



**UNISUL**

**UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA**

**ALEXANDRA ADAM**

**EFEITO DA CURCUMINA SOBRE OS MARCADORES DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM CÃES COM OSTEOARTRITE**

Tubarão

2017

**ALEXANDRA ADAM**

**EFEITO DA CURCUMINA SOBRE OS MARCADORES DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM CÃES COM OSTEOARTRITE**

Resultados de pesquisa apresentados ao Curso de Medicina Veterinária, da Universidade do Sul de Santa Catarina, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Débora Maria Marques Callado de Oliveira, Ma.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Silvia Resende Terra, Dra.

Tubarão

2017

**ALEXANDRA ADAM**

**EFEITO DA CURCUMINA SOBRE OS MARCADORES DE ESTRESSE  
OXIDATIVO EM CÃES COM OSTEOARTRITE**

Resultados de pesquisa apresentados ao Curso de Medicina Veterinária, da Universidade do Sul de Santa Catarina, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Tubarão, 21 de novembro de 2017.

---

Professora e Orientadora Débora Maria Marques Callado de Oliveira, Ma.  
Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Professora Nicole Hlavac, Dra.  
Universidade do Sul de Santa Catarina

---

Mariana Goldim, Ma.  
NEUROimet- Núcleo Seps

*Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado,  
e ao meu companheiro, Pyther, por fazer parte da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, pelo esforço, carinho e dedicação em todos esses anos em que permaneci longe de casa, sempre me incentivando a persistir na conquista de meus objetivos e sonhos.

Mais que especialmente, agradeço ao *meu amor*, pela sua paciência nos momentos mais desafiadores do processo, e por ter me apoiado, auxiliado e ensinado. Você fez com que a caminhada se tornasse mais amena, apresentando-me uma percepção diferente sobre a realização de “tarefas”. Seus abraços me ajudaram bastante, assim como suas palavras. Jamais me esquecerei das cobranças relacionadas ao correto uso da vírgula.

Agradeço, em suma, a todos aqueles que me auxiliaram de perto no desenvolvimento desta pesquisa, com menção especial à minha orientadora, Débora Callado, à minha coorientadora, Silvia Terra, e à colaboradora Mariana Goldim.

Por fim, agradeço à DrogaVet pelo fornecimento dos medicamentos utilizados neste estudo.

“[...] O teu castelo é rodeado por muros, e é-te dito: 'Tudo isto é teu! Desfruta-o! Apenas não podes sair daqui!'. Então, acredita-me, nesse mesmo instante quererás deixar esse teu paraíso e pular por cima do muro. [...]”

Fiódor Dostoiévski, *O Movimento de Libertação*

## RESUMO

A osteoartrite é considerada uma doença inflamatória, degenerativa, crônica e de evolução progressiva, que acomete com frequência a espécie canina. Não há cura conhecida, dada a inexistência de agentes terapêuticos capazes de restabelecer a articulação em seu aspecto fisiológico. Apresenta-se clinicamente pela presença de claudicação, incapacidade funcional, crepitação, rigidez articular, atrofia muscular e dor. Sabe-se que a curcumina tem ação anti-inflamatória e antioxidante, além de outras propriedades e usos, tornando-a uma boa opção para ser utilizada terapêuticamente, atuando, sobretudo, na redução do processo inflamatório e das espécies reativas de oxigênio – que, em níveis elevados, são prejudiciais às células, provocando danos às membranas, citoplasma e, posteriormente, ao ácido desoxirribonucleico. A pesquisa foi desenvolvida no sentido de avaliar o efeito da curcumina sobre os marcadores de dano oxidativo aos lipídios. O estudo foi realizado no Hospital Veterinário Unisul, com a participação de 4 cães de grande porte (três fêmeas e um macho, todos com idade superior a 9 anos), diagnosticados com osteoartrite secundária a displasia coxofemoral, avaliados durante dez dias. O delineamento experimental foi uniforme, e o tratamento consistiu na administração dos condroprotetores sulfato de condroitina e glucosamina em associação com o adjuvante curcumina. Procedeu-se à coleta de sangue antes e depois do tratamento, com vistas à análise do dano oxidativo aos lipídios e determinação de parâmetros hematológicos, com função renal e hepática. A medida de evidência da amostra (valor-*p*) foi superior ao nível de significância definido para o estudo ( $\alpha = 0,05$ ), mas houve redução do dano em 75% dos indivíduos, atribuível ao efeito antioxidante da curcumina nos condrócitos e citocinas. Dadas as condicionantes do estudo, sobretudo as limitações relacionadas ao tempo de tratamento, não se pôde evidenciar maior redução do dano aos lipídios. Apesar disso, os dados coletados indicaram efeito positivo sobre os marcadores de estresse oxidativo e melhora nos parâmetros hematológicos e leucocitários.

**Palavras-chave:** dano oxidativo, inflamação, espécies reativas de oxigênio, nutracêuticos, *Curcuma longa* L.

## ABSTRACT

Osteoarthritis is a chronic, progressive and degenerative disease, driven by inflammation, that commonly affects dogs. There is no cure, largely due to the fact that, at present, there are not any effective therapeutic agents for repairing joint integrity. It is clinically characterized by lameness, functional disabilities, crepitus, joint stiffness, muscle atrophy and pain. Nonetheless, early findings suggest that curcumin has anti-inflammatory and antioxidant properties, among many others, making it a promising agent for osteoarthritis treatment therapy, thereby reducing the inflammation and suppressing the level of reactive oxygen species - which, at elevated rates, can mediate and produce harmful effects on cells, causing damage to membranes, cytoplasm and, further, to the deoxyribonucleic acid. The purpose of the research was to evaluate the curcumin's effect on markers of lipid oxidative damage. This study was performed at the Unisul Veterinary Hospital, involving 4 large dogs (three females and one male, all older than 9 years), diagnosed with osteoarthritis secondary to hip dysplasia, which were treated for ten days after inclusion. The experiment conduction was uniform, and the treatment consisted of ten consecutive once-daily oral combined administration of chondroprotectives agents (chondroitin sulfate and glucosamine) and curcumin as adjuvant. Blood was collected before and after the treatment, in order to perform the analysis of the oxidative damage to lipids, and determine hematological parameters, with liver and renal function profiles. The adopted measure of evidence ( $p$ -value) was greater than the significance level defined for this study ( $\alpha = 0.05$ ), although there was a reduction in the oxidative damage in 75% of sample members, which can be attributed to the curcumin's antioxidant effect on chondrocytes and cytokines. Due to the limitations of this study, especially those related to the constrained time to complete the research, no greater reduction of lipid damage could be observed. Nevertheless, the findings of this study revealed a positive effect of curcumin on markers of oxidative stress, as well as an improvement of hematological (mainly leukocyte-related) parameters.

**Keywords:** oxidative damage, inflammation, reactive oxygen species, nutraceuticals, *Curcuma longa* L.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ação inibidora da curcumina sobre a cascata do ácido araquidônico e os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1.....	22
Figura 2 - A curcumina, ao inibir a transcrição da cicloxigenase e lipoxigenase, impede a biossíntese dos mediadores pró-inflamatórios.....	23

## LISTA DE SIGLAS

AINE: Anti-inflamatórios não esteroides  
AP-1: Ativador de proteína 1  
ALT: Alanina Aminotransferase  
CAT: Catalase  
CoQ: Coenzima Q  
COX-2: Cicloxigenase-2  
EDTA K<sub>2</sub>: Ácido etilenodiaminotetracético dipotássico  
ERK: Quinase controlada pela sinalização extracelular  
ESR: Spin eletrônico  
GPx: Glutathione Peroxidase  
GSH: Glutathione Reduzida  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio  
IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 $\beta$   
JNK: Quinase terminal c-jun-N  
LOX: Lisil oxidase  
LOX-5: Lipoxigenase-5  
LT: Leucotrienos  
MAPK: Proteína-quinase ativada por mitógeno  
MMP: Metaloproteases  
NF- $\kappa$ B: Fator Nuclear Kappa B  
OA: Osteoartrite  
O<sub>2</sub>: Oxigênio  
OH: Hidroxila  
PGs: Prostaglandinas  
PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>  
PLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub>  
RO<sub>2</sub>: Peroxila  
ROS: Espécies reativas de oxigênio  
SOD: Superóxido Dismutase  
TBARS: Ácido tiobarbitúrico  
TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa  
TX: Tromboxano

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Normas da revista <i>Veterinary Records</i> .....	53
Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido.....	54

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1	PROBLEMA DE PESQUISA .....	12
1.2	OBJETIVOS .....	12
1.2.1	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>12</b>
1.2.2	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>13</b>
2.1	ANATOMIA ARTICULAR.....	13
2.1.1	<b>Diartrose.....</b>	<b>13</b>
2.2	OSTEOARTRITE.....	14
2.2.1	<b>Fisiopatologia.....</b>	<b>14</b>
2.2.2	<b>Diagnóstico.....</b>	<b>16</b>
2.2.3	<b>Tratamentos.....</b>	<b>17</b>
2.2.3.1	Sulfato de condroitina e glucosamina.....	18
2.2.3.2	Curcumina .....	19
2.3	CÚRCUMA .....	19
2.3.1	<b>Curcumina .....</b>	<b>20</b>
2.3.1.1	Ação anti-inflamatória.....	21
2.3.1.2	Ação antioxidante.....	24
2.4	ANÁLISE LABORATORIAL DO DANO OXIDATIVO.....	26
2.4.1	<b>Capacidade antioxidante total (CAOT) .....</b>	<b>26</b>
2.4.2	<b>Capacidade antioxidante específica.....</b>	<b>26</b>
2.4.3	<b>Avaliação do dano oxidativo em componentes celulares .....</b>	<b>27</b>
2.4.3.1	Marcador de peroxidação lipídica Malondialdeído (MDA).....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS PROPOSTOS .....	28
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS REALIZADOS .....	30
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>1(33)</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho tem como tema a ação da curcumina nos marcadores de estresse oxidativo, quando administrada em cães com osteoartrite. Indaga-se sobre uma possível redução dos danos oxidativos atribuída à introdução do adjuvante curcumina no tratamento dos animais.

Por se tratar de um composto natural, a curcumina é bem aceita pelos tutores, principalmente nos casos em que os animais apresentam doença crônica sem tratamento curativo. No entanto, sua utilização ainda não está disseminada na rotina clínica, carecendo-se de mais estudos que comprovem sua eficácia, justificando, assim, a realização deste trabalho.

No desenvolvimento do estudo, foram abordados tópicos essenciais para a compreensão da doença analisada e da substância objeto da pesquisa, assim divididos: Anatomia articular, Osteoartrite, Cúrcuma, Curcumina (ação anti-inflamatória e antioxidante) e Análise dos marcadores de estresse oxidativo.

Espera-se que, ao final deste trabalho, os dados obtidos possam ser estruturados de forma a alcançar uma conclusão lógica e satisfatória que seja capaz de responder ao questionamento principal do projeto de pesquisa.

### 1.1 PROBLEMA DE PESQUISA

A curcumina é capaz de reduzir o dano oxidativo nos cães com osteoartrite?

### 1.2 OBJETIVOS

#### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo em cães com osteoartrite tratados com curcumina.

#### 1.2.2 Objetivos específicos

Avaliar o dano às membranas (peroxidação lipídica) nos cães com osteoartrite tratados com o adjuvante curcumina.

Comparar exames hematológicos e bioquímicos antes e após o tratamento com o adjuvante curcumina em cães com osteoartrite.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ANATOMIA ARTICULAR

A base estrutural do corpo animal é constituída por estes elementos: ossos, cartilagens, ligamentos e articulações. Quando unidos, dão sustentação ao organismo, denominando-se *sistema esquelético*. As articulações são formadas a partir da união de dois ossos, ao que se dá o nome de *diartrose* (união articular verdadeira) (LIEBICH, FORSTENPOINTNER, KONIG, 2012).

#### 2.1.1 Diartrose

As uniões articulares verdadeiras são caracterizadas por apresentarem uma fenda articular, fazendo a junção de dois ossos adjacentes. Estas articulações são constituídas de uma cavidade articular preenchida com fluido sinovial, de uma cápsula articular e cartilagem articular hialina, que faz a cobertura dos ossos (MACIEL, 2001; LIEBICH, FORSTENPOINTNER, KONIG, 2012; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016).

A cápsula articular apresenta duas camadas, sendo a mais externa a camada fibrosa, e a mais interna, a membrana sinovial. A camada fibrosa é determinada a partir da carga mecânica aplicada à região, apresentando grandes quantidades de fibras nervosas. Em razão disso, a região é muito sensível à dor. Por outro lado, a membrana sinovial caracteriza-se por apresentar muitas células, vasos sanguíneos e nervos. Sua camada interna é composta de sinoviócitos, células responsáveis pela fagocitose e também pela produção e secreção de proteínas (OLIVEIRA, 2011; LIEBICH, FORSTENPOINTNER, KONIG, 2012; MACHADO, 2015).

A membrana sinovial reveste a cápsula articular, sendo composta de ácido hialurônico, açúcar, eletrólitos e enzimas. Consiste em uma fina membrana que atua regulando a transferência de moléculas dentro e fora da articulação. Por sua vez, as articulações são preenchidas pela sinóvia (líquido sinovial), fluido transparente e viscoso que realiza a lubrificação, diminuindo o atrito entre as faces articulares (OLIVEIRA, 2011; LIEBICH, FORSTENPOINTNER, KONIG, 2012; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016).

## 2.2 OSTEOARTRITE

O reconhecimento da osteoartrite (OA) como doença autônoma ocorreu no final do século XVIII, sendo atualmente classificada como uma enfermidade musculoesquelética degenerativa, inflamatória e crônica, que se manifesta de forma progressiva e lenta. Apresenta-se clinicamente pela presença de claudicação, incapacidade funcional, crepitação, rigidez articular, atrofia muscular e dor – definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como “[...] *uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano*” (HENROTIN, PRIEM, MOBASHERI, 2013; MALFAIT, SCHNITZER, 2013; RAMÍREZ-FLORES *et al.*, 2017).

Conforme a doença progride, torna-se incapacitante, causando alterações na cartilagem articular, osso subcondral, ligamentos, inervações, vascularização, cápsula e membrana sinovial, até atingir a falência articular (MOREAU *et al.*, 2004; HENROTIN, PRIEM, MOBASHERI, 2013; MALFAIT, SCHNITZER, 2013; COMBLAIN *et al.*, 2015; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016; BHATHAL *et al.*, 2017; RAMÍREZ-FLORES *et al.*, 2017).

A degeneração da cartilagem provocada pela OA pode ocorrer de forma primária, associando-se ou não a outros fatores, sendo os mais comuns a obesidade e a idade avançada; ou, de forma secundária, como consequência de incongruência articular, trauma (p. ex., ruptura do ligamento cruzado cranial, luxação de patela e luxação coxofemoral) ou presença de enfermidade concomitante, a exemplo da displasia coxofemoral e da displasia de cotovelo (SILVA, MONTANDON, CABRAL, 2015; TILLEY, 2003; MELE, 2007; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016; RAMÍREZ-FLORES *et al.*, 2017;).

### 2.2.1 Fisiopatologia

As alterações ósseas e cartilaginosas ocorrem devido a danos físicos, resultando no aparecimento de microfissuras e alterações nos osteoblastos e osteoclastos – que, respectivamente, sintetizam e reabsorvem estruturas ósseas. Os danos ósseos e articulares tornam-se mais perceptíveis conforme a progressão da OA. Há o aparecimento de alterações no osso, com perda da cartilagem e remodelamento do osso subcondral, causando ativação osteoblástica e, por fim, esclerose do tecido. Ocorre a formação de osteófitos e cistos ósseos pelos osteoclastos nas bordas danificadas da cartilagem, como resultado da reabsorção óssea

local, na tentativa celular de reintroduzir estabilidade articular (POOLE, 1999; SILVA, MONTANDON, CABRAL, 2015; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016).

Os danos cartilagosos iniciam-se de forma local, com a desagregação proteolítica da matriz cartilaginosa, composta por condrócitos, que sofrem alterações significativas na composição de água e em componentes da matriz extracelular orgânica, como o colágeno tipo II, proteoglicanos (agrecana) e proteínas não colágenas (POOLE, 1999; MARTEL-PELLETIER, 2004; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016).

Os condrócitos conformam-se em uma matriz constituída de colágeno tipo VI e outras proteínas. São responsáveis pela manutenção do volume mínimo de colágeno e não exibem atividade mitótica. No início da doença, apresentam aumento na sua atividade sintética, devido à tentativa de reparo das lesões. Com o curso da enfermidade, ocorre perda de sua função normal: os condrócitos desregulam-se em razão da ruptura da matriz pericelular, expondo as células da matriz interterritorial. Os condrócitos também exercem papel secretório em reação à presença de espécies reativas de oxigênio, citocinas, quimiocinas e outros produtos pró-inflamatórios (POOLE, 1999; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016).

O início da inflamação sinovial (sinovite) se dá a partir da hiperplasia da sinóvia – composta pela membrana sinovial, fluido e infiltrados de linfócitos T e B – acredita-se que secundária à liberação de fragmentos da matriz extracelular da cartilagem no líquido sinovial, resultando na liberação de mediadores inflamatórios e consequente degradação da cartilagem articular, gerando um ciclo ininterrupto. A inflamação transcorre através da produção das citocinas pró-inflamatórias e proteases. As proteases liberadas pelos condrócitos são determinantes para a degradação da matriz, com maior envolvimento das metaloproteases (MMP), de que é parte a colagenase, responsável pela clivagem e quebra das cadeias peptídicas do colágeno, e também a estromelina e a agrecanase, responsáveis, respectivamente, pela degradação e fragmentação de proteoglicanos (MARTEL-PELLETIER, 2004; SCANZELLO, 2012; MALFAIT, SCHNITZER, 2013; AL-MADOL *et al.*, 2016; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016).

As citocinas pró-inflamatórias, originadas da atividade catabólica dos condrócitos, promovem maior degradação da cartilagem, agravando a inflamação. O fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) são as moléculas proteicas mais importantes no processo fisiopatológico da doença, sendo responsáveis pela maior parte da degradação cartilaginosa, podendo desencadear hiperalgesia. A lipoxigenase-5 (LOX-5) parece também estar envolvida na progressão da inflamação. O TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  agem sobre os condrócitos, incentivando sua síntese enzimática e impedindo a produção dos principais inibidores

fisiológicos destas enzimas, bem como a síntese de constituintes da matriz. Portanto, têm ação deletéria na cartilagem e geram inflamação crônica (MARTEL-PELLETIER, 2004; AL-MADOL *et al.*, 2016; BARROUIM-MELO *et al.*, 2016; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016).

Os danos cartilagosos desencadeiam a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), provocando aumento da oxidação no interior do líquido sinovial e, conseqüentemente, morte dos condrócitos e geração de enzimas antioxidantes, que são liberadas no intuito de equilibrar a produção dessas ROS. O aumento no nível de enzimas antioxidantes causa prejuízos para o líquido sinovial, sobretudo reduzindo sua viscosidade (BARROUIM-MELO *et al.*, 2016).

### **2.2.2 Diagnóstico**

O diagnóstico necessita ser preciso. Para tanto, recomenda-se uma anamnese detalhada, exame clínico minucioso e auxílio de exames complementares, como o radiológico, a artroscopia, ressonância magnética e tomografia computadorizada (BRAUN, GOLD, 2012; RAMÍREZ-FLORES *et al.*, 2017).

O tutor pode relatar ter observado diminuição na atividade do animal, alterações no comportamento urinário e fecal, bem como claudicação e dor, descrição que atende à definição clínica da patologia, podendo variar em relação ao grau e à manifestação, se intermitente ou contínua (MALFAIT, SCHNITZER, 2013; COMBLAIN *et al.*, 2015; BHATHAL *et al.*, 2017).

Deve-se iniciar o exame físico do paciente depois de realizada a anamnese. Primeiramente, o animal deve estar em estação. Então, verifica-se se há presença de atrofia muscular ou incapacidade funcional. Posteriormente, deve-se examinar o paciente em decúbito, com atenção a todos os membros, preferindo-se a análise distal para proximal, verificando-se se há presença de crepitação, dor, frouxidão muscular e tumefação (LOBOSCO, 2012; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016).

Na radiografia, podem ser constatadas alterações ósseas, por meio da visibilização de osteófitos periarticulares e esclerose subcondral, redução do espaço articular, assim como perda de cartilagem e alterações meniscais. Entretanto, nos processos iniciais da doença, a sua visibilização é prejudicada. Precocemente, é possível identificar a efusão articular, embora seja normalmente discreta e de difícil detecção na radiografia (MALFAIT,

SCHNITZER, 2013; BARROUIM-MELO *et al.*, 2016; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2016; RAMÍREZ-FLORES *et al.*, 2017).

A ultrassonografia é pouco utilizada na Medicina Veterinária, pois requer transdutores específicos e experiência do operador. É de grande auxílio no diagnóstico, uma vez que permite a visibilização de pequenas mudanças estruturais nas articulações, como lesões articulares, inflamação, sinovite e tendinite (KEEN, WAKEFIELD, CONAGHAN, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; RAMÍREZ-FLORES *et al.*, 2017).

Outras técnicas podem ser empregadas na identificação precoce da OA, porém, em Medicina Veterinária, essas técnicas não estão disponíveis rotineiramente. A título de exemplo, pode-se citar a artroscopia (apresenta elevado custo, necessita de quantidade significativa de material e exige experiência e prática do operador). Além de ser utilizada para a obtenção do diagnóstico, também serve a propósitos terapêuticos. Com o auxílio dessa técnica, toda a superfície articular pode ser observada, assim como a integridade de ligamentos e meniscos. Outros exemplos são a ressonância magnética e a tomografia computadorizada, ideais quando se deseja visibilizar a microarquitetura do osso trabecular. A ressonância magnética permite, ainda, definir com precisão a espessura da cartilagem articular e sua degeneração, constituindo-se na técnica diagnóstica ideal para a avaliação da OA (LINDSEY *et al.*, 2004; HULSE, 2006; CARRIÇO, 2012; RAMÍREZ-FLORES *et al.*, 2017).

### 2.2.3 Tratamentos

O principal objetivo do tratamento é minimizar os danos decorrentes da doença, no intuito de promover incremento na qualidade de vida do animal, reduzindo, principalmente, a dor articular. Até o momento, não há cura conhecida para a OA, existindo apenas tratamentos paliativos, de forma medicamentosa – ou com a administração de nutracêuticos –, e de forma não farmacêutica, através da perda de peso, fisioterapia, tratamento cirúrgico e, alternativamente, acupuntura (HENROTIN, PRIEM, MOBASHERI, 2013; COMBLAIN *et al.*, 2015; BHATHAL *et al.*, 2017).

Cada vez mais os tutores têm prezado pelo bem-estar e qualidade de vida de seus animais. Observa-se, em razão disso, aumento considerável na demanda por tratamentos fisioterapêuticos e alternativos, como a acupuntura. A fisioterapia, além de auxiliar no tratamento convencional, ajuda na prevenção e manutenção da fisiologia. Sua técnica envolve terapia manual – como alongamentos, massagem localizada, amplitude de movimento e

mobilização da articulação –, técnicas de reparação, mobilidade elétrica – que auxilia no controle da dor –, mobilidades térmicas – por exemplo, a crioterapia –, ultrassom terapêutico e sequências de exercícios, buscando o fortalecimento muscular e articular (MILLIS, 2004; LEVINE, 2008; ROBERTSON, 2013).

O tratamento medicamentoso tradicional é realizado através da administração de anti-inflamatórios não esteroides (AINE) e opioides. Os AINE comumente empregados são inibidores preferenciais da cicloxigenase-2 (COX-2), atuando na redução da produção de prostaglandinas pró-inflamatórias, que estimulam o processo doloroso, sensibilizando os nociceptores periféricos. Sua produção ocorre nos tecidos articulares sinoviais, desencadeando o processo inflamatório. O uso desses fármacos pode induzir efeitos adversos no trato gastrointestinal, sendo contraindicados em pacientes que apresentem insuficiência renal ou desidratação (MALFAIT, SCHNITZER, 2013; COMBLAIN *et al.*, 2015; BARROUIM-MELO *et al.*, 2016).

Outra opção de tratamento seria a administração de *nutracêuticos*, que são alimentos ou ingredientes alimentares que possuem ação farmacológica. O vocábulo deriva da aglutinação das palavras “nutrição” e “farmacêutico”. Por disposição legal, não podem apresentar risco de toxicidade ou efeitos adversos. Citam-se como exemplos de nutracêuticos: os ácidos graxos poli-insaturados (ômega-3 e ômega-6), sulfato de condroitina e glucosamina, óleos de abacate e soja insaponificáveis e curcumina (HENROTIN, PRIEM, MOBASHERI, 2013; CODEVILLA *et al.*, 2015; COMBLAIN *et al.*, 2015; BARROUIM-MELO *et al.*, 2016; BHATHAL *et al.*, 2017).

### 2.2.3.1 Sulfato de condroitina e glucosamina

Essas substâncias são aminossacarídeos fundamentais na biossíntese de glicosaminoglicanos (especialmente o ácido hialurônico) e proteoglicanos, que são estruturas essenciais para a formação da cartilagem. O sulfato de condroitina realiza a inibição das enzimas malélicas do fluido articular e cartilagem. Por sua vez, a glucosamina desempenha papel na regulação da síntese de colágeno presente na cartilagem, apresentando também um pequeno efeito anti-inflamatório (BEALE, 2004; HENROTIN, LEMBERT, 2013).

Com o uso destas substâncias (administradas por via oral ou em versão injetável), preserva-se a produção de ácido hialurônico, que é um componente natural da matriz da cartilagem e do fluido sinovial, conferindo-lhe propriedades viscoelásticas (lubrificação das articulações e absorção de choques). Sua síntese ocorre na membrana plasmática, a partir da

glucosamina, sendo fundamental na produção de colágeno, elasticidade e hidratação (WALSH,2010; NUNES, 2016).

### 2.2.3.2 Curcumina

A curcumina é o principal elemento de estudo deste trabalho. Suas características, síntese, ação, entre outras propriedades, serão abordadas ao longo da pesquisa.

## 2.3 CÚRCUMA

A *Curcuma longa* L. é uma planta pertencente à família das *Zingiberaceae*, da qual é parte também o gengibre. É uma planta herbácea, perene, de clima tropical quente e úmido, constituída de um rizoma principal, ovoide, carnudo, possuindo várias ramificações laterais de tamanhos menores. Em condições favoráveis, pode alcançar até 150 cm de altura. Suas folhas são grandes e longas, de coloração verde clara. Exala um cheiro forte, porém agradável, possuindo um sabor um pouco amargo, picante e aromático (SASIKUMAR, 2005; SHISHODIA, SETHI, AGGARWAL, 2005; LORENZI, MATOS, 2008; SILVA FILHO *et al.*, 2009; BARNES, ANDERSON, PHILLIPSON, 2012; GRANDI, 2014).

Essa planta é originária do sudoeste asiático, oriunda das florestas tropicais da Índia, sendo endêmica nessa região. Há registros da cúrcuma em manuscritos gregos que antecedem a Era Comum (EC). É utilizada há mais de 6.000 anos pela medicina Ayurveda, tradicional da Índia Antiga, porém seu uso só foi registrado no país por volta de 4.000 anos AEC. Na China, foi mencionada no século VII, sendo introduzida na Europa muitos séculos depois, nos idos de 1200. Atualmente, não se observa seu crescimento fora dos cultivos humanos (DALBY, 2000; WANG, *et al.*, 2014; FELIPE, 2015; ALONSO, 2016).

A cúrcuma foi introduzida no Brasil no período Colonial, adaptando-se bem em diversas Províncias. Desenvolve-se em solo úmido e argiloso, preferindo regiões tropicais, e se insere principalmente nas regiões que estão os estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás (CECILIO FILHO; VILLAS BOAS, 1996; ALONSO, 2016).

É conhecida popularmente por açafão da Índia, açafão, açafroa, açafroeira, batatinha amarela, açafão-da-terra, cúrcuma, gengibre dourado e mangarataia. Recebe diferentes denominações em outros países, de que são exemplos: *Yurquilla* em Cuba, *Turmeric* na Inglaterra, *Curcumadi levante* na Itália, *Safrandes Indes* na França, Cúrcuma em

Portugal, *Kurkuma* em Alemão, *Haridrae Haldi* pelos indianos (COLLINO, 2014; PERES; VARGAS; SOUZA, 2015; MARCHI *et al.*, 2016).

A parte da planta utilizada tanto na culinária como na medicina é o rizoma, estrutura que contém o principal composto ativo da planta. Para uma maior conservação, o rizoma deve ser moído – ainda fresco ou já seco –, e o pó originado recebe o nome detumérico. É do rizoma que se extrai a curcumina, de uso amplo e diversificado, como conservante, aromatizante, corante natural em bebidas e alimentos, temperos, destacando-se também por suas propriedades: digestiva, antialérgica, antimicrobiana, antiparasitária, dermatológica, oftalmológica, estimulante, cicatrizante, anti-inflamatória, antioxidante, antitrombótica, antilipídica, anticonvulsivante, antiarrítmica, anticancerígena, quimiopreventivas, entre outras. Bem por isso, é administrada no combate a diversas doenças, como as respiratórias, anorexia, doenças hepáticas, doenças do sistema nervoso central, artrite e diabetes (FRANCO CODEVILLA *et al.*, 2015; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; PERES; VARGAS; SOUZA, 2015; MARCHI *et al.*, 2016; MARMITT *et al.*, 2016; SILVA, M. C. *et al.*, 2016; ARROYO-ACEVEDO *et al.*, 2016).

### 2.3.1 Curcumina

A curcumina é um polifenol hidrofóbico, constituído por amido, proteínas, fibras, carbonatos, pigmentos curcuminoides, componentes majoritários não voláteis e óleos essenciais – que têm como constituintes básicos os terpenos voláteis. Há três tipos de curcuminoides ou polifenóis naturais na planta: curcumina (diferuloilmetano), demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina. Os óleos essenciais possuem como componentes principais a tumeronadehidroturmerona e as cetonas aromáticas. A sua composição química é muito variada, sendo sensível a diferenças no plantio, cultivo, tipo de solo, clima, adubação, disponibilidade hídrica e época de colheita (COLLINO, 2014; FRANCO CODEVILLA *et al.*, 2015; PERES; VARGAS; SOUZA, 2015; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; SILVA, M. C. *et al.*, 2016).

Por ser um composto hidrofóbico, a curcumina apresenta baixa solubilidade em água (são obtidos melhores resultados em pH acima de 11,7) e éter. Em razão de sua baixa solubilidade, é pouco absorvida pelo sistema gastrointestinal e eliminada de forma muito rápida, principalmente pelas fezes, e uma parcela insignificante pela urina, resultando em baixa biodisponibilidade no organismo. No entanto, é bem absorvida quando administrada em forma de cápsulas gelatinosas contendo, preferentemente, algum excipiente que atue como

protetor hídrico, a exemplo do amido em pó e da maltodextrina. Também apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos como etanol, metanol, acetona, dimetilformoldeído, dimetilsulfóxido, clorofórmio e acetonitrila (GUIMARÃES, 2010; MOBASHERI, 2013; COLLINO, 2014; FRANCO CODEVILLA *et al.*, 2015; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; HENROTIN; PRIEM; SILVA, M. C. *et al.*, 2016).

Neste estudo, serão abordadas suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, particularmente relevantes para os pacientes com OA. Oportuno registrar que a curcumina atua também nas vias de sobrevivência celular, tais como a apoptose, mecanismo de morte celular programada, responsável pela homeostasia, condição de equilíbrio fisiológico e metabólico do organismo (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

#### 2.3.1.1 Ação anti-inflamatória

A curcumina exerce influência sobre diversas etapas do processo inflamatório. Por exemplo, inibe fatores de transcrição, como o Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) e o Ativador de proteína 1 (AP-1), que desempenham papéis importantes no início do processo da resposta inflamatória, incentivando, assim, a expressão e secreção de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo – essas enzimas ativam e atraem células imunes do organismo (COLLINO, 2014; PERES; VARGAS; SOUZA, 2015; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

O NF- $\kappa$ B é um complexo proteico heterodimérico que, na ausência de estímulos inflamatórios pelo organismo, permanece retido no citoplasma celular, de forma inativa, associado a uma proteína inibitória específica. Quando recebe estímulo adequado, depois de superadas certas etapas, é finalmente liberado dessa proteína (COLLINO, 2014).

Para o aumento da produção do NF- $\kappa$ B, faz-se necessária a presença de ROS no organismo, ativando a sua cascata de formação. Essa proteína é, também, responsável por desencadear a expressão de vários genes relacionados à destruição da cartilagem articular, inflamação da membrana sinovial e reabsorção óssea. A curcumina é capaz de capturar as ROS, de modo a reduzir a ativação do complexo proteico NF- $\kappa$ B, reduzindo, assim, o processo inflamatório (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016).

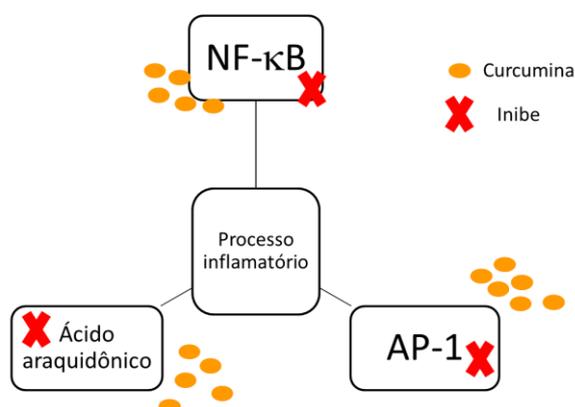
Por sua vez, o AP-1 é um fator de transcrição formado por proteínas homodiméricas e heterodiméricas. A ativação do AP-1 ocorre através de duas vias de sinalização, a *Quinase terminal c-jun-N* (JNK) e a *Quinase controlada pela sinalização*

*extracelular* (ERK), oriundas da cascata *Proteína-quinase ativada por mitógeno* (MAPK). A curcumina inibe a ativação do JNK, obstruindo a ativação do AP-1 (COLLINO, 2014).

A ativação das vias de sinalização NF- $\kappa$ B e AP-1 pode decorrer de vários estímulos orgânicos, por ação de neurotransmissores, neurotrofinas, proteínas neurotóxicas, citocinas, glicocorticóides, ésteres de forbol, peptídeos natriuréticos atriais, ceramidas, endotoxinas de vírus e bactérias, produtos de reações enzimáticas e a COX-2 (COLLINO, 2014).

Ao atuar na inibição desses fatores, a curcumina reduz a expressão e secreção de citocinas, enzimas determinantes para que ocorra a migração de células inflamatórias (atuam na modulação dos sistemas inflamatórios). O uso da curcumina tende a conter essa migração, reduzindo, assim, a presença de mediadores pró-inflamatórios (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

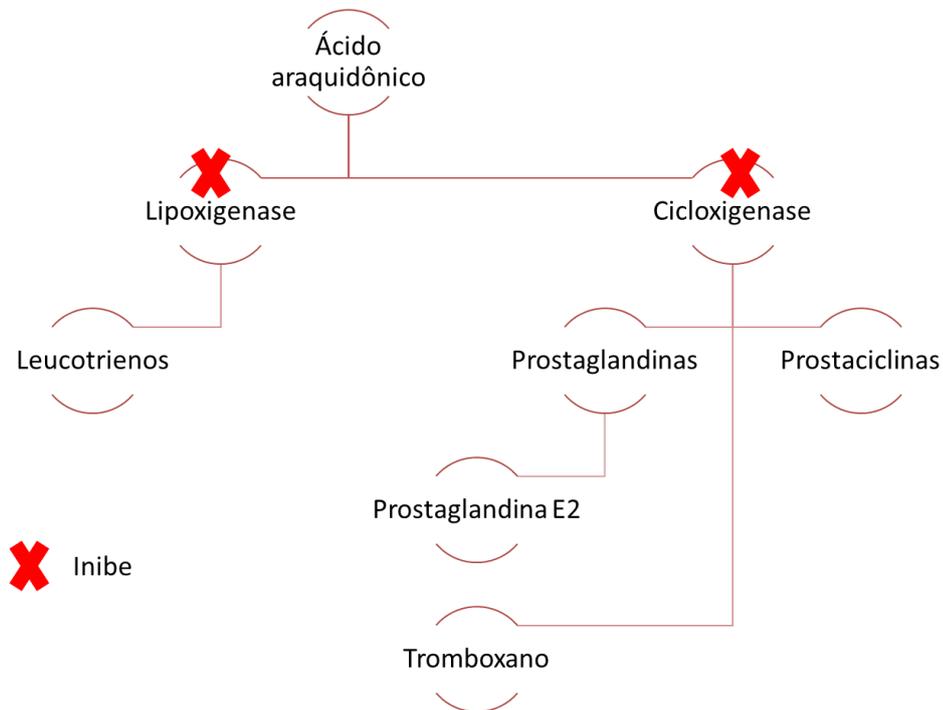
Outra ação da curcumina é sobre a inibição da cascata do ácido araquidônico (cascata da inflamação) (Figura 1), que realiza a biossíntese de eicosanoides, considerados importantes mediadores do processo inflamatório, liberados a partir das membranas celulares pela ação da fosfolipase A2 (PLA2). Essa cascata também gera outros mediadores pró-inflamatórios, como leucotrienos (LT), prostaglandinas (PGs), prostaciclina e tromboxanos (TX). A curcumina constitui-se em óbice à cascata em virtude da inibição da transcrição das enzimas COX-2 e LOX-5, resultando na interrupção da biossíntese dos mediadores pró-inflamatórios (Figura 2) (MURI, SPOSITO, METSAVAHT, 2009; HENROTIN, PRIEM, MOBASHERI, 2013; COLLINO, 2014; PERES, VARGAS, SOUZA, 2015; MARCHI *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Ação inibidora da curcumina sobre a cascata do ácido araquidônico e os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1.

A curcumina promove a inibição da COX-2, enzima estimulada no organismo em resposta às citocinas pró-inflamatórias e em decorrência de alguma lesão celular. A COX-2 é responsável pela formação de PGs. Dentre essas, destaca-se a prostaglandina E2 (PGE2), que desencadeia a dor e a inflamação (intensa ação pró-inflamatória), envolvida tanto em processos agudos como crônicos (SILVA, C. A. T. Da, 2016; SILVA, 2016).

A lisil oxidase (LOX) atua na produção de LTs. A LOX-5, em especial, converte o ácido araquidônico em ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico, precursor dos LTs, que atuam como mediadores pró-inflamatórios, sendo produzidos pelos basófilos, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e neutrófilos. Inibindo-se essa via com o uso da curcumina, tem-se a redução dos mediadores pró-inflamatórios (SILVA, C. A. T. Da, 2016; SILVA, 2016).



**Figura 2.** A curcumina, ao inibir a transcrição da cicloxigenase e lipoxigenase, impede a biossíntese dos mediadores pró-inflamatórios.

Em razão de suas propriedades anti-inflamatórias, a curcumina vem sendo estudada e utilizada no tratamento de diversas doenças que cursam com inflamação, sendo, de modo geral, benéfica aos pacientes. Dada a ausência de registros de toxicidade em estudos clínicos, pode-se afirmar que seu uso é seguro (HENROTIN, PRIEM, MOBASHERI, 2013; COLLINO, 2014; PERES, VARGAS, SOUZA, 2015).

### 2.3.1.2 Ação antioxidante

Além de atuar como substância anti-inflamatória, a curcumina age também como antioxidante natural. Essa propriedade específica advém de sua capacidade em quelar íons metálicos e sequestrar as ROS, cuja formação se dá em consequência do processo inflamatório e dos danos às células cartilaginosas, secundariamente à instalação da osteoartrite (normalmente de forma insidiosa). O aumento nos níveis de ROS decorre do desequilíbrio dos sistemas oxidante e antioxidante do organismo, favorecendo o aparecimento de lesões nas membranas celulares e, mais tardiamente, no DNA celular (ANTUNES *et al.*, 2008; BARROUIN-MELO *et al.*, 2016).

Porém, quando produzidas em quantidades adequadas, como subproduto da respiração celular, e em níveis controlados, as ROS fazem a ativação de diversos genes e participam dos processos de apoptose, coagulação, fertilização ovular, bem como da imunidade inata e adaptativa (ANTUNES *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010; COLLINO, 2014; PERES, VARGAS, SOUZA, 2015).

As ROS são produzidas a partir do oxigênio ( $O_2$ ) metabolizado nas mitocôndrias. Parte do oxigênio consumido na cadeia transportadora de elétrons direciona-se para a formação dos radicais livres. Nessa via, podem ter origem também as espécies reativas de nitrogênio (BARBOSA *et al.*, 2010; COLLINO, 2014).

Os radicais livres são formados não apenas na mitocôndria, membranas celulares e citoplasma, mas também por macrófagos e neutrófilos. São íons, moléculas e átomos que apresentam na sua camada externa elétrons desemparelhados, causadores de instabilidade elétrica e dotados de grande capacidade reativa. Os elétrons livres buscam estabilidade por meio da captura de elétrons de outras moléculas, células ou tecidos do organismo, favorecendo o surgimento de lesões celulares (COLLINO, 2014; RUSSO, BRACARENSE, 2016).

O organismo produz continuamente esses radicais livres, como o superóxido ( $O_2^-$ ), a hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) – contendo espécies reativas de oxigênio –, entre outros, a partir da redução do  $O_2$  em reações específicas, na presença dos íons ferro e cobre. O sistema antioxidante controla o excesso dessas ROS. Contudo, não é rara a ocorrência de desequilíbrio nesse sistema, favorecendo a formação de ROS e desencadeando o dano oxidativo (ANTUNES *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010; COLLINO, 2014).

Os íons ferro e cobre exercem papéis importantes nas reações de óxido-redução, sendo potentes agentes catalizadores no processo de formação dos radicais livres. No organismo, esses íons encontram-se ligados a proteínas específicas, responsáveis pelo seu transporte, estocagem e utilização, não permitindo que fiquem livres e aptos a participarem das reações de óxido-redução que geram radicais livres (BARBOSA *et al.*, 2010; COLLINO, 2014).

O organismo faz o controle das ROS através do sistema natural antioxidante enzimático e não enzimático. Esse sistema age neutralizando as ROS, evitando sua formação e reparando os danos causados por essas espécies químicas. Quando os sistemas oxidante e antioxidante estão em desequilíbrio, causam o acúmulo das ROS. O excesso desses compostos tem por consequência o estresse oxidativo, dando origem a lesões (oxidação lipídica, dano às proteínas, carboidratos e DNA) e favorecendo o envelhecimento celular (ANTUNES *et al.*, 2008; BARBOSA *et al.*, 2010; COLLINO, 2014; PERES, VARGAS, SOUZA, 2015; RUSSO, BRACARENSE, 2016).

O sistema antioxidante enzimático é constituído por enzimas (Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Reduzida (GSH)) que agem através da prevenção, isto é, evitando a instalação do dano oxidativo, mediante o controle da formação dos radicais livres. (BARBOSA *et al.*, 2010; COLLINO, 2014).

As ROS agredem em maior instância a membrana celular (peroxidação lipídica), causando agressão aos ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios da membrana, com a perda parcial de sua integridade pela desintegração dos fosfolipídios, assim como a liberação de ácidos graxos não saturados. Como consequência, ocorrem mudanças em sua estrutura, fluidez, permeabilidade e transporte, impedindo a seletividade da troca iônica pela membrana e incentivando a formação de produtos citotóxicos que desencadeiam a morte celular (ANTUNES *et al.*, 2008; ZIMMERMANN, KIRSTEN, 2008; COLLINO, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016).

A curcumina possui uma ação antioxidante natural, permitindo a doação de elétrons que, ao fim, resulta na estabilização das ROS. Além disso, realiza o sequestro dos radicais livres e possui a capacidade de quelar metais como ferro e zinco, agentes geradores de radicais livres. O controle exercido pela curcumina na formação desses radicais pode diminuir a probabilidade de danos oxidativos às células (COLLINO, 2014; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

## 2.4 ANÁLISE LABORATORIAL DO DANO OXIDATIVO

Os biomarcadores devem apresentar características possíveis de serem avaliadas, indicando normalidade dos processos biológicos, assim como alterações patogênicas ou resposta farmacológica. É ideal que um biomarcador apresente alta especificidade e sensibilidade para a característica que se deseja mensurar no fluido biológico escolhido, sendo igualmente desejável que possibilite uma rápida análise e apresente baixo custo (ZWART *et al.*, 1999; VASCONCELOS, 2007).

### 2.4.1 Capacidade antioxidante total (CAOT)

Existem diversas formas de mensurar a CAOT, a depender da espécie dos radicais gerados, do indicador de oxidação escolhido e do método utilizado. Em todos os casos, tem-se a geração de um radical livre que, ao reagir com determinadas moléculas, produz cor, fluorescência, quimiluminescência, e induz perda ou ganho dos sinais de ressonância do spin eletrônico (ESR). Quando há presença de agentes antioxidantes, ocorrem variações nesses sinais, permitindo sua análise (HALLIWELL, 2006).

### 2.4.2 Capacidade antioxidante específica

É realizada a mensuração de enzimas antioxidantes como: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx) e Glutaciona Redutase (GR). Também são mensurados compostos do sistema antioxidante não enzimático como: glutaciona, Coenzima Q (CoQ), ácido úrico, Vitamina E (tocoferol), Vitamina C (ascorbato),  $\beta$ -caroteno, proteínas de transporte de metais de transição, transferrina, ceruloplasmina etc. (ARMSTRONG, 1998; HALLIWELL, 2006; VASCONCELOS, 2007).

### **2.4.3 Avaliação do dano oxidativo em componentes celulares**

#### **2.4.3.1 Marcador de peroxidação lipídica Malondialdeído (MDA)**

A formação de ROS contribui para a peroxidação lipídica, gerando lesões às membranas celulares, pelo acometimento de seus ácidos graxos poli-insaturados. A ruptura desses ácidos graxos dá origem ao chamado MDA, considerado o biomarcador geral dos danos oxidativo na membrana celular. Existem outras técnicas para avaliação do dano oxidativo: marcador de peroxidação lipídica hidroxinonenal, marcador de peroxidação lipídica isoprostano e marcador de dano oxidativo às proteínas – grupo carbonila (KADIISKA *et al.*, 2005).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS PROPOSTOS

O estudo será realizado no Hospital Veterinário Unisul, na Universidade do Sul de Santa Catarina, na unidade de Tubarão, Santa Catarina, sob consentimento por escrito dos tutores dos cães, bem como autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), requerida sob o protocolo n.º 17.019.5.05.IV.

Participarão da pesquisa cães com diagnóstico de osteoartrite na articulação coxofemoral, acima de 18 meses de idade, sem restrições quanto à raça, sexo ou porte do paciente. Os cães com diagnóstico de osteoartrite na articulação coxofemoral deverão apresentar dor crônica (sinais clínicos de dor por pelo menos 3 meses), além de o tutor haver relatado ao menos dois dos seguintes sinais clínicos associados à displasia coxofemoral: dificuldade em levantar-se ou deitar-se, dificuldade em saltar, dificuldade em subir ou descer escadas ou claudicação.

O grau de displasia coxofemoral será medido de acordo com o padrão estabelecido pela avaliação das radiografias das articulações coxofemorais, classificado em 5 níveis, de A a E, de acordo com a Federação Cinológica Internacional (FLÜCKIGER, 1993), em que a categoria A representa articulações normais e E, articulações gravemente afetadas.

Nenhum dos animais poderá estar em tratamento com qualquer tipo de analgésico (AINE ou corticosteroides), tampouco submetido a terapias alternativas, como fisioterapia e acupuntura, a partir de 8 semanas que antecederem o estudo. Não serão incluídos os cães que apresentarem grave incapacidade de locomoção, transtorno musculoesquelético coexistente, ou os que possuam alterações gastrointestinais, hepática, do trato biliar, renal, doença neurológica ou terminal. Não serão incluídas, ainda, fêmeas gestantes ou amamentando, tampouco os animais que tenham sensibilidade conhecida a qualquer medicamento do estudo.

Será realizado um estudo duplo-cego, controlado, em que os cães serão distribuídos aleatoriamente com o auxílio de um *software* (<https://www.randomizer.org/>).

Para a atribuição do tratamento, os cães receberão números consecutivos com base na ordem de inclusão no estudo. Após a inclusão, o assistente de pesquisa entregará o tratamento para o tutor de cada paciente conforme os números atribuídos.

Serão formados dois grupos: grupo 1 (n=10; controle), vinculado ao tratamento com meloxicam, administrado a cada 24 horas, à dose de 0,2 mg/kg no primeiro dia, reduzida a 0,1 mg/kg nos 5 dias seguintes, e também os condroprotetores sulfato de condroitina e

glucosamina durante 60 dias (cães de 5 a 19,9 kg: 950 mg de glucosamina e 700 mg de condroitina; de 20 a 40 kg: 1.425 mg de glucosamina e 1.050 mg de condroitina; e cães com mais de 40 kg: 1.900mg de glucosamina e 1.400 mg de condroitina); e grupo 2 (n=10), vinculado ao mesmo tratamento prescrito acima, associado ao adjuvante curcumina, na dosagem de 25mg/kg, uma vez ao dia, durante 60 dias, por via oral. Todos os medicamentos e nutracêuticos usados neste estudo serão fornecidos pela empresa patrocinadora Drogavet.

Os tutores deverão manter o protocolo de tratamento por 60 dias, de conformidade com os grupos descritos. Os cães serão reavaliados no 30º e 60º dia. Qualquer evento adverso será registrado e corrigido durante o estudo.

Os pacientes serão avaliados no período de pré-tratamento e após 30 e 60 dias de seu início, mediante coleta de amostra de sangue por venopunção, usando sistema a vácuo, com agulha 21G de 2 ml em tubo de ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA K2). As amostras de sangue serão encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica (LAPAC) do Hospital Veterinário Unisul. Então, serão centrifugadas (1120 x g por 10 minutos) para obtenção do soro, que será armazenado em microtubos a -30°C e encaminhado para o Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em que o dano oxidativo será determinado através do leitor de microplaca multimodo (Spectramax M5, Molecular Devices Inc., CA, USA).

O dano oxidativo aos lipídios será quantificado pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DRAPER *et. al.*, 1990). Brevemente, as amostras serão homogeneizadas em tampão fosfato e desproteinizadas com ácido tricloroacético 10%. A reação ocorrerá ao se adicionar ácido tiobarbitúrico 0,67%, aquecendo-se a 100 °C por 15 min. A absorbância será realizada a 532 nm em espectrofotômetro utilizando-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados serão expressos em nmol de malondialdeído equivalente por mg de proteína.

O dano oxidativo às proteínas será quantificado pela determinação dos níveis de grupos carbonilas, através da reação com dinitrofenilhidrazina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (LEVINE *et. al.*, 1990). Brevemente, as proteínas serão precipitadas com ácido tricloroacético 20% e redissolvidas em dinitrofenilhidrazina. A absorbância será realizada a 370 nm em espectrofotômetro. Os resultados serão expressos em nmol/mg de proteína. A concentração de nitrito/nitrato, metabólito estável do NO, será determinada pela reação de Griess (GREEN *et. al.*, 1982). A reação será realizada pela adição do reagente de Griess (0,1% naphthylethylendiamide dihydrochloride e 1% sulfanilamida, proporção 1:1) e cloreto de Vanadium (III) à amostra previamente homogeneizada em tampão fosfato. Após 1h de

incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorvância será realizada a 550 nm em espectrofotômetro. Os resultados serão expressos em nmol/mg de proteína. A quantificação de proteínas totais será realizada para normalização das dosagens realizadas. O método utilizado será o proposto por Lowry *et al.*, que utiliza albumina bovina sérica como padrão (LOWRY *et al.*, 1951). A absorvância será realizada a 700 nm. Os resultados serão expressos em mg de proteínas.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS REALIZADOS

Por limitações de tempo e número reduzido de participantes, formou-se apenas um grupo (n=4), de cães de grande porte, vinculado ao tratamento com os condroprotetores sulfato de condroitina e glucosamina durante 10 dias (cães de 5 a 19,9 kg: 950 mg de glucosamina e 700 mg de condroitina; de 20 a 40 kg: 1.425 mg de glucosamina e 1.050 mg de condroitina; e cães com mais de 40 kg: 1.900mg de glucosamina e 1.400 mg de condroitina) em associação com o adjuvante curcumina, na dosagem de 25mg/kg, uma vez ao dia, durante 10 dias, por via oral e administrados pelos tutores em suas residências, após a alimentação dos cães.

Foi realizado hemograma e avaliação da função renal e hepática no período de pré-tratamento e após 10 dias de seu início, mediante coleta de amostra de sangue por venopunção, usando sistema a vácuo, com agulha 21G de 2 ml em tubo de ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA K<sub>2</sub>) e 3 ml em tubo com ativador de coagulo. As amostras de sangue foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica (LAPAC) do Hospital Veterinário Unisul. As amostras foram centrifugadas (1120 x g por 10 minutos) para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos a -30°C e encaminhado para o Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos – Neuroimet.

O dano oxidativo aos lipídios foi quantificado pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DRAPER *et al.*, 1990). Brevemente, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato e desproteinizadas com ácido tricloroacético 10%. A reação ocorreu ao se adicionar ácido tiobarbitúrico 0,67%, aquecendo-se a 100 °C por 15 min. A absorvância foi realizada a 532 nm em espectrofotômetro (NOVA1103, Novainstruments) utilizando-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído equivalente por mg de proteína.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A média do dano oxidativo aos lipídios e os registros de eritrograma, leucograma e bioquímico foram comparados entre os grupos. Para tanto, adotou-se o procedimento estatístico *Wilcoxon*, considerando-se como diferença significativa valor- $p < 0,05$  (ou seja, nível de significância  $\alpha = 0,05$ ), obtido com o auxílio da ferramenta (*software*) *GraphPad Prism 7.03 for Windows*.

#### **4 RESULTADOS**

Os resultados serão apresentados e discutidos na forma de artigo científico, estruturado de acordo com as normas da revista *Veterinary Record* (ANEXO 1).

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO

### EFEITO DA CURCUMINA SOBRE OS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM OSTEOARTRITE

#### *CURCUMIN'S EFFECT ON OXIDATIVE STRESS MARKERS IN DOGS AFFLICTED BY OSTEOARTHRITIS*

Alexandra Adam<sup>1</sup>; Débora Maria Marques Callado de Oliveira, Ma.<sup>2</sup>; Silvia Resende Terra, Dra. <sup>3</sup>; Mariana Goldim, Ma.<sup>3</sup>

1. Estudante de veterinária da Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina. Brasil
2. Professora de Medicina Veterinária, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, Santa Catarina. Brasil
3. Colaboradoras

E-mail para correspondência: alexandra.adam94@gmail.com

#### **Resumo**

A osteoartrite (OA) é considerada uma doença sem cura, dada a inexistência de agentes terapêuticos capazes de restabelecer a articulação em seu aspecto fisiológico. Por outro lado, sabe-se que a curcumina apresenta ação anti-inflamatória e antioxidante, atuando, sobretudo, na redução do processo inflamatório e no combate às espécies reativas de oxigênio. A pesquisa foi desenvolvida no sentido de avaliar o efeito da curcumina sobre os marcadores de dano oxidativo aos lipídios. O estudo foi realizado no Hospital Veterinário Unisul com a participação de 4 cães, todos com idade superior a 9 anos, diagnosticados com osteoartrite secundária a displasia coxofemoral, avaliados durante dez dias. O delineamento experimental foi uniforme, e o tratamento consistiu na administração dos condroprotetores sulfato de condroitina e glucosamina em associação com o adjuvante curcumina. Procedeu-se à coleta de sangue antes e depois, com vistas à análise do dano oxidativo aos lipídios e determinação de parâmetros hematológicos, função renal e hepática. A medida de evidência da amostra (valor-*p*) foi superior ao nível de significância definido para o estudo ( $\alpha = 0,05$ ), mas houve redução do dano em 75% dos indivíduos, atribuível ao efeito antioxidante da curcumina nos condrócitos e citocinas.

**Palavras-chave:** dano oxidativo, inflamação, espécies reativas de oxigênio, nutracêuticos, *Curcuma longa* L.

## Abstract

Osteoarthritis (OA) is considered an incurable disease, due to the fact that, at present, there are not any effective therapeutic agents for repairing joint integrity. Nonetheless, it is known that curcumin has anti-inflammatory and antioxidant properties, thereby reducing inflammation and reactive oxygen species levels. The purpose of the research was to evaluate the curcumin's effect on markers of lipid oxidative damage. This study was performed at the Unisul Veterinary Hospital (HVU, from the acronym in Portuguese), involving 4 large dogs (three of them females), all older than 9 years, diagnosed with osteoarthritis secondary to hip dysplasia, which were treated for ten successive days. The experiment conduction was uniform, and the treatment consisted of a combined administration of chondroprotectives agents (chondroitin sulfate and glucosamine) and curcumin as adjuvant. Blood was collected before and after the treatment, in order to analyze the oxidative damage to lipids, and determine hematological parameters, with liver and renal function profiles. The adopted measure of evidence (p-value) was greater than the significance level defined for this study ( $\alpha = 0.05$ ), although there was a reduction in the oxidative damage in 75% of sample members, which can be attributed to the curcumin's antioxidant effect on chondrocytes and cytokines.

**Keywords:** oxidative damage, inflammation, reactive oxygen species, nutraceuticals, *Curcuma longa* L.

## Introdução

O reconhecimento da OA como doença autônoma deu-se no final do século XVIII, classificando-se atualmente como uma enfermidade musculoesquelética degenerativa, inflamatória e crônica, que se manifesta de forma progressiva e lenta. Apresenta-se clinicamente pela presença de claudicação, incapacidade funcional, crepitação, rigidez articular, atrofia muscular e dor (Malfait & Schnitzer 2013, Ramírez-Flores and others 2017).

Até o momento, não há cura conhecida para a OA, existindo apenas tratamentos paliativos, de forma medicamentosa – ou com a administração de *nutracêuticos* –, e de forma não farmacêutica, através da perda de peso, fisioterapia, tratamento cirúrgico e, alternativamente, acupuntura (Comblain and others 2015, Bhathal and others 2017).

*Nutracêuticos* são alimentos ou ingredientes alimentares que possuem ação farmacológica. O vocábulo deriva da aglutinação das palavras “nutrição” e “farmacêutico”. Por disposição legal, não podem apresentar risco de toxicidade ou efeitos adversos (Codevilla and others 2015, Comblain and others 2015, Barrouim-Melo and others 2016, Bhathal and others 2017).

Destaca-se como exemplo de nutracêutico a curcumina, pigmento isolado a partir da *Curcuma longa* L., planta pertencente à família das *Zingiberaceae*, em que se inclui também o gengibre. A estrutura da planta utilizada tanto na culinária como na medicina é o rizoma, de onde se extrai a curcumina, o principal composto ativo da planta (Peres and others 2015, Marchi and others 2016, Marmitt and others 2016, Silva and others 2016).

A curcumina exerce influência sobre diversas etapas do processo inflamatório. Por exemplo, inibe fatores de transcrição, como o Fator Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) e o Ativador de proteína 1 (AP-1), que desempenham papéis importantes no início do processo da resposta inflamatória (Collino 2014, Peres and others 2015, Sueth-Santiago and others 2015). Outra ação da curcumina é sobre a inibição da cascata do ácido araquidônico (cascata da inflamação). A curcumina constitui-se em óbice à cascata em virtude da inibição da transcrição das enzimas COX-2 e LOX-5 (Muri and others 2009, Collino 2014, Peres and others 2015, Marchi and others 2016).

Além de atuar como substância anti-inflamatória, a curcumina age também como antioxidante natural. Essa propriedade específica advém de sua capacidade em quelar íons metálicos e sequestrar espécies reativas de oxigênio (ROS). O aumento nos níveis de ROS decorre do desequilíbrio dos sistemas oxidante e antioxidante do organismo, favorecendo o aparecimento de lesões nas membranas celulares e, mais tardiamente, no DNA celular (Antunes and others 2008, Barrouin-Melo and others 2016).

A ação antioxidante da curcumina compreende, além da doação de elétrons que culmina na estabilização das ROS, o controle da própria formação dos radicais livres, contribuindo para a diminuição da probabilidade de danos oxidativos às células (Collino 2014, Sueth-Santiago and others 2015).

Considerando a relevância desses atributos, esta pesquisa buscou aferir a eficácia da curcumina como adjuvante no tratamento de cães com osteoartrite mediante a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo aos lipídios, eritrograma, leucograma e bioquímico.

## **Materiais e métodos**

O estudo foi realizado no Hospital Veterinário Unisul, na Universidade do Sul de Santa Catarina, na unidade de Tubarão, Santa Catarina, sob consentimento por escrito dos tutores dos cães, bem como autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), requerida sob o protocolo n.º 17.019.5.05.IV.

Participaram da pesquisa 4 cães com diagnóstico de osteoartrite secundária a displasia coxofemoral, acima de 18 meses de idade, sem restrições quanto à raça, sexo ou porte do paciente. Os cães com diagnóstico de osteoartrite na articulação coxofemoral apresentavam dor crônica (sinais clínicos de dor por pelo menos 3 meses), além de o tutor haver relatado ao menos dois dos seguintes sinais clínicos associados à displasia coxofemoral: dificuldade em levantar-se ou deitar-se, dificuldade em saltar, dificuldade em subir ou descer escadas ou claudicação.

O grau de displasia coxofemoral foi medido de acordo com o padrão estabelecido pela avaliação das radiografias das articulações coxofemorais, classificado em 5 níveis, de A a E, de acordo com a Federação Cinológica Internacional (FLÜCKIGER, 1993), em que a categoria A representa articulações normais e E, articulações gravemente afetadas. Apenas cães diagnosticados com grau C, D e E fizeram parte deste estudo.

Nenhum dos animais estava em tratamento com qualquer tipo de analgésico (AINE ou corticosteroides), tampouco terapias alternativas, como fisioterapia e acupuntura, a partir de 8 semanas que antecederam o estudo. Não foram incluídos cães que apresentaram grave incapacidade de locomoção, transtorno musculoesquelético coexistente, ou que possuíam alterações gastrointestinais, hepática, do trato biliar, renal, doença neurológica ou terminal. Não foram incluídas, ainda, fêmeas gestantes ou amamentando, tampouco animais que tivessem sensibilidade conhecida a qualquer medicamento do estudo.

Formou-se um grupo (n=4), de cães de grande porte, vinculado ao tratamento com os condroprotetores sulfato de condroitina e glucosamina durante 10 dias (cães de 5 a 19,9 kg: 950 mg de glucosamina e 700 mg de condroitina; de 20 a 40 kg: 1.425 mg de glucosamina e 1.050 mg de condroitina; e cães com mais de 40 kg: 1.900mg de glucosamina e 1.400 mg de condroitina) em associação com o adjuvante curcumina, na dosagem de 25mg/kg, uma vez ao dia, durante 10 dias, por via oral. Os nutracêuticos utilizados neste estudo foram administrados pelos tutores em suas residências, após a alimentação dos cães.

Foi realizado hemograma e avaliação da função renal e hepática no período de pré-tratamento e após 10 dias de seu início, mediante coleta de amostra de sangue por

venopunção, usando sistema a vácuo, com agulha 21G de 2 ml em tubo de ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA K<sub>2</sub>) e tubo com ativador de coagulo. As amostras de sangue foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica (LAPAC) do Hospital Veterinário Unisul. As amostras com ativador de coagulo foram centrifugadas (1120 x g por 10 minutos) para obtenção do soro, que foi armazenado em microtubos a -30°C e encaminhado para o Laboratório de Neurobiologia de Processos Inflamatórios e Metabólicos – Neuroimet.

O dano oxidativo aos lipídios foi quantificado pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DRAPER *et. al.*, 1990). Brevemente, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato e desproteinizadas com ácido tricloroacético 10%. A reação ocorreu ao se adicionar ácido tiobarbitúrico 0,67%, aquecendo-se a 100 °C por 15 min. A absorbância foi realizada a 532 nm em espectrofotômetro (NOVA1103, Novainstruments) utilizando-se 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído equivalente por mg de proteína.

### **Análise estatística**

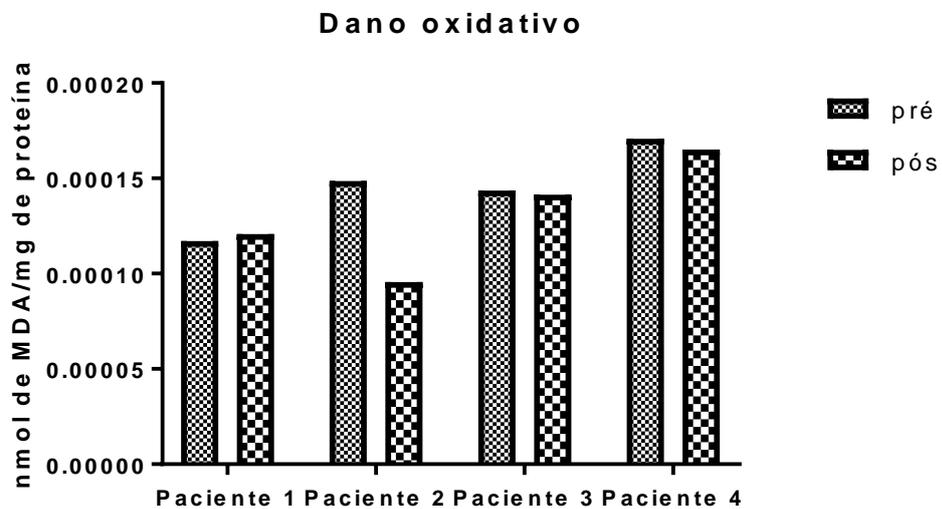
A média do dano oxidativo aos lipídios e os registros de eritrograma, leucograma e bioquímico foram comparados entre os grupos. Para tanto, adotou-se o procedimento estatístico *Wilcoxon*, considerando-se como diferença significativa valor-*p* < 0,05 (ou seja, nível de significância  $\alpha = 0,05$ ), obtido com o auxílio da ferramenta (*software*) *GraphPad Prism 7.03 for Windows*.

### **Resultados**

Os cães analisados possuíam idade superior a 9 anos e peso acima de 25 kg. Aos indivíduos da amostra (n=4) foram administrados, uma vez ao dia, os condroprotetores glucosamina (de 1.425 a 1.900 mg) e condroitina (de 1.050 a 1.400 mg), associados ao adjuvante curcumina, na proporção de 25mg/kg (a dosagem variou de 665 a 1.292 mg). Manteve-se o protocolo de tratamento por 10 dias consecutivos.

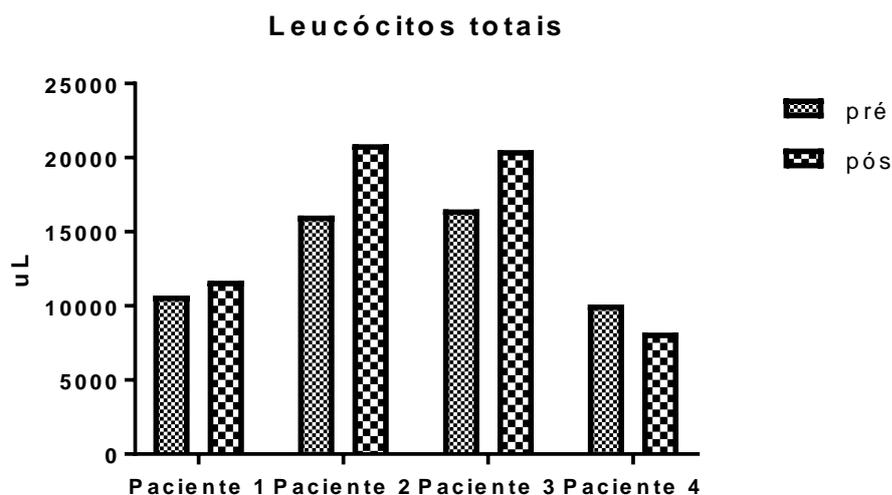
A magnitude estatística do valor-*p* (medida de evidência adotada), apurado a partir da mediana dos valores absolutos obtidos através dos exames, foi a seguinte: dano

oxidativo ( $p < 0,18$ ); eritrócito ( $<0,43$ ); leucócito ( $<0,18$ ); neutrófilo ( $<0,31$ ); linfócito ( $<0,18$ ); e monócito ( $<0,18$ ). Dessa forma, não se verificou significância estatística, embora a circunstância possa ser atribuída ao tamanho reduzido da amostra (a tendência é de que amostras pequenas produzam valores- $p$  maiores). Isso não significa, no entanto, que a pesquisa realizada não tenha relevância. Em favor do estudo, constatou-se importante tendência na redução do dano oxidativo, verificada em 75% da amostra declínio no dano oxidativo (Gráfico 1).



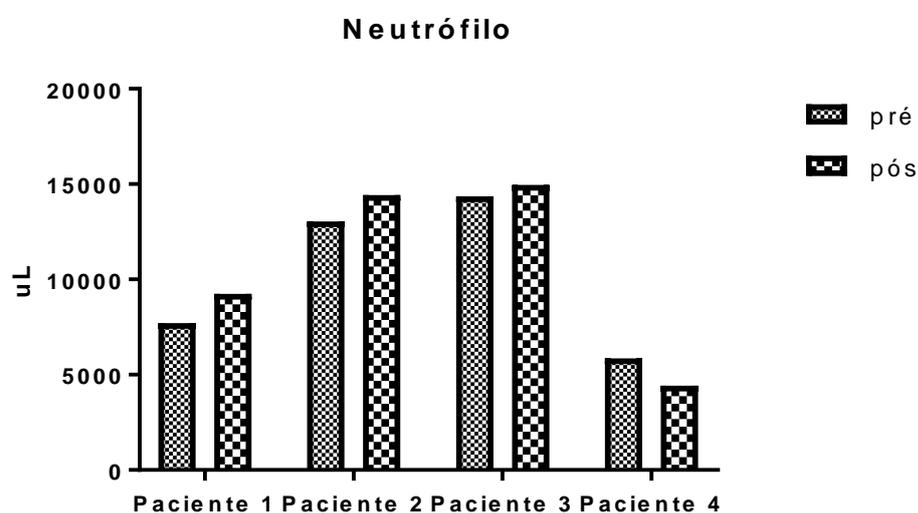
**Gráfico 1.** Gráfico de coluna indicando declínio no dano oxidativo (pacientes 2, 3 e 4), apurado após o tratamento de 10 dias com o adjuvante curcumina, conforme a técnica de dano oxidativo aos lipídios.

Por sua vez, os valores de leucócitos totais apresentavam-se dentro dos intervalos de referência (6.000-17.000) em 50% (2/4) da amostra. Após o tratamento (10 dias), verificou-se leucocitose (~20.500). Um quarto da amostra (25%) apresentou aumento, embora dentro dos intervalos de referência, e o último quarto (25%) apresentou declínio dentro do mesmo intervalo. Verificou-se leucocitose por neutrofilia em 50% da amostra, o que se atribui a um processo inflamatório agudo dérmico iniciado de forma independente e concomitante ao tratamento, de natureza possivelmente infecciosa. (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** Gráfico de coluna indicando leucocitose em 50% da amostra (pacientes 2 e 3). Valores apurados após 10 dias de tratamento, por meio de leucograma.

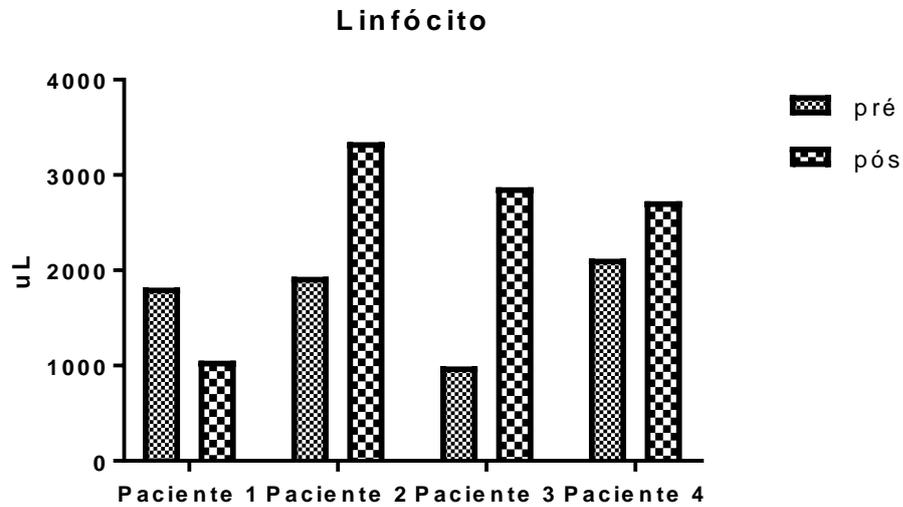
Adiante, 75% (3/4) da amostra apresentou aumento na contagem de neutrófilos, sendo que 50% já apresentava neutrofilia antes do início do tratamento. Apenas um indivíduo (25% da amostra) apresentou declínio, porém dentro dos intervalos de referência (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Gráfico de coluna indicando neutrofilia em 75% da amostra. Valores apurados após 10 dias de tratamento, por meio de leucograma.

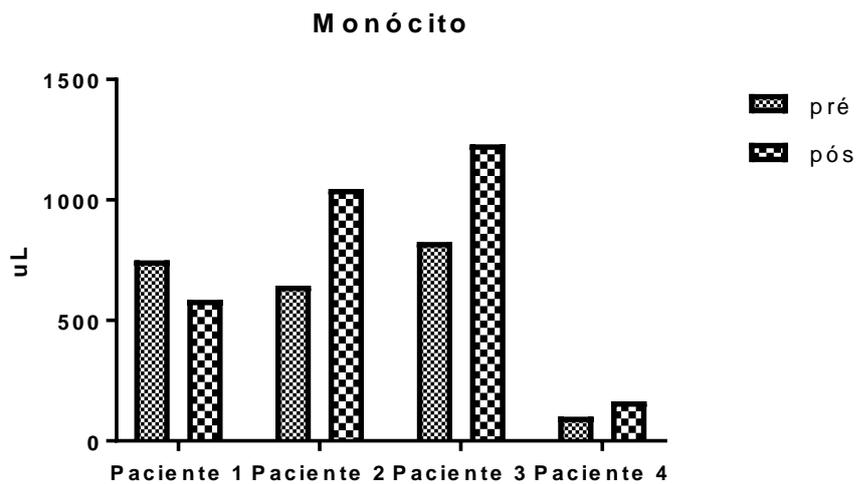
No que diz respeito aos linfócitos, verificou-se que 25% da amostra apresentou decréscimo na sua contagem, porém sem extrapolar os valores de referência. O restante da amostra (75%, ou três indivíduos) apresentou incremento, também dentro dos valores de

referência. Dentre estes, todavia, um indivíduo (25%) apresentava linfopenia antes do início do tratamento, normalizando-se ao final do estudo (Gráfico 5).



**Gráfico 5.** Gráfico de coluna indicando leucopenia em 25% da amostra (paciente 3). Valores apurados após 10 dias de tratamento, por meio de leucograma.

Obteve-se incremento na contagem de monócitos em 75% da amostra, e declínio em apenas um indivíduo (25%). Este, no entanto, apresentava monopenia antes do tratamento, normalizando-se ao final do estudo (Gráfico 6).



**Gráfico 6.** Gráfico de coluna indicando monopenia em 25% da amostra antes do início do tratamento (paciente 4), bem como aumento geral, dentro da normalidade, ao final do estudo. Valores apurados após 10 dias de tratamento, por meio de leucograma.

Finalmente, registra-se que não houve alterações *perceptíveis* nos parâmetros bioquímicos (creatinina e ALT). Salienta-se, porém, que a análise de albumina, urinálise e pressão arterial poderia melhor discriminar eventuais alterações.

## **Discussão**

O resultado vai ao encontro da sugestão de diversos autores de que o efeito antioxidante exercido pela curcumina seria mais visível nos condrócitos e citocinas, inibindo, por via reflexa, a formação de ROS (Zhang and others 2016). Essa circunstância, por si só, sugere um efeito positivo da curcumina na diminuição da progressão da doença. Todavia, a pesquisa não abrangeu o diagnóstico de dor e a avaliação de seus respectivos parâmetros (evolução e resposta).

Em estudos anteriores, a curcumina apresentou ação positiva sobre os condrócitos, estimulando seu metabolismo e impedindo de se tornarem apoptóticos, em grande medida devido à inibição das vias sinalizadas pelo NF- $\kappa$ B, que desempenha papel fundamental na patogênese da OA, sobretudo incentivando a expressão e secreção de citocinas e quimiocinas envolvidas no processo inflamatório (Csaki and others 2009, Sueth-Santiago and others 2015).

No que diz respeito ao presente estudo, acredita-se que teria sido possível constatar, além da redução do dano oxidativo (efetivamente verificada em 75% da amostra), elementos concretos indicando a diminuição do próprio processo inflamatório, se o tratamento proposto com o adjuvante curcumina e a respectiva coleta e análise dos dados tivessem se prolongado por período de tempo mais significativo. Todavia, deve-se ressaltar a relevância dos resultados obtidos na redução do dano oxidativo.

As análises laboratoriais realizadas para avaliar eritrograma, leucograma e bioquímico – função renal e função hepática – mostraram-se ainda mais importantes no decorrer do estudo. De início, visavam apenas à monitoração e percepção de eventuais alterações. Ao final, sustentaram o conceito da curcumina como um composto natural que não provoca reações adversas no organismo animal (Comblain and others 2015, Assumpção 2016, Barrouim-Melo and others 2016).

Os monócitos e linfócitos estão frequentemente presentes na inflamação, na medida em que são responsáveis pela secreção de citocinas, destacando-se dentre elas o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), que são as moléculas proteicas

mais importantes no processo fisiopatológico da OA. Verificou-se que 75% da amostra apresentou aumento nos seus valores. A monocitose é particularmente comum em cães com inflamações crônicas, devido ao quadro inflamatório persistente, que estimula a formação de ROS e a produção de citocinas (Ciarlini 2004, Thrall and others 2007, Laurino 2009, Barbosa 2013). Contudo, há referência na literatura a respeito de possível ação inibitória da curcumina sobre o recrutamento de leucócitos, de forma a impedir a secreção de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Fattori and others 2015). Neste estudo, porém, talvez em razão do reduzido tempo de tratamento, obtiveram-se resultados distintos neste aspecto. Salienta-se, no entanto, que 50% da amostra apresentou, no período de realização da pesquisa, processo inflamatório agudo dérmico, de natureza possivelmente infecciosa – portanto, não relacionada ao tratamento conduzido –, o que pode explicar a discrepância verificada.

Por fim, a circunstância de 50% da amostra ter apresentado neutrofilia, antes mesmo de iniciado o tratamento, deve-se provavelmente à secreção de citocinas que se segue ao quadro inflamatório gerado pela OA, estimulando a liberação dos neutrófilos para a corrente sanguínea (Laurino 2009).

## **Conclusão**

Dadas as condicionantes do estudo, sobretudo as limitações relacionadas ao tempo de tratamento, não se pôde evidenciar maior redução do dano aos lipídios. Apesar disso, os dados coletados indicaram efeito positivo sobre os marcadores de estresse oxidativo e melhora nos parâmetros eritrocitários e leucocitários.

A mudança positiva da resposta imunológica, verificada em mais de um aspecto, pode ser resultado do efeito antioxidante da curcumina sobre os condrócitos e citocinas. Contudo, certas características de sua interação com os linfócitos e com o sistema imune em geral ainda precisam ser investigadas.

Acredita-se que o elastecimento do intervalo de estudo deva proporcionar resultados ainda mais relevantes do ponto de vista científico. A pesquisa também teve como limitação o número reduzido de participantes, circunstância que pode ser atribuída a diversos constrangimentos, como acesso a pacientes, critérios de inclusão, entre outros.

É possível afirmar, no entanto, que o estudo teve relevância, embora não traduzida em significância estatística. De todo modo, recomenda-se a ampliação da amostra em pesquisas futuras, de forma a viabilizar a obtenção de resultados estatisticamente expressivos.

## Referências

- ANTUNES, M.V., LAZZARETTI, C., GAMARO, G.D. & LINDEN, R. (2008) Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 44, 279-287.
- ARAÚJO, E.S., GARCIA, R.S., DAMBRÓS, B., PIENIZ, S., SCHNEIDER, A. & ABIB, R.T. (2016) Impacto da suplementação de vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutathiona reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida. *Revista de Nutrição* 29, 579-587.
- ASSUMPCÃO, A.E. (2016) Desenvolvimento de formulação fitoterápica com extrato de alcachofra (*Cynara scolymus*) e batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) e atividade lipêmica em cães obesos. 109 f. Dissertação (Mestrado) – PPG Ciência da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão.
- BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.C.G., DE PAULA, S.O., MINIM, V.P.R. & BRESSAN, J. (2010) Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição* 23, 629-643.
- BARBOSA, V.S. (2013) Estudo da heterogeneidade de monócitos de cães infectados ou não por leishmania infantum. 73 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BARROUIN-MELO, S.M., ANTURANIEMI, J., SANKARI, S., GRIINARI, M., ATROSHI, F., OUNJAIJEAN, S. & HIELM-BJORKMAN, A.K. (2016) Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil. *Lipids In Health And Disease* 15, 1-16.
- BHATHAL, A., SPRYSZAK, M., LOUIZOS, C. & FRANKEL, G. (2017) Glucosamine and chondroitin use in canines for osteoarthritis: A review. *Open Veterinary Journal* 7, 36-49.
- CIARLINI, P.C., PATRÍCIO, R.F., COUTO, R. & BONELLO, F.L. (2004) Efeito da vacina polivalente sobre o leucograma e o metabolismo oxidativo dos neutrófilos em cães. *Arquivos do Instituto Biológico* 71, 323-327.
- CODEVILLA, C.F. Incorporation of curcumin into nanostructured systems: A review. *Ciência e Natura* 37, 152-163.
- COLLINO, L. (2014) Curcumina: de Especiaria à Nutracêutico. 88 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia-bioquímica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- COLITTI, M., GASPARDO, B., DELLA, P.A., SCAINI, C. & STEFANON, B. (2012) Transcriptome modification of white blood cells after dietary administration of curcumin and non-steroidal anti-inflammatory drug in osteoarthritic affected dogs. *Veterinary Immunology Immunopathol* 147, 46-136.

COMBLAIN, F., SERISIER, S., BARTHELEMY., BALLIGAND, M. & HENROTIN, Y. (2015) Review of dietary supplements for the management of osteoarthritis in dogs in studies from 2004 to 2014. *Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics* 39, 1-15.

CSAKI, C., MOBASHERI, A. & SHAKIBAEI, M. (2009) Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Research & Therapy* 11, 1-17.

FATTORI, V., RIBEIRO, F.A.P., BORGHI, S.M., ALVES-FILHO, J.C., CUNHA, T.M., CUNHA, F.Q. & VERRI, W.A. (2015) Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- $\kappa$ B activation. *Inflammation Research* 64, 993-1003.

LAURINO, F. (2009) Alterações hematológicas em cães e gatos sob estresse. 18 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

MALFAIT, A. & SCHNITZER, T. J. (2013) Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 9, 654-664.

MARCHI, J.P., TEDESCO, L., MELO, A.C., FRASSON, A.C., FRANÇA, V.F., SATO, S.W. & LOVATO, E.C.W. (2016) *Curcuma longa* L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. *Arquivo de Ciência da Saúde UNIPAR* 20, 189-194.

MARMITT, D.J., REMPEL, C., GOETTERT, M.I. & SILVA, A.C. (2016) Análise da produção científica do *Curcuma longa* L. (açafrão) em três bases de dados após a criação da RENISUS. *Revista Pan-amazônica de Saúde* 7, 71-77.

MURI, E.M.F., SPOSITO, M.M.M. & METSAVAHT, L. (2009) Nonsteroidal antiinflammatory drugs and their local pharmacology. *Revista Acta Fisiátrica* 16, 186-190.

PERES, A.S., VARGAS, E.G.A. & SOUZA, V.R.S. (2015) Propriedades funcionais da cúrcuma na suplementação nutricional. *Revista interdisciplinar Pensamento Científico – REINPEC* 1, 218-229.

RAMÍREZ-FLORES, G.I., ANGEL-CARAZA, J.D., QUIJANO-HERNÁNDEZ, I.A., HULSE, D.A., BEALE, B.S. & VICTORIA-MORA, J.M. (2017) Correlation between osteoarthritic changes in the stifle joint in dogs and the results of orthopedic, radiographic, ultrasonographic and arthroscopic examinations. *Veterinary Research Communications* 41, 129-137.

SILVA, M.C., NASCIMENTO, I., RIBEIRO, V.C. & FOOK, M.V.L. (2016) Evaluation of the obtaining method of chitosan/ curcumin scaffolds on the structure, morphology and thermal properties. *Revista Matéria* 21, 560-568.

SUETH-SANTIAGO, V., MENDES-SILVA, G.P., DECOTÉ-RICARDO, D. & LIMA, M.E.F. (2015) Curcumin, the golden powder from turmeric: insights into chemical and biological activities. *Química Nova* 38, 538-552.

THRALL, M.A., BAKER, D.C., CAMPBELL, T.W., DENICOLA, D., FETTMAN, M.J., LASSEN, E.D., REBAR, A. & WEISER, G. (2007) Hematologia e bioquímica clínica veterinária. São Paulo: Roca. 582 p.

ZHANG, Z., LEONG, D., XU, L., HE, Z., WANG, A., NAVATI, M., KIM, S.J., HIRSH, D.M., HARDIN, J.A., COBELLI, N.J., FRIEDMAN, J.M. & SUN, H.B. (2016) Curcumin slows osteoarthritis progression and relieves osteoarthritis-associated pain symptoms in a post-traumatic osteoarthritis mouse model. *Arthritis Research & Therapy* 18, 1-12.

ZIMMERMANN, A.M.; KIRSTEN, V.R. (2008) Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: Uma abordagem clínica. *Disciplinarum Scientia* 9, 51-68.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dadas as condicionantes do estudo, sobretudo as limitações relacionadas ao tempo de tratamento, não se pôde evidenciar maior redução do dano aos lipídios. Apesar disso, os dados coletados indicaram efeito positivo sobre os marcadores de estresse oxidativo e melhora nos parâmetros hematológicos e leucocitários.

A mudança positiva da resposta imunológica, verificada em mais de um aspecto, pode ser resultado do efeito antioxidante da curcumina sobre os condrócitos e citocinas. Contudo, certas características de sua interação com os linfócitos e com o sistema imune em geral ainda precisam ser investigadas.

É possível afirmar, no entanto, que o estudo teve relevância, embora não traduzida em significância estatística. De todo modo, recomenda-se a ampliação da amostra em pesquisas futuras, de forma a viabilizar a obtenção de resultados estatisticamente expressivos.

## REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, J.L.A.*et al.* Toxicidad a 90 días de extracto atomizado de rizoma de *Curcuma longa* (A4R), flores de *Cordia alliodora* (A4F) y hojas de *Annona muricata* (A4L) em modelo murino. **Revista Peruana de Medicina Integrativa**, Peru, v. 4, n. 1, p.5-10, 2016.
- AL-MADOL, M. A.*et al.* Comparative Expression Analyses of Pro- versus Anti-Inflammatory Mediators within Synovium of Patients with Joint Trauma, Osteoarthritis, and Rheumatoid Arthritis. **Mediators Of Inflammation**, Berlin, v. 1, p.1-11, 2017.
- ALONSO, J. Curcuma. In: ALONSO, J. Tratado de Fitofarmacos e Nutracêuticos. São Paulo: **AC Farmacêutica**, p. 364 – 373, 2016.
- ANTUNES, M.V.*et al.* Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Novo Hamburgo, v. 44, n. 2, p.279-287, 2008.
- ARABBI, P. R. Alimentos Funcionais: aspectos gerais. **Revista Nutrire**. São Paulo, v.21. 2001.
- ARAÚJO, E.S.*et al.* Impacto da suplementação de vitamina C sobre níveis de peroxidação lipídica e glutatona reduzida em tecido hepático de camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida. **Revista de Nutrição**, Pelotas, v. 29, n. 4, p.579-587, 2016.
- ARMSTRONG, D.; Free Radical and Antioxidant Protocols. **Methods in Molecular Biology**, New Jersey, vol. 108, 1998.
- BARBOSA, K.B.F.*et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p.629-643, 2010.
- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Fitoterápicos**.3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 720, 2012.
- BARROUIN-MELO, S.M.*et al.* Evaluating oxidative stress, serological- and haematological status of dogs suffering from osteoarthritis, after supplementing their diet with fish or corn oil. **Lipids In Health And Disease**, Helsinki, v. 15, n. 1, p. 1-16, 2016.
- BEALE, B.S. Use of nutraceuticals and chondroprotectants in osteoarthritic dogs and cats. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, Houston, v. 34, n. 1, p.271-289, 2004.
- BHATHAL, A.*et al.* Glucosamine and chondroitin use in canines for osteoarthritis: A review. **Open Veterinary Journal**, Canada, v. 7, n. 1, p.36-49, 2017.
- BRAUN, H. J.; GOLD, G.E. Diagnosis of osteoarthritis: **Imaging in Bone**, Estados Unidos da América, v. 51, n. 2, p.278-288, 2012.

CARRIÇO, A. C. N. T. A. **A artroscopia no diagnóstico e tratamento da doença do processo coronoide medial no cão.** 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real, 2012.

CECILIO FILHO, A. B. *et al.*. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, 2000.

CECÍLIO FILHO, A. B.; VILLAS BOAS, E. V. de B. Efeito do tempo de armazenamento sobre a composição química da cúrcuma. In: Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, p. 124, 1996.

CODEVILLA, C.F. Incorporation of curcumin into nanostructured systems: A review. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 37, p.152-163, 2015.

COLLINO, L. **Curcumina: de Especiaria à Nutracêutico.** 2014. 88 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia-bioquímica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

COMBLAIN, F.*et al.* Review of dietary supplements for the management of osteoarthritis in dogs in studies from 2004 to 2014. **Journal Of Veterinary Pharmacology And Therapeutics**, França, v. 39, n. 1, p.1-15, 2015.

DALBY, A. Dangerous tastes: the story of spices, 2. ed., **British Museum Press**: London, 2000.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421-31, 1990.

FELIPE, M. Cúrcuma: especiaria e anti-inflamatório pode ser a alternativa para o controle da dengue, 2015.

FLUCKIGER, M. The standardized analysis of radiographs for hip dysplasia in dogs. Objectifying a subjective process. **Kleintierpraxis** v. 38, p. 693-702, 1993.

GHOSH, S.; BANERJEE, S.; SIL,P.C. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 111-124, 2015.

GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric – chemistry, technology and quality. **CRC Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v. 12, p. 199-301, 1980.

GRANDI, T. S. M. Tratado das plantas medicinais: Mineiras, Nativas e Cultivadas. Belo Horizonte: **Adaequatio Estúdio**, p. 1076-1077, 2014

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15n]nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.

GUILAK, F. *et al.* Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. **Journal Orthopaedic Research**, v.12, p.474-484, 1994.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, Singapore, v. 141, n. 2, p.312-322, 2006.

HENROTIN, Y.; LEMBERT, C. Chondroitin and glucosamine in the management of osteoarthritis: an update. **Current Rheumatology Reports**, v. 15, p. 361, 2013.

HULSE, D. Meniscal Injury following surgery for the ACL deficientstifle joint. **13th ESVOT Congress**, Munich, 2006.

KADIISKA, M.B. *et al.* Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? **Free Radical Biology And Medicine**, v. 38, n. 6, p.698-710, 2005.

KEEN, H. I.; WAKEFIELD, R. J.; CONAGHAN, P. G. A systematic review of ultrasonography in osteoarthritis. **Annals Of The Rheumatic Diseases**, Australia, v. 68, n. 5, p.611-619, 2009.

LEVINE, D. *et al.* **Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2008.

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 464–78, 1990.

LIEBICH, H.G.; FORSTENPOINTNER.G.; KONIG, H.E. Introdução e anatomia geral. In: KONIG.H.E.; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos animais domésticos: Texto e atlas colorido**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 21-68, 2012

LINDSEY, C.T.*et al.* Magnetic resonance evaluation of the interrelationship between articular cartilage and trabecular bone of the osteoarthritic knee. **Osteoarthritis And Cartilage**, São Francisco, v. 12, n. 2, p.86-96, 2004.

LOBOSCO, A.C. **Tratamento de osteoartrose em cães: revisão de literatura**. 2012. 33 f. Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Niterói, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. NovaOdessa: **Instituto Plantarum**, p. 541-542, 2008.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MACHADO, J. C. F. **Caracterização das propriedades mecânicas das cartilagens do joelho e de sua interação com os tecidos circundantes**. 2015. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Biomédica, Universidade do Porto, Porto, 2015.

MACIEL, A. **Modelagem de Articulações para Humanos Virtuais Baseada em Anatomia**. 2001. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Computação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

- MALFAIT, A.; SCHNITZER, T. J. Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, Chicago, v. 9, n. 11, p.654-664, 2013.
- MANAIA, M.A. **Mecanismos redox a actividade antioxidante de sistemas fenólicos**. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.
- MARCHI, J.P. *et al.* *Curcuma longa* L., o açafrão da terra, e seus benefícios medicinais. **Arquivo de Ciência da Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 20, n. 3, p.189-194, 2016
- MARTEL-PELLETIER, J. Pathophysiology of osteoarthritis. **Osteoarthritis And Cartilage**, Montreal, v. 12, p.31-33, 2004.
- MARMITT, D.J.*et al.* Análise da produção científica do *Curcuma longa* L. (açafrão) em três bases de dados após a criação da RENISUS. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, Lajeado, v. 7, n. 1, p.71-77, 2016.
- MARTEL-PELLETIER, J.*et al.* Osteoarthritis. *NatureReviewsDiseasePrimers*, Montreal, **Springer Nature**, v. 2, p.1-18, 2016.
- MELE, E. Epidemiologia da osteoartrite. **Veterinary Focus**, Buenos Aires, v. 17, n. 3, p.4-10, 2007.
- MILLIS, L. D; LEVINE, D. **Canine rehabilitation and pshysical therapy**. Philadelphia: WB Saunders, 2004.
- MOREAU, M.*et al.* Clinical evaluation of a powder of quality elk velvet antler for the treatment of osteoarthrosis in dogs. **Canadian Veterinary journal**, Montreal, v. 45, p.136-139, 2004.
- MURRELL, G. A. C. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. **Biochemical Journal**, v. 265, p. 659-665, 1990.
- MURI, E.M.F.; SPOSITO, M.M.M.; METSAVAHT, L. Nonsteroidalantiinflammatory drugs and their local pharmacology. **Revista Acta Fisiátrica**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 16, p.186-190, 2009.
- NUNES, F.F. **Sulfato de glucosamina como modelo de fármaco hidrofílico em sistema emulsionado e nanoparticulado para aplicação dermocosmética**. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
- OLIVEIRA, C. **Anatomia comparada da articulação temporomandibular**. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado), Universidade de Lisboa Faculdade de Belas Artes, Lisboa, 2011.
- PERES, A.S.; VARGAS, E.G.A.; SOUZA, V.R.S. Propriedades funcionais da cúrcuma na suplementação nutricional. **Revista interdisciplinar Pensamento Científico - REINPEC**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 2, p.218-229, 2015.
- POOLE, A. R. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. **Frontiers In Bioscience**, Montreal, v. 4, p.662-670, 1999.

- RAMÍREZ-FLORES, G.I.*et al.* Correlation between osteoarthritic changes in the stifle joint in dogs and the results of orthopedic, radiographic, ultrasonographic and arthroscopic examinations. **Veterinary Research Communications**, Mexico, v. 41, n. 2, p.129-137, 2017.
- ROBERTSON, J.; MEAD, A. **Physical therapy and massage for the dog**. London, 2013.
- RUSSO, C; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Oxidative stress in dogs. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 3, p.1431-1439, 2016.
- SASIKUMAR, B. Genetic resources of Curcuma: diversity, characterization and utilization. **Plant Genetic Resources**, v. 3, n. 2, p. 230-251, 2005.
- SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. R. The Role of Synovitis in Osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, Chicago, v. 51, n. 2, p.249-257, 2012.
- SHISHODIA, S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B. B. Curcumin: getting back to the roots. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.1056, p. 206–217, 2005.
- SILVA, C.A.T. **O uso terapêutico de mediadores anti-inflamatórios da via do ácido araquidônico**. 2016. 83 f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.
- SILVA FILHO, C. R. M. da *et al.* Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira Farmcognosia**. v. 19, n. 4, 2009.
- SILVA, M.J.A. **Atividade anti-inflamatória de novos compostos sintéticos da classe dos nitroestirenos**. 2016. 116 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.
- SILVA, M.C.*et al.* Evaluation of the obtaining method of chitosan/ curcumin scaffolds on the structure, morphology and thermal properties. **Revista Matéria**, Paraíba, v. 21, n. 2, p.560-568, 2016.
- SILVA, N.A.*et al.* Doenças osteoarticulares degenerativas periféricas. **Einstein**, Goiânia, v. 6, n. 1, p.21-28, 2008.
- OLIVEIRA, R.R. *et al.* Radiografia e ultrassonografia no diagnóstico da ruptura do ligamento cruzado cranial em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 661-665, 2009
- SUETH-SANTIAGO, V.*et al.* Curcumin, the golden powder from turmeric: insights into chemical and biological activities. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p.538-552, 2015.
- TILLEY, Jr. L.P.; SMITH, F.W.K. **Consulta veterinária em 5 minutos espécies canina e felina**, 2.ed., Manole, p. 456 – 457, 2003.
- VASCONCELOS, S.M.L.*et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, Maceió, v. 30, n. 5, p.1323-1338, 2007.

WANG, X. *et al.* Effects of curcuminoids identified in rhizomes of *Curcuma longa* on BACE-1 inhibitory and behavioral activity and lifespan of Alzheimer's disease *Drosophila* models. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p. 88, 2014.

WALSH, D. A. *et al.* Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 49, p. 1852–1861, 2010.

ZHANG, Z. *et al.* Curcumin slows osteoarthritis progression and relieves osteoarthritis-associated pain symptoms in a post-traumatic osteoarthritis mouse model. **Arthritis Research & Therapy**, Nova York, v. 18, n. 1, p.1-12, 2016.

ZIMMERMANN, A.M.; KIRSTEN, V.R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: Uma abordagem clínica. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p.51-68, 2008.

ZWART, L.L de *et al.* Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology And Medicine**, Amsterdam, v. 26, n. 1-2, p. 202-226, 1999.

**ANEXO 1 – Normas da revista *Veterinary Records***

Research papers should include a title of not more than 15 words; the names, qualifications and addresses of each author; an e-mail address for the corresponding author; and an abstract of not more than 200 words covering the methods and results of the study. They should be set out in the following sections: abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, references. Clinical papers should follow a similar overall arrangement, modified appropriately. The text should be as concise as possible; the length should not exceed 4000 words. The word count excludes the title, author details, abstract, tables, figure legends, acknowledgements and references. After a manuscript has been revised, authors will be asked to submit both a ‘marked copy’ with changes tracked in Word and a ‘clean’ copy with no tracked changes. On acceptance, a one-page summary of the article will be requested and must be provided before the paper is published online [...].

## ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da pesquisa:** A eficácia da curcumina como adjuvante no tratamento de cães com osteoartrite secundária à displasia coxofemoral mediante avaliação clínica dos pacientes e análise laboratorial dos marcadores de estresse oxidativo.

**Orientadora:** Débora Maria Marques Callado de Oliveira, Ma.

**Nome do(s) pesquisadores assistentes/alunos:** Alexandra Adam e Helaine Claudino

**Justificativa:** A osteoartrite é uma doença de evolução progressiva que acomete com frequência a espécie canina. Trata-se de uma doença sem cura conhecida, dada a inexistência de agentes terapêuticos capazes de restabelecer a articulação em seu aspecto fisiológico. Sabe-se que a curcumina possui ação anti-inflamatória e antioxidante, além de outras propriedades e usos, tornando-a uma boa opção para ser utilizada terapêuticamente. Estudos recentes indicam que a sua atuação se dá, sobretudo, na redução do processo inflamatório e das espécies reativas de oxigênio – que, em níveis elevados, são prejudiciais às células. A curcumina é um composto natural de origem vegetal, sem registro de efeitos deletérios ao organismo animal. Espera-se que, com a utilização contínua da curcumina pela via oral, os pacientes caninos apresentem melhora na qualidade de vida, tendo em vista o seu potencial papel na diminuição da progressão da doença, atuando, principalmente, como fator redutor da inflamação articular.

**Objetivo geral:** Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo no sangue, bem como os sinais clínicos ortopédicos – e sua percepção pelo tutor – decorrentes do uso da curcumina como adjuvante terapêutico no tratamento da osteoartrite secundária à displasia coxofemoral canina.

**Procedimento:** Este estudo será realizado no Hospital Veterinário Unisul, sob consentimento por escrito dos tutores dos cães e autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e Comissão de Ética em Pesquisa (CEP).

Após enquadrar-se nos critérios de inclusão da pesquisa, serão coletados dados do paciente como idade, raça, sexo e peso. Será realizada a avaliação ortopédica por um único médico veterinário especializado em ortopedia, profa. Ma. Débora Maria M. Callado de Oliveira, que registrará os dados usando um sistema de pontuação ordinal, que inclui dor à palpação da articulação coxofemoral, grau de claudicação (mancar), capacidade de saltar e

capacidade de subir rampa, conforme descrito por Hielm-Björkman et al., nos dias zero (dia da consulta), 15, 30 e 60 dias após o início do tratamento.

Serão coletadas 4 amostras de sangue para quantificar o dano oxidativo, além de avaliar o hemograma e os parâmetros de funcionalidade renal e hepática nos dias zero (dia da consulta), 15, 30 e 60 dias após o início do tratamento.

Ainda, serão realizados 3 exames radiográficos para confirmar e avaliar a osteoartrite associada à displasia coxofemoral, nos dias zero (dia da consulta), 30 e 60 dias após o início do tratamento. Para o adequado posicionamento radiográfico e evitar que o animal sinta dor durante o exame, os cães serão sedados com 0,004 mg/kg de nilperidol intramuscular. Em casos de sedação insuficiente, será administrado o anestésico propofol intravenoso durante o exame radiográfico.

Cada cão participante deste estudo receberá os medicamentos e nutracêuticos manipulados referentes ao seu peso, a serem administrados diariamente pelos seus tutores em suas residências, pela via oral, conforme prescrito na receita pelo médico veterinário responsável para o tratamento da displasia coxofemoral durante 60 dias.

Ao final do tratamento, o tutor será convidado a preencher um questionário simples, avaliando a resposta de seu cão ao tratamento realizado em “muito pior”, “pior”, “nenhuma mudança”, “melhor” ou “muito melhor”.

A consulta ortopédica, assim como o primeiro exame de sangue (perfil I), o primeiro exame radiográfico (de pelve) e a sedação, serão cobrados do tutor do cão como de rotina. O tutor ficará isento do pagamento dos retornos para reavaliação clínica em 15, 30 e 60 dias, do segundo, terceiro e quarto exame de sangue, assim como do segundo e terceiro exame radiográfico aos 30 e 60 dias após o início do tratamento e das avaliações laboratoriais do dano oxidativo das amostras de sangue coletadas. Também receberão gratuitamente os medicamentos e nutracêuticos manipulados pela empresa Drogavet (farmácia de manipulação veterinária) para o tratamento da displasia coxofemoral, receitados pelo médico veterinário responsável pela pesquisa, durante 60 dias.

Agradecemos sua contribuição para o desenvolvimento desta atividade de pesquisa e colocamo-nos à disposição para esclarecimentos adicionais através dos telefones (48) 99638-2888 profa Débora / (48) 99839-1514 Alexandra / (48) 99668-8662 Helaine.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_,  
responsável pelo cão \_\_\_\_\_, fui informado(a), de forma clara e detalhada, sobre os procedimentos a serem realizados em meu cão, custos e objetivos e concordo em participar da pesquisa intitulada “*A eficácia da curcumina como adjuvante no tratamento de cães com osteoartrite secundária à displasia coxofemoral mediante avaliação clínica dos pacientes e análise laboratorial dos marcadores de estresse oxidativo*”, que será realizada no Hospital Veterinário da UNISUL, sob responsabilidade da pesquisadora profa. Débora Maria M. Callado de Oliveira, Ma. Também dou minha permissão para o uso de fotografias e dados obtidos durante a pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento.

Tubarão, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do tutor do cão

\_\_\_\_\_  
Profª Responsável

Débora Maria Marques Callado de Oliveira, Ma.

\_\_\_\_\_  
Aluna responsável