da dor, atuando a nível periférico e central ^{30, 31, 33}. Contudo são necessários mais estudos para elucidar quais os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva do Resveratrol na dor osteoartrítica e perceber qual o impacto quer dos efeitos indiretos (nomeadamente o condroprotetor) quer dos diretos. Seria também pertinente verificar qual a importância que a duração, forma de administração e dose do Resveratrol têm nos resultados obtidos.

5. Conclusão

Apesar das evidentes propriedades condroprotetoras e antinociceptivas, o estudo do Resveratrol tem-se limitado à investigação efetuada *in vitro* e em modelos animais, pelo que se torna necessário aprofundar estes conhecimentos no homem e perceber melhor os mecanismos moleculares associados. Dada a ausência de uma terapêutica com total eficácia no tratamento da osteoartrose, o Resveratrol, ao conseguir atenuar a progressão da fisiopatologia da OA e ao minimizar a dor a ela associada, pode emergir como uma nova possibilidade de tratamento para doentes osteoartríticos, complementando as existentes atualmente.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à *Cátedra em Medicina da Dor Fundação Grünenthal/Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (CMD-FMUP)* o financiamento da parte experimental deste estudo.

Bibliografia

1. Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-Iodoacetate-Induced Histologic Changes in Subchondral Bone and Articular Cartilage of Rat Femorotibial Joints: An Animal Model of Osteoarthritis. *Toxicologic Pathology*. 2003;31:619-624.
2. Imamura M, Imamura ST, Kaziyama HH, et al. Impact of nervous system hyperalgesia on pain, disability, and quality of life in patients with knee osteoarthritis: a controlled analysis. *Arthritis Rheum*. 2008;59:1424-1431.
3. Im HJ, Li X, Muddasani P, et al. Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine pathway in human adult articular chondrocytes. *J Cell Physiol*. 2008;215:452-463.
4. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*. 2001;3:107-113.
5. Ferreira-Gomes J, Adaes S, Sarkander J, Castro-Lopes JM. Phenotypic alterations of neurons that innervate osteoarthritic joints in rats. *Arthritis Rheum*. 2010;62:3677-3685.
6. Im HJ, Kim JS, Li X, et al. Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2995-3005.
7. Lee YC, Nassikas NJ, Clauw DJ. The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia. *Arthritis Res Ther*. 2011;13:211.
8. Li X, Kim JS, van Wijnen AJ, Im HJ. Osteoarthritic tissues modulate functional properties of sensory neurons associated with symptomatic OA pain. *Mol Biol Rep*. 2011;38:5335-5339.
9. Horio Y, Hayashi T, Kuno A, Kunimoto R. Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121:191-203.
10. Udenigwe CC, Ramprasath VR, Aluko RE, Jones PJ. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutr Rev*. 2008;66:445-454.
11. Yu W, Fu YC, Wang W. Cellular and molecular effects of resveratrol in health and disease. *J Cell Biochem*. 2012;113:752-759.
12. Shen CL, Smith BJ, Lo DF, et al. Dietary polyphenols and mechanisms of osteoarthritis. *J Nutr Biochem*. 2012;23:1367-1377.
13. Dave M, Attur M, Palmer G, et al. The antioxidant resveratrol protects against chondrocyte apoptosis via effects on mitochondrial polarization and ATP production. *Arthritis Rheum*. 2008;58:2786-2797.
14. Wang J, Gao JS, Chen JW, Li F, Tian J. Effect of resveratrol on cartilage protection and apoptosis inhibition in experimental osteoarthritis of rabbit. *Rheumatol Int*. 2012;32:1541-1548.
15. Ferreira-Gomes J, Adaes S, Castro-Lopes JM. Assessment of movement-evoked pain in osteoarthritis by the knee-bend and CatWalk tests: a clinically relevant study. *J Pain*. 2008;9:945-954.
16. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16:109-110.
17. Adaes S, Mendonca M, Santos TN, Castro-Lopes JM, Ferreira-Gomes J, Neto FL. Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16:R10.
18. Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18 Suppl 3:S24-34.
19. Elmali N, Esenkaya I, Harma A, Ertem K, Turkoz Y, Mizrak B. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. *Inflamm Res*. 2005;54:158-162.
20. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation*. 2007;30:1-6.

21. Lei M, Wang JG, Xiao DM, et al. Resveratrol inhibits interleukin 1beta-mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor-kappaB activity. *Eur J Pharmacol.* 2012;674:73-79.
22. Csaki C, Keshishzadeh N, Fischer K, Shakibaei M. Regulation of inflammation signalling by resveratrol in human chondrocytes in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:677-687.
23. Csaki C, Mobasheri A, Shakibaei M. Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1beta-induced NF-kappaB-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R165.
24. Shakibaei M, Csaki C, Nebrich S, Mobasheri A. Resveratrol suppresses interleukin-1beta-induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 2008;76:1426-1439.
25. Shakibaei M, John T, Seifarth C, Mobasheri A. Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1095:554-563.
26. Shakibaei M, Mobasheri A, Buhrmann C. Curcumin synergizes with resveratrol to stimulate the MAPK signaling pathway in human articular chondrocytes in vitro. *Genes Nutr.* 2011;6:171-179.
27. Kalantari H, Das DK. Physiological effects of resveratrol. *Biofactors.* 2010;36:401-406.
28. Lei M, Liu SQ, Liu YL. Resveratrol protects bone marrow mesenchymal stem cell derived chondrocytes cultured on chitosan-gelatin scaffolds from the inhibitory effect of interleukin-1beta. *Acta Pharmacol Sin.* 2008;29:1350-1356.
29. Gentili M, Mazoit JX, Bouaziz H, et al. Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. *Life Sci.* 2001;68:1317-1321.
30. Bazzo KO, Souto AA, Lopes TG, et al. Evidence for the analgesic activity of resveratrol in acute models of nociception in mice. *J Nat Prod.* 2013;76:13-21.
31. Falchi M, Bertelli A, Galazzo R, Vigano P, Dib B. Central antalgic activity of resveratrol. *Arch Ital Biol.* 2010;148:389-396.
32. Pham-Marcou TA, Beloeil H, Sun X, et al. Antinociceptive effect of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effect related to COX-2 expression impairment. *Pain.* 2008;140:274-283.
33. Lee AS, Ellman MB, Yan D, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene.* 2013;527:440-447.

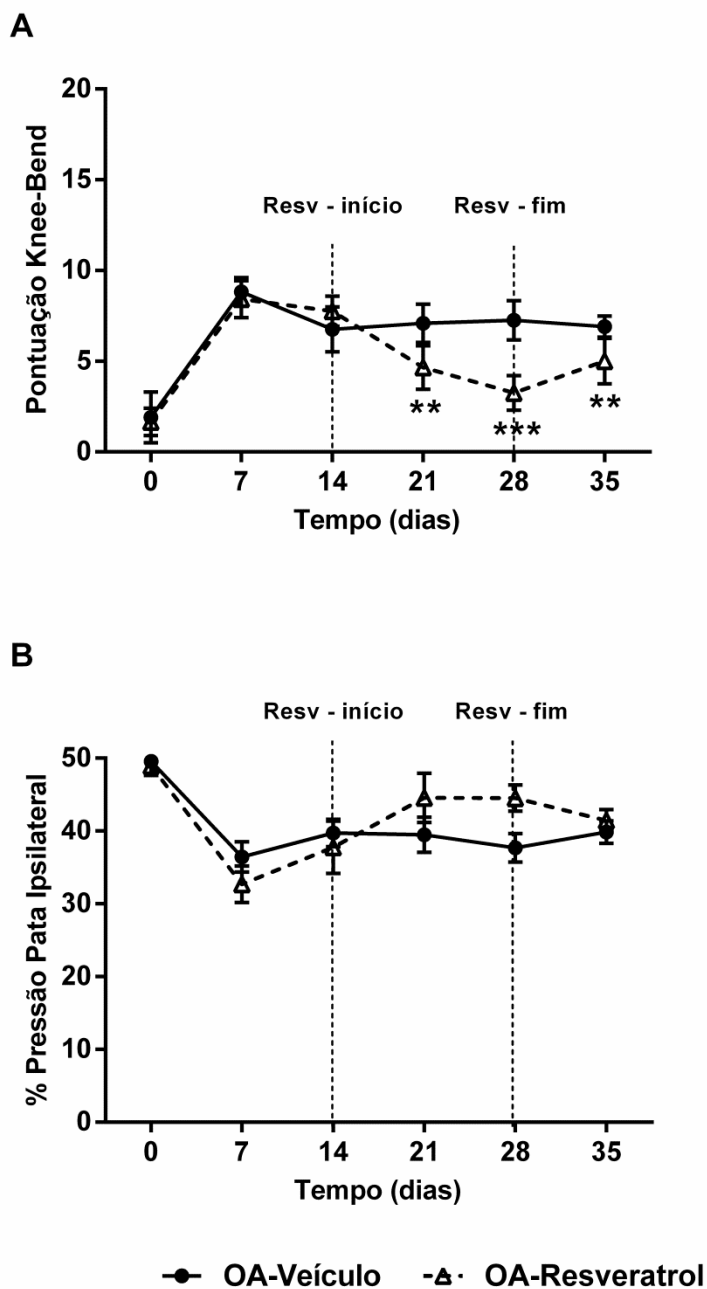


Figura 1- Comportamento nociceptivo. (A) Avaliação da nocicepção induzida pela manipulação da articulação osteoartrítica no grupo tratado com DMSO (Grupo OA-Veículo) e no grupo tratado com Resveratrol + DMSO (Grupo OA-Resveratrol) através do teste do Knee-Bend. Os resultados são apresentados sob a forma da pontuação do Knee-Bend para a pata ipsilateral à injeção com MIA. (B) Avaliação da nocicepção induzida pela locomoção no grupo tratado com DMSO (Grupo OA-Veículo) e no grupo tratado com Resveratrol + DMSO (Grupo OA-Resveratrol) através do teste do CatWalk. Os resultados são expressos sobre a forma de percentagem de pressão que é aplicada pela pata ipsilateral osteoartrítica sobre a pressão total aplicada por ambas as patas posteriores. Em ambos os testes, observou-se que desde o dia 0 até ao dia 14 os valores foram semelhantes para ambos os grupos, com um aumento progressivo da pontuação do Knee-Bend (A) e diminuição da percentagem de pressão aplicada pela pata ipsilateral (B), indicativos da existência de dor associada à osteoartrose. Durante o período de tratamento, aos dias 21 e 28 verificou-se uma melhoria gradual da resposta nociceptiva no grupo OA-Resveratrol em ambos os testes, tendo sido estatisticamente significativa quando comparada com o período anterior ao tratamento apenas no Knee-Bend (A). Em contraste o grupo OA-Veículo manteve os valores relativamente constantes ao longo do tempo em ambos os testes. Após o fim do tratamento, na avaliação comportamental do dia 35, verificou-se uma reversão das melhorias no grupo OA-Resveratrol, aproximando-se os valores daqueles que foram medidos no Grupo de OA-Veículo os quais continuaram semelhantes aos que tinham sido obtidos nos tempos anteriores. Os valores estão apresentados como média \pm SEM. ** representa $p < 0,01$ e *** representa $p < 0,001$; Análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do teste post-hoc Newman-Keuls de comparações múltiplas, para comparação dentro do mesmo grupo experimental de cada tempo de OA com o tempo imediatamente antes do início do tratamento com resveratrol ou DMSO (14 dias); $n = 6$ animais por grupo experimental.

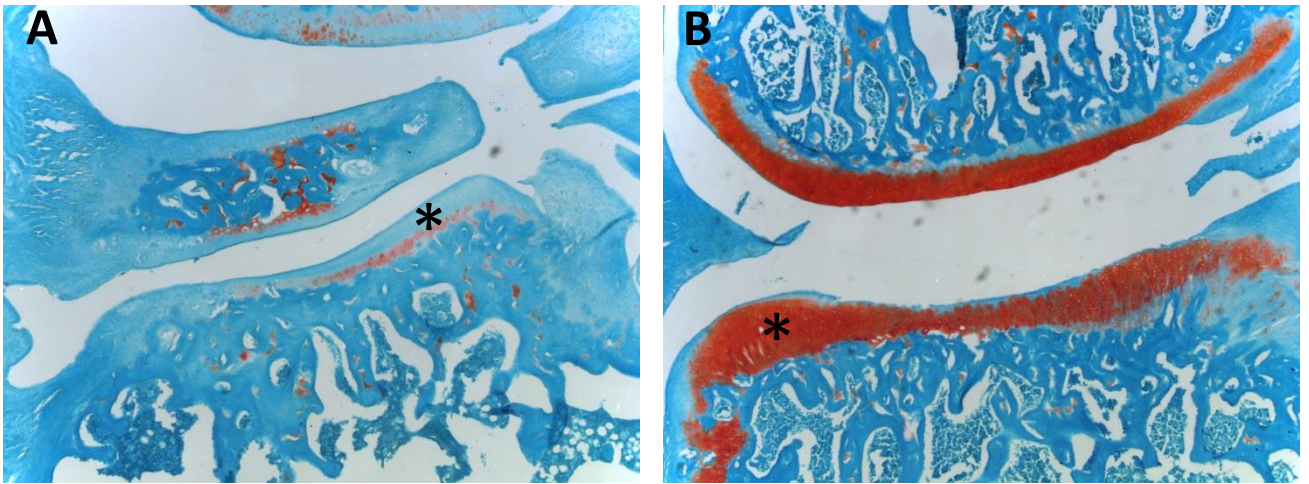


Figura 2- Histopatologia da articulação osteoartrítica do joelho corada com Safranina-O e Fast Green. Secção coronal do prato tibial medial (PTM) da articulação do joelho exemplificativa dos grupos OA–Controlo (A) e OA–Resveratrol (B). Nos animais que receberam veículo (A) verifica-se erosão da cartilagem articular e reduzida marcação dos proteoglicanos pela Safranina-O, o que traduz uma acentuada degeneração da matriz cartiláginea articular. Em contraste, nos animais tratados com resveratrol veículo (B) observa-se uma menor erosão da cartilagem articular que ocorreu somente a nível superficial, e uma maior quantidade de proteoglicanos evidenciada pela coloração com Safranina-O (vermelho), demonstrando assim o menor grau de lesão associado ao tratamento com resveratrol. (*) Cartilagem articular.

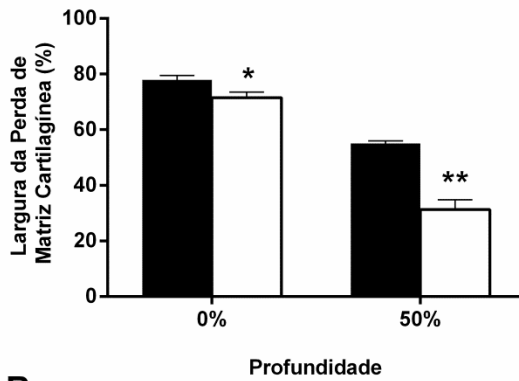
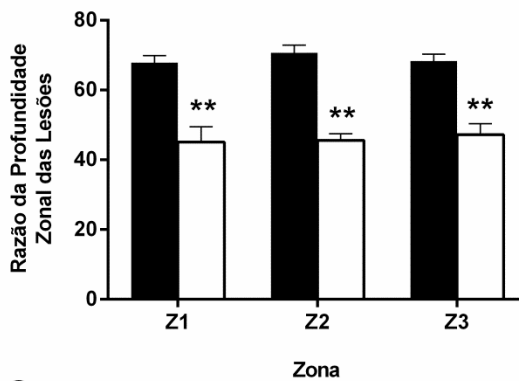
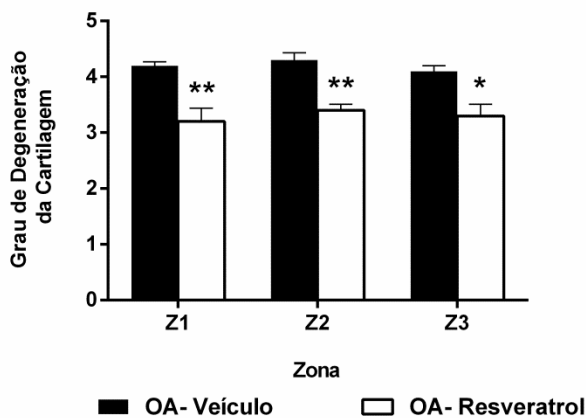
A**B****C**

Figura 3- Análise histopatológica. (A) Razão (em porcentagem) entre a largura da área de perda de matriz cartilaginosa (LPMC) e a largura total da cartilagem no prato tibial medial, indicativa do grau de degenerescência cartilaginosa, ao nível superficial da cartilagem (profundidade 0%) e ao nível médio na cartilagem (profundidade de 50%). No Grupo OA-Resveratrol a perda de matriz cartilaginosa foi significativamente inferior à verificada no Grupo OA-Veículo), a 0% e 50% de profundidade, sugerindo que o Resveratrol teve um efeito protetor. (B) Razão (em porcentagem) entre a profundidade das lesões cartilaginosa e a espessura total da cartilagem numa zona medial (Z1), central (Z2) ou lateral (Z3) do prato tibial medial. Nas 3 zonas avaliadas verifica-se que a profundidade das lesões é menor no Grupo OA-Resveratrol do que no Grupo OA-Veículo). (C) Pontuação obtida na avaliação do Grau de Degeneração da Cartilagem nas zonas medial (Z1), central (Z2) e lateral (Z3) do prato tibial medial, de acordo com o valor da razão obtida entre a área de cartilagem degenerada e a área de cartilagem antes da indução da OA (intacta). A pontuação obtida, indicativa do grau de degenerescência articular, foi significativamente menor no grupo tratado com Resveratrol + DMSO (Grupo OA-Resveratrol) do que no grupo tratado com DMSO (Grupo OA-Veículo) nas 3 zonas avaliadas. Os valores estão apresentados como média \pm SEM. * representa $p < 0,05$ e ** representa $p < 0,01$ (Teste Mann-Whitney para comparação entre os dois grupos experimentais); $n = 6$ animais por grupo experimental.

Agradecimentos

Gostaria de começar por deixar o mais profundo agradecimento à orientadora deste projecto, Professora Doutora Fani Neto, por me ter aberto as portas do serviço para desenvolver este trabalho, bem como pela disponibilidade e apoio que me dispensou desde o primeiro instante e que sem dúvida foram fundamentais para que eu fosse capaz de concretizar os objectivos a que me propus. Queria também deixar uma palavra de apreço para os restantes membros do grupo, nomeadamente Professora Doutora Joana Gomes, Sara Adães e Diana Nascimento, pois sem o seu contributo dificilmente teria sido possível levar este trabalho a bom porto.

Agradeço do fundo coração aos meus pais e irmão por serem o meu maior incentivo e estímulo para procurar todos os dias ser mais e melhor, nunca virando cara a luta, na busca das minhas concretizações pessoais.

Gostava ainda de agradecer aos meus colegas de curso pelo importante contributo que tiveram ao longo destes seis anos que tiveram na formação do Homem que sou hoje e do Médico que serei no futuro.

Por fim gostaria de deixar dois agradecimentos muito especiais. Ao meu colega de curso e amigo Pedro Baptista, pela amizade e companheirismo bem como muitos outros valores com que me presenteia todos os dias, sem dúvida alguma foram fundamentais para que os dias de bonança se sobrepusessem aos dias de tempestade que fui encontrando durante este percurso. À minha namorada, Joana Leite, pela paciência, carinho e dedicação com que me tem brindando incansavelmente durante esta etapa tão importante da minha vida.

Trabalho de acordo com as normas da Revista:

Acta Reumatológica Portuguesa

Objectivos e âmbito

A Acta Reumatológica Portuguesa (ARP) é uma publicação científica internacional, revista por pares, abrangendo aspectos clínicos e experimentais das doenças reumáticas. São publicados artigos originais, artigos de revisão, casos clínicos, imagens em Reumatologia, cartas ao editor e artigos que visam melhorar a Prática Clínica (recomendações e protocolos clínicos, por exemplo).

A ARP foi fundada em 1973 como órgão científico oficial da Sociedade Portuguesa de Reumatologia e subscreve os requisitos para apresentação de artigos a revistas biomédicas elaboradas pela Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas (International Committee of Medical Journal Editors), publicada na íntegra inicialmente em *N Engl J Med* 1991; 324: 42428 e actualizada em Outubro de 2008 e disponível em www.ICMJE.org. A política editorial da ARP segue as Recomendações de Política Editorial (Editorial Policy Statements) emitidas pelo Conselho de Editores Científicos (Council of Science Editors), disponíveis em http://www.councilscienceeditors.org/files/public/entire_whitepaper.pdf.

A ARP publica preferencialmente artigos escritos na língua Inglesa, mas artigos em língua Portuguesa também poderão ser submetidos para avaliação. O rigor e a exactidão dos conteúdos, assim como as opiniões expressas, são da exclusiva responsabilidade do(s) autor(es).

Os artigos submetidos devem ser originais e não podem ter sido publicados previamente.

Os artigos publicados constituirão propriedade da revista, não podendo ser reproduzidos, no seu todo ou em parte, sem a prévia autorização dos editores.

A Revista está indexada no PubMed/Medline e os seus artigos estão disponíveis online na íntegra, com acesso aberto e gratuito.

Instruções para submissão de artigos

A Acta Reumatológica Portuguesa oferece aos autores um sistema de submissão e revisão de artigos a funcionar exclusivamente online. Acedendo ao website da ARP (www.actareumatologica.pt), os autores poderão submeter os seus artigos e acompanhar o seu estado no processo de revisão. Os autores serão notificados por email no próprio dia em que o(s) seu(s) artigo(s) sofra(m) alterações relevantes durante o processo editorial.

De modo a submeter um manuscrito, os autores deverão **criar uma conta de utilizador**:

- Aceder ao website da ARP (www.actareumatologica.pt), clicar no link "Entrar" seguido de "Registo" e seguir cuidadosamente todas as instruções fornecidas. Um email de activação será enviado para a sua conta de email. Para activar a conta ARP é necessário seguir o link fornecido no corpo desse email, que automaticamente o redireccionará para uma mensagem de registo no website da ARP.

Após a criação de uma conta ARP, os autores poderão **submeter e acompanhar o progresso do(s) seu(s) artigo(s)**:

- Aceder ao website da ARP (www.actareumatologica.pt), entrar na area privada e clicar no link "Submeter artigo". Preencher o formulário seguindo as instruções cuidadosamente.

Instruções aos autores

Para evitar atrasos no processo de revisão, leia cuidadosamente as instruções e assegure-se de que o seu manuscrito está de acordo com os requisitos da ARP antes de submeter (número de palavras e formato).

- Título do artigo: o título deve descrever brevemente o conteúdo do artigo. Não devem ser usadas abreviaturas. Deve ser indicado um curto título para rodapé. Nos artigos escritos em português é necessário incluir o título em inglês.
- Nome dos autores e afiliações
- Informações do autor responsável pela correspondência: nome, morada, telefone e endereço electrónico
- Resumo: com um máximo de 350 palavras, deve incluir objectivos, material e métodos, resultados e conclusões. Para os casos clínicos o limite de palavras é 180.

Tipos de artigo:

- **Editoriais**: Os Editoriais serão solicitados por convite do Editor e constituirão comentários sobre tópicos actuais ou sobre artigos publicados na revista. O texto dos Editoriais não deverá exceder as 1200 palavras, um máximo de 15 referências e pode conter uma figura ou tabela.
- **Artigos de Revisão**: Preferencialmente, os Artigos de Revisão serão também solicitados pelo Editor. No entanto, os autores interessados em apresentar um Artigo de Revisão podem contactar o Editor para discussão dos temas a apresentar no artigo, o qual não deverá exceder as 4000 palavras, 6 Tabelas ou Figuras e 100 referências;
- **Artigos Originais**: O texto dos Artigos Originais deve ser apresentado com uma Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão. Não deverá exceder as 4000 palavras, 6 Tabelas ou Figuras e 60 referências;
- **Prática Clínica**: O texto dos artigos de Prática Clínica deve ser apresentado com uma Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão. Não deverá exceder as 4000 palavras, 6 Tabelas ou Figuras e 60 referências;
- **Casos Clínicos**: O texto dos Casos Clínicos deverá ser apresentado com uma Introdução, Caso Clínico e Discussão. Os Casos Clínicos deverão ser acompanhados de figuras ilustrativas/tabelas (máximo de 6), não deverão exceder as 2000 palavras e 25 referências;
- **Imagens em Reumatologia**: Imagens representando manifestações clínicas raras ou de particular interesse podem ser submetidas (no máximo 4). O texto acompanhante não deverá exceder as 500 palavras e 5 referências
- **Cartas ao Editor**: As Cartas ao Editor deverão constituir um comentário crítico a um artigo da Revista ou uma pequena nota sobre um tema ou caso clínico. O texto não deverá exceder as 600 palavras, uma Figura/Tabela e um máximo de 10 referências.

Tabelas: As Tabelas a inserir devem ser assinaladas no texto em numeração romana. Cada Tabela deverá possuir um título e não deverá apresentar linhas verticais. As linhas horizontais só deverão ser usadas como separadores de título e subtítulos. Todas as abreviaturas usadas devem ser explicadas na parte inferior da Tabela.

Figuras: As Figuras a inserir devem ser assinaladas no texto em numeração árabe e apresentar legendas. Cada Figura deve ser importada individualmente em format JPEG ou TIFF de alta qualidade. O Editor reserva o direito de agrupar Figuras ou alterar o seu tamanho de modo a rentabilizar o uso da páginas.

Referências: As Referências bibliográficas devem ser classificadas e numeradas por ordem de entrada no texto e em superscript. As abreviaturas usadas na nomeação das revistas devem ser as utilizadas pelo Index Medicus. Nas Referências com 6 ou menos autores, todos devem ser nomeados. Nas Referências com 7 ou mais autores, devem ser nomeados os 3 primeiros seguidos de et al. Os números de página inicial e final devem ser totalmente apresentados (ex. 565-569 e não 565-9). Não indicar o número da Revista nem o mês da publicação. As Referências correspondentes a trabalhos não publicados, apresentações ou observações pessoais, devem ser inseridas no próprio texto (em parenthesis) e não como Referências convencionais. Os autores são responsáveis pela exactidão das Referências apresentadas. Seguem-se alguns exemplos de como devem constar os vários tipos de Referências:

Revista

Nome(s) e iniciais do(s) autor(es). Título do artigo. Nome da Revista Ano; Volume: Página (s).

Ex: Hill J, Bird HA, Hopkins R, Lawton C, Wright C. Survey of satisfaction with care in a rheumatology outpatient clinic. Ann Rheum Dis 1992; 51: 195-197.

Artigo publicado online (inserir DOI)

Nome(s) e iniciais do(s) autor(es). Título do artigo. Nome da Revista Published Online First: data. doi.

Ex: Merkel PA, Curthbertson D, Hellmich B et al. Comparison of disease activity measures for ANCA-associated vasculitis. Ann Rheum Dis Published Online First: 29 July 2008. doi:10.1136/ard.2008.097758.

Capítulo de livro

Nome(s) e iniciais do(s) autor(es) do capítulo. Título do capítulo. In: Nome(s) e iniciais do(s) editor(es) medico(s). Título do livro. Cidade: Nome da casa editorial, ano de publicação: primeira a última página do capítulo.

Ex: Stewart AF. Hypercalcemia resulting from medications. In: Favus MD, ed Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. New York: Raven Press, 1991: 177-178.

Livro

Nome(s) e iniciais do(s) autor(es). Título do livro. Cidade: Nome da casa editorial, ano de publicação: página(s).

Ex: Lorig K. Patient Education. A practical approach. St Louis: Mosby-Year Book, 1992: 51.

Documento electrónico

Título do documento. <http://address>. Data de acesso.

Ex: Programa Nacional de Luta Contra a Tuberculose. Sistema de Vigilância (SVIG-TB).

Direcção-Geral da Saúde – Divisão de Doenças Transmissíveis, Março de 2005.

<http://www.dgsaude.pt/upload/membro.id/ficheiros/i006875.pdf>. Accessed in January 25th 2008.

Agradecimentos

Incluir nesta secção agradecimentos a pessoas que tenham contribuído para o trabalho mas sem autoria. Instituições ou fontes de apoio financeiro também poderão aqui ser indicadas.

Critérios de Revisão

Os artigos submetidos serão enviados a Revisores especializados no tema do artigo. Os critérios de aceitação de um artigo para publicação têm em consideração a qualidade e originalidade do artigo apresentado, a excelência na redacção e organização do mesmo e o potencial impacto na literatura médica

Todos os artigos aceites para publicação serão mantidos e apresentados como "onlinefirst" até que os Editores os seleccionem para integrar um número específico da Revista.

Revisão de provas

Os autores dos artigos aceites para publicação receberão uma versão digital da prova do artigo para valiação. Assim, as provas devem ser revistas durante as 72h que sucedem a sua recepção. Os autores devem verificar o texto, Figuras, Tabelas, Legendas e Referências, e contactar os Editores no caso em que sejam necessárias alterações. Apenas pequenas alterações e correcções tipográficas são permitidas nesta fase.

Direitos de autor

Após aceitação para publicação, os autores transferem para a ARP os direitos de autor do manuscrito.