



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

KEILA TAMIRES DA SILVA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DOS
MEMBROS DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS AO ÁCIDO ÚSNICO
DURANTE A PRENHES**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE BIOLOGIA
KEILA TAMIRES DA SILVA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DOS
MEMBROS DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS AO ÁCIDO ÚSNICO
DURANTE A PRENHES**

TCC apresentado ao Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para incremento da Disciplina Eletiva do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Katharine Raquel Pereira dos Santos

Coorientadora: Prof^ª. Msc. Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2016

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

S586a Silva, Keila Tamires da.
Análise histomorfométrica da deposição do colágeno dos membros da prole de ratas wistar submetidas ao ácido úsnico durante a prenhes / Keila Tamires da Silva - Vitória de Santo Antão, 2016.
49 folhas: il.; color.

Orientadora: Katharine Raquel Pereira dos Santos
Coorientadora: Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho
TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Licenciatura em Ciências Biológicas, 2016.
Inclui referências e anexo

1. Líquens. 2. Histologia animal. 3. Ácido úsnico. I. Santos, Katharine Raquel Pereira dos (Orientadora). II. Marinho, Ketsia Sabrina do Nascimento (Coorientadora). III. Título.

579.7 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE- 017/2017

KEILA TAMIRES DA SILVA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DOS
MEMBROS DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS AO ÁCIDO ÚSNICO
DURANTE A PRENHES**

TCC apresentado ao Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para incremento da Disciplina Eletiva do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 12/12/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Katharine Raquel Pereira dos Santos (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Msc. Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho (Coorientadora)

Universidade Federal de Pernambuco/CAV

Prof^ª. Msc. Maria Juliana Gomes Arandas

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico a Deus, por sempre está presente em minha vida. A minha amada mãe, como reconhecimento ao seu apoio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu maravilhoso Deus, por sempre está presente em minha vida, que sempre me deu força para enfrentar meus maiores medos. Obrigada meu Deus pela tua grandeza, pelo seu amor incondicional.

Aos meus pais, Maria José da Silva e Paulo José da Silva, pelo o apoio e principalmente, a minha amada e querida mãe, por sua dedicação e por sempre me apoiar em tudo. Obrigada por ser esta mãe amiga e companheira de todas as horas.

Ao meu noivo, Michelson Gustavo de Santana Barbosa, por sempre me aconselhar e me acalmar nos meus momentos apreensivos. Obrigada pelos incentivos e companheirismo.

À minha querida orientadora, Katharine Raquel Pereira dos Santos, pela confiança, oportunidade e apoio durante a construção deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, paciência e incentivos. És um grande exemplo como pessoa e profissional.

Meu muitíssimo obrigada a minha Coorientadora, Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho, pela paciência, ensinamentos e incentivos. Muito obrigada por sempre está à disposição para tirar minhas dúvidas e me acalmar nos meus momentos de aflição. És Um exemplo de mulher guerreira e batalhadora, que levarei sempre comigo.

Agradeço a Erivaldo Alves, pelo o apoio durante a tradução dos resumos deste trabalho. Muito obrigada pela colaboração.

Ao professor, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, pela orientação e ajuda na realização da morfometria e estatística do presente trabalho.

Agradeço às professoras, Noêmia Pereira da Silva Santos e Cleópatra Regina da Silva, pelo material fornecido para realização desta pesquisa.

À professora, Maria Juliana Gomes Arandas, pelas palavras de incentivo. Muito obrigada por me incentivar no momento que mais precisei. Suas palavras fizeram grande diferença nesta caminhada.

Agradeço a todos que fazem parte da família Biotecnologia e Fármacos, em especial, aos colegas e companheiros da minha linha de pesquisa, Alziane Andrade, Lavínia Tomás e Josemi Neto, muito obrigada pelos momentos de compreensão e descontração.

Às pessoas especiais que Deus colocou em meu caminho, Mágda Regina, Andreza Rocha e Robervânia Oliveira, que juntas formamos o “Quarteto Fantástico”. Obrigada meninas pela amizade de vocês e por fazer esta caminhada ficar mais leve com os nossos momentos de descontração.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Centro Acadêmico de Vitória (CAV) pela oportunidade de realizar este trabalho.

A todos os meus professores da UFPE/CAV que contribuíram para minha formação durante a graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho.

“Tudo posso naquele que me fortalece”.

(Filipenses 4: 13)

RESUMO

O ácido úsnico, composto resultante do metabolismo secundário liquênico apresenta relevantes atividades biológicas, tais como, antitumoral, antiproliferativa e antiviral. Porém, a sua aplicação terapêutica é bastante limitado devido o composto ser considerado hepatotóxico. Recentes ensaios preliminares da toxicidade do ácido úsnico durante a prenhez de ratas Wistar relataram relevantes sinais de toxicidade na prole proveniente das fêmeas tratadas, com alterações morfológicas nos membros dos neonatos. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a deposição de colágeno na cartilagem hialina dos membros da prole de ratas prenhas expostas ao ácido úsnico na sua forma livre. Foram utilizadas 12 ratas wistar prenhas distribuídas aleatoriamente nos grupos controle (n=6) e tratado (n=6), e analisados 60 fetos distribuídos 30 fetos para cada grupo. As ratas do grupo controle receberam 1,0 mL de solução fisiológica, e as do grupo tratado 25 mg/kg de ácido úsnico de *Cladonia substellata* purificado, através da via oral de administração. Ao 20º dia de gestação as fêmeas foram eutanasiadas e seus fetos retirados para análise dos membros. Os resultados da análise microscópica revelaram alterações durante a formação óssea, com retardo na proliferação dos condrócitos e diminuição na quantidade de condrócitos hipertróficos. Na análise histomorfométrica, a quantidade de colágeno nos membros dos fetos no grupo tratado foi significativamente menor do que a do grupo controle. Com base nestes resultados pode-se inferir que a administração do ácido úsnico de *C. substellata* purificado na dose de 25 mg/kg durante o período gestacional acarretou alterações degenerativas sobre o desenvolvimento ósseo e deposição do colágeno.

Palavras-chave: Fetotoxicidade. Líquens. Tecido ósseo.

ABSTRACT

Usnic acid is a chemical compound of natural origin resulting from secondary lichen metabolites that present relevant biological activities, such as antitumoral, antiproliferative and antiviral. However, its therapeutic applications are limited. Recent tests point out the potential toxicity caused by the usnic acid showing signs of toxicity in the offspring of treated pregnant rats, resulting in morphological changes in the limbs of neonates during the period of organogenesis. Therefore, the present study aimed to evaluate the deposition of collagen in the hyaline cartilage of offspring of pregnant rats exposed to the usnic acid in its free form. 12 female Wistar rats in pregnancy were randomly distributed in the control group (n= 6) and treatment group (n= 6), and analyzed 60 fetuses, distributed 30 fetuses for each group. The female from the control group received a 1.0 mL of physiological solution and the treatment group received 25 mg/kg of purified usnic acid by oral administration. At the 20th day of gestation, all females were euthanized and their fetuses were removed. The microscopic analysis of the limbs from the treatment group showed alterations in their bone formation, such as delay in chondrocyte proliferation and decrease in the amount of hypertrophic chondrocytes. Furthermore, the amount of collagen in the fetal limbs from the treatment group was lower than the control group. Based on these results, it can be inferred that the administration of *Cladonia substellata* purified single dose at a dose of 25 mg/kg during the gestational period causes degenerative changes on bone development and collagen deposition.

Keywords: Fetotoxicity. Lichens. Bone tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Classificação dos líquens. (A) folioso (*Parmotrema tinctorum*), (B) crostoso (*Haematomma fenzlianum*), (C) fruticoso (*Ramalina melanothrix*), (D) filamentoso (*Dictyonema sericeum*), (E) dimórfico (*Cladonia didyma*), (F) esquamuloso (*Normandina pulchella*). 15

FIGURA 2 - Estrutura química do ácido úsnico. 17

ARTIGO

FIGURA 1 - Fotomicrografia do membro anterior da prole do grupo controle (A) e grupo tratado com 25 mg/kg de ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* (B). Visualização das epífises em molde de cartilagem hialina (setas), tecido ósseo no centro primário de ossificação (cabeça de seta), diáfise em molde de cartilagem hialina (asterisco). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento total 40X. 34

FIGURA 2 - Fotomicrografia do membro da prole do grupo controle (A) e grupo tratado com 25 mg/kg de ácido úsnico purificado (B). Visualização da zona de proliferação dos condrócitos (setas), cartilagem hialina sem modificações (cabeça de seta azul), condrócitos hipertróficos (asterisco), tecido ósseo (cabeça de seta preta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento total 100X. 34

FIGURA 3 - Fotomicrografia da quantidade de colágeno presente na cartilagem hialina dos membros anteriores e posteriores dos neonatos do grupo controle (A) e tratado (B) expostos ao ácido úsnico durante o período da organogênese. Rede de colágeno com birrefringência em vermelho (cabeça de seta) Coloração: picrossírius red. Aumento total 100X. 35

LISTA DE ABREVIACÕES

μm	Micrômetro
D0	Dia zero
DP	Desvio padrão
g	Gramma
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mm^2	Milímetro quadrado
mL	Mililitro
nm	Nanômetro

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Análise histomorfométrica da quantidade de colágeno na cartilagem hialina dos membros de neonatos submetidos ao ácido úsnico. 35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Líquens	15
2.2 Ácido úsnico	16
2.3 Colágeno tipo II	19
2.3.1 Ossificação endocondral	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4 REFERÊNCIAS	23
5 ARTIGO	29
6. CONCLUSÃO	37
ANEXO	40

1 INTRODUÇÃO

Os líquens são resultantes da associação simbiótica entre fungos (micobionte) e uma alga ou cianobactéria (fotobionte), fazem parte de um grupo extremamente diverso, que variam desde formas muito simples até estruturas morfológicas e anatômicas muito complexas (KÄFFER et al., 2010). São uma das mais importantes fontes naturais de compostos biologicamente ativos, os quais derivam de seu metabolismo primário e secundário (HONDA; VILEGAS, 1998; HUNECK, 1999). De todos os metabólitos secundários líquênicos, destaca-se o ácido úsnico, o qual é extensivamente estudado, devida as suas diversas atividades biológicas (NUNES et al., 2010).

O ácido úsnico, composto de origem natural resultante do metabolismo secundário de líquens é descrito na literatura com várias propriedades farmacológicas, tais como: antitumoral, antimicrobiano, antiviral, antiproliferativo e anti-inflamatório (FOURNET et al., 1997; COCCHIETTO et al., 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; DE CARVALHO et al., 2005; BOMFIM, 2009; MARTINS, 2013). Apesar dessas diversas atividades biológicas já relatadas existem algumas limitações para sua aplicação terapêutica, como a alta hepatotoxicidade, teratogenicidade, baixa hidrossolubilidade, e conseqüentemente uma diminuição na eficácia terapêutica (FRAVEAU et al., 2002; RIBEIRO-COSTA et al., 2004; PRAMYOTHIN et al., 2004; SANCHEZ et al., 2006; SANTOS et al., 2006).

Recentes ensaios preliminares da toxidade reprodutiva do ácido úsnico durante o período da organogênese relatam relevantes sinais de toxicidade na prole de ratas prenhes tratadas. Os fetos provenientes das fêmeas submetidas ao tratamento com ácido úsnico não conseguiram prosseguir o seu desenvolvimento, e nos que prosseguiram foram visualizados a presença de malformações, como atrofia dos membros superiores e inferiores. Assim, o ácido úsnico foi capaz de promover o aparecimento de anormalidades no desenvolvimento anatômico (SILVA, 2014).

Existem compostos que possuem interações negativas com o sistema esquelético, principalmente no que se diz respeito à exacerbação na dosagem da droga e, a sua utilização em fases críticas do desenvolvimento, como o período gestacional e a idade infantil (DUEWELHENKE; KRUT O; EYSEL, 2007).

Experimentos realizados com a isotretinoína (ácido 13-cis-retinóico), um derivado da vitamina A, que apresenta algumas propriedades farmacológicas semelhantes ao ácido úsnico, como atividade antitumoral, demonstraram alterações na ossificação endocondral. Os animais expostos ao fármaco apresentaram um retardo no processo de ossificação devido a uma

lentidão no processo de proliferação celular, assim como na produção da matriz osteóide, formação da epífise, diáfise, perióstio e mineralização óssea (PARCCELLI et al., 2015).

A ossificação endocondral é a principal responsável pela formação dos ossos curtos e longos, a qual se inicia com um molde de cartilagem hialina. Este tipo de ossificação depende da proliferação e diferenciação da cartilagem hialina para sua formação (INADA et al., 2004; MACKIE; TATARCZUCH; MIRAMS, 2011).

Segundo Velosa et al. 2003, o bom funcionamento dos componentes celulares e extracelulares da cartilagem hialina é de fundamental importância para a formação da ossificação endocondral. E entre os componentes da matriz extracelular da cartilagem hialina destaca-se o colágeno do tipo II, que constitui aproximadamente de 10-30% da sua matriz orgânica fornecendo suporte ao tecido.

As Alterações esqueléticas durante o desenvolvimento embrionário podem estar diretamente relacionadas às alterações sobre as redes de colágeno e outras proteínas especializadas que compõem os tecidos. A diminuição do colágeno pode implicar em efeitos drásticos no organismo em desenvolvimento, não somente a nível ósseo, mas também nas demais regiões que apresentam colágeno em sua constituição (GUSTAFSSON et al., 2003; SILVA; PENNA, 2012).

De acordo com os pressupostos teóricos referidos e os poucos relatos na literatura da ação do ácido úsnico sobre o sistema esquelético, torna-se relevante estudos que avaliem a influência do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* na deposição de colágeno na cartilagem hialina dos membros anteriores e posteriores da prole de ratas prenhes expostas ao composto.

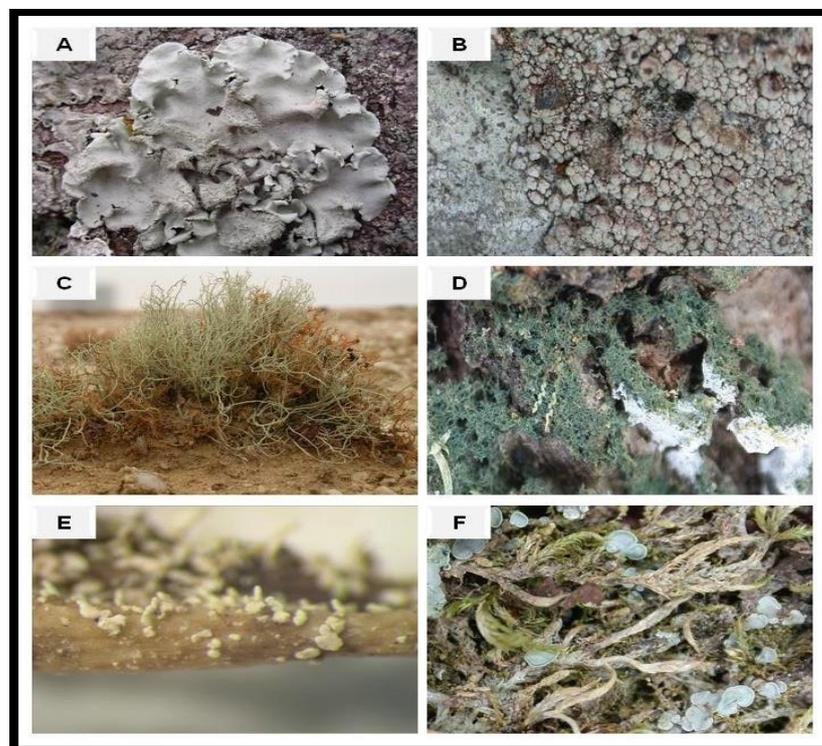
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LÍQUENS

Os líquens são associações de dois organismos diferentes que se constituem basicamente de um fungo (micobionte) com uma ou mais alga e/ou cianobactéria (fotobionte). Estima-se que existam cerca de 17.000 espécies conhecidas de líquens, com dezenas de novas espécies sendo descobertas a cada ano. São considerados cosmopolitas, podem ser encontrados tanto em ambientes luminosos como sombreados, e suportam condições extremas de temperatura e umidade (NASH, 2008; COCHIETTO et al., 2002 VERA et al., 2002, 2004).

O talo líquênico é classificado de acordo com seu aspecto morfológico, como foliosos (Figura 1.2A), crostosos (Figura 1.2B), fruticosos (Figura 1.2C), filamentosos (Figura 1.2D), dimórficos (Figura 1.2E), esquamulosos (Figura 1.2F). Fixam-se em diferentes tipos de substratos, como rochas, solos, folhas, galhos e troncos de árvores (MARTINS, 2008; BUDEL; SCHEIDEGGER, 2008).

Figura 1 - Classificação dos líquens.



Os líquens são classificados em: (A) folioso (*Parmotrema tinctorum*), (B) crostoso (*Haematomma fenzlianum*), (C) fruticoso (*Ramalina melanothrix*), (D) filamentosos (*Dictyonema sericeum*), (E) dimórfico (*Cladonia didyma*), (F) esquamuloso (*Normandina pulchella*). Fonte: www.tropicallichens.net. Acesso em 14.12.2016.

Estes organismos são considerados importantes fontes naturais de compostos biologicamente ativos, os quais derivam de seu metabolismo primário e secundário. De acordo com a localização no talo, as substâncias produzidas pelos líquens são classificadas em produtos intra e extracelulares (HONDA; VILEGAS, 1998).

Os produtos intracelulares são chamados de metabólitos primários e estão ligados na parede celular, dentre eles, os carotenóides, os aminoácidos, as proteínas, os glicolípídeos e os carboidratos. Já os produtos extracelulares são denominados metabólitos secundários, encontrados na medula ou no córtex, raramente nas duas camadas. Estas substâncias resultantes do metabolismo secundário dos líquens apresentam uma infinidade de atividades biológicas quando isoladas (HONDA; VILEGAS, 1998; HUNECK, 1999; ELIX, 1996; MULLER, 2001).

Várias substâncias líquênicas têm sido estudadas no ponto de vista farmacológico. Tais substâncias são na sua maioria compostos fenólico, dentre eles ácidos alifáticos, depsídeos, depsidonas, ésteres benzílicos, antraquinonas, ácido úsnico, terpenos e derivados do ácido pulvínico (NUNES et al., 2010)

Diversos metabólitos de líquens possuem propriedades biológicas. Pesquisas revelam as propriedades de líquens como antibiótico, principalmente sobre as bactérias gram-positivas (BÉZIVIN et al., 2003), antiproliferativa (CAMPANELLA et al., 2002), anti-HIV (NEAMATI et al., 1997), antitumoral (EINARSDÓTTIR et al., 2010) e antioxidante (RANKOVIC; KOSANIC; STANOJKOVIC, 2011).

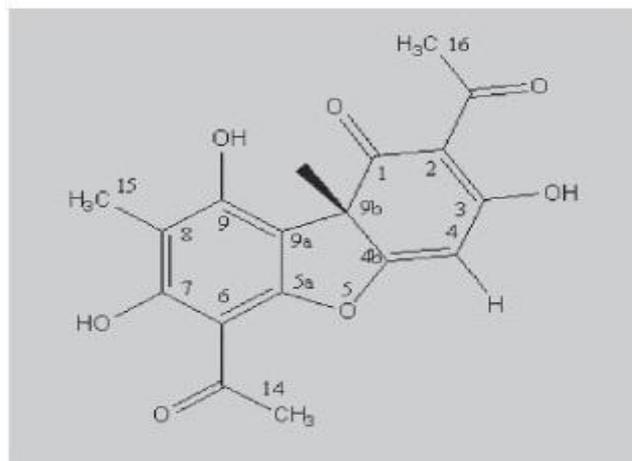
Os líquens possuem uma grande importância econômica, sendo utilizados em indústrias de perfumes, no tingimento de tecidos, na alimentação, além das diversas propriedades medicinais (HUNECK, 1999; BATTS; CALDER; BATTS, 2004). Além disso, os líquens cumprem um importante papel ecológico de fixadores de nitrogênio em ecossistemas áridas e constituem grande parte da biomassa de organismos autotróficos em ambientes de baixa disponibilidade de nutrientes (NASH, 2008; WILL-WOLF et al., 2004). São usados como bioindicadores de poluição, pois são capazes de absorver e acumular metais pesados e outros elementos químicos (HONDA; VILEGAS, 1998; SOARES et al., 2014).

2.2 ÁCIDO ÚSNICO

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8-9b-dimetil-1,3(2H,9 α / β H)-dibenzofurandiona; C₁₈H₁₆O₇] (Figura 1), é um metabólito secundário líquênico, que caracteriza-se por ser uma substância de pigmentação amarelada e de baixa solubilidade em

água (10 mg/100 mL a 25 °C) (MÜLLER, 2001, COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002). Pode ser isolado de vários gêneros de líquens, tais como *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae) e *Parmelia* (Parmeliaceae) (INGLÓLFSDÓTTIR, 2002). Ocorre na natureza em duas formas enantioméricas (-) e (+), que indica uma projeção angular do grupamento metil localizado na posição 9b (INGÓLFSDÓTTIR, 2002; COCCHIETTO et al., 2002; SOKOLOV; SKERT; NIMIS, 2002).

Figura 2 - Estrutura química do ácido úsnico.



Destacando o carbono quiral 9b. Fonte: (SIQUEIRA-MOURA et al., 2008).

De todos os metabólitos secundários de líquens, o ácido úsnico é o mais estudado, apresenta diversas atividades biológicas, tais como: antibiótica (NUNES et al., 2011; COCCHIETTO; SKERT; NIMIS, 2002; ELO; MATIKAINEN; PELTTARI, 2007; SEGATORE et. al., 2012), antiinflamatória (VIJAYAKUMAR et. al., 2000), antineoplásica (SANTOS et. al., 2006; RIBEIRO-COSTA et al., 2004; BRISDELLI et. al., 2013), antiviral (SOKOLOV, et. al., 2012), antioxidante (KOHLHARDT-FLOEHR et. al., 2010, BEHERA; MAHADIK; MOREY, 2012) cicatrizante (BRUNO et. al., 2013) e moluscicida (MARTINS, 2013).

Na década de 1950, foram realizadas as primeiras avaliações sobre a ação antibacteriana do ácido úsnico. A partir disto, inúmeras investigações foram ampliadas no conhecimento de metabólitos líquênicos como antibióticos (COCCHIETTO et al., 2002).

Os primeiros a investigarem a atividade antitumoral do ácido úsnico foram Morris Kupchan e Kopperman em 1975, em um carcinoma pulmonar de Lewis em ratos. Após esta investigação, vários estudos com o ácido úsnico foram desenvolvidos.

Estudos realizados por Scirpa et al. (1999), em mulheres infectadas com o vírus do papiloma humano (HPV), relatam que as pacientes tratadas com a formulação vaginal que obteve ácido úsnico e o sulfato de zinco apresentaram resultados favoráveis, tanto na reepitelização das lesões, quanto na recorrência de infecção.

A atividade anti-inflamatória do ácido úsnico foi demonstrada por Vijayakumar et al. (2002), nesse estudo foi verificado que o ácido úsnico apresenta atividade anti-inflamatória em dose dependente quando testado em modelos animais.

O seu efeito antioxidante foi observado por Odabasoglu et al. (2006), no tratamento de úlceras gástricas em modelo animal. Obtendo uma inibição significativa da formação de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica.

Propriedades cicatrizantes do ácido úsnico foram realizados em ensaios in vitro e in vivo por Bruno et al. (2013), qual exibiu um alto desempenho no tratamento de feridas, que estimulou o fechamento das monocamadas de queratinócitos na região lesionada.

A atividade moluscicida foi investigada por Martins (2013), onde foi analisado o usnato de potássio que é sintetizado a partir do ácido úsnico, em *Biomphalaria glabrata* e seus embriões. Foi observado que o usnato de potássio matou 100% dos embriões dos caracóis em uma concentração de 10 ppm.

Embora a literatura descreva várias propriedades biológicas atribuídas ao ácido úsnico, a sua aplicação terapêutica é bastante limitada. Estudos relatam relevantes toxicidades do ácido úsnico na prole de ratas prenhas, com malformações nos membros anteriores e posteriores dos fetos expostos ao composto durante o período intrauterino. Estas malformações podem estar diretamente relacionadas às alterações sobre as redes de colágeno. Assim, torna-se desfavorável a utilização deste composto para aplicação terapêutica. (FRAVEAU et al., 2002; RIBEIRO-COSTA et al., 2004; PRAMYOTHIN et al., 2004; SANCHEZ et al., 2006; SANTOS et al., 2006; SILVA, 2014; GUSTAFSSON et al., 2003; SILVA; PENNA, 2012).

2.3 COLÁGENO TIPO II

O colágeno tipo II pertence à família dos colágenos formadores de fibras. É o principal colágeno de tecidos cartilagosos, também encontrados em notocorda de embrião, humor vítreo e fibrocartilagens (KADLER et al., 1996; MONTES et al., 1984).

No processo da biossíntese do colágeno II, o procolágeno é secretado na matriz extracelular pelas células como sua forma precursora, que apresenta duas grandes extensões de peptídicos: amino (NH₂) e carboxil (COOH), chamados de peptídicos de registro. Após a secreção na matriz extracelular os peptídicos são removidos por proteases específicas chamadas procolágeno peptidases. E o resultado, é uma molécula nativa (tropocolágeno) de tripla hélice com dimensões aproximadas de 300nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro, que retém telepeptídeos curtos e com poucos aminoácidos, capaz de se polimerizar para formar fibrilas de colágeno (LINSENMAYER, 1991; EYRE; WU, 1995; ALBERTS et al., 1994).

Este tipo de colágeno é formado por três cadeias polipeptídicas arranjadas numa conformação de tripla hélice, denominadas cadeias α . É classificado como homotrímero, por ser composto por duas cadeias peptídicas do tipo α 1 e uma do tipo α 2. Estas cadeias são estabilizadas por pontes de hidrogênio, o que conferi à molécula alta estabilidade, rigidez e forma de bastão. Às cadeias de colágeno apresenta uma sequência de aminoácidos característica, e também uma série de repetições de sequência de aminoácidos Glicina-X-Y, no qual X é frequentemente prolina e Y é hidroxiprolina. (LINSENMAYER, 1991).

Ocorre em combinação com os colágenos IX e XI formando fibrilas heterotípicas, que associadas aos proteoglicanos constituem uma matriz hidratada promovendo rigidez á cartilagem. Os colágenos do tipo IX e XI são da família dos colágenos associados a fibrilas com tripla hélices ininterruptas, são classificados como heterotrímeros formados por três cadeias α diferentes entre si e juntos compõem cerca de 5 a 10% do conteúdo total de colágeno do tecido. Estes colágenos associados ao colágeno tipo II têm a função de limitar o diâmetro da fibra para aproximadamente 15-30nm, assim como de outras proteínas não colágenas (SHAKIBAEI; MERKER, 1999; SMORRIS; BACHINGER, 1987; EYRE; WU, 1995; GREGORY; OXFORD; CHEN, 2000).

Colágeno tipo II é o maior componente extracelular da cartilagem hialina, que tem a função de proporcionar suporte estrutural para os condrócitos como também distribuir a força originada do movimento da articulação. A matriz extracelular composta pelo colágeno do tipo

II também é importante na diferenciação, no metabolismo e na atividade dos condrócitos (BISSEL; BARCELLOS-HOFF, 1987).

2.3.1 OSSIFICAÇÃO ENDOCONDRA

A ossificação endocondral representa cerca de 20% da formação do esqueleto. É a principal responsável pelo desenvolvimento dos ossos curtos e longos, a qual se inicia com um molde de cartilagem hialina. Apresenta um alto grau de remodelamento e exerce uma grande função metabólica (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O desenvolvimento do osso endocondral inicia-se com um molde de cartilagem hialina que é precedido pela hipertrofia dos condrócitos. Os osteoblastos diferenciam-se pela primeira vez no pericôndrio formando a ossificação pericondral. Assim, uma fina camada de matriz mineralizada circunda todo o molde de cartilagem, formando um colar ósseo (ARANA, 2013; BIANCO et al., 1998; LONG; ORNITZ, 2013; MACKIE; TATARCZUCH; MIRAMS, 2011; RIMINUCCI et al., 1998).

Formado o colar ósseo, os condrócitos que ficam na parte central da cartilagem passam por um processo de maturação, tornando-se hipertróficos e em seguida entra em apoptose (morte celular programada). A matriz que se encontra circundada pelos condrócitos hipertróficos, mineraliza-se e capilares atravessam o cilindro ósseo, penetram na cartilagem calcificada e leva consigo as células progenitoras hematopoiéticas que se diferenciam em células clásticas e reabsorvem parcialmente a cartilagem calcificada. Com os vasos sanguíneos também chegam células osteoprogenitoras originadas do periósteo, que ocupam as cavidades deixadas pelos condrócitos, proliferam e se diferenciam em osteoblastos. Os osteoblastos formam camadas contínuas nas superfícies dos tabiques cartilagosos calcificados e iniciam a síntese da matriz óssea que logo se mineraliza. E assim, forma-se tecido ósseo primário sobre os restos de cartilagem calcificada (KRONENBERG, 2003; OLSEN; REGINATO; WANG, 2000).

Nos ossos endocondrais longos, observa-se um disco de tecido cartilaginoso, denominado placa de crescimento ou disco epifisário que se localiza entre as epífises e diáfise. Por meio da multiplicação dos condrócitos, este disco cartilaginoso é o responsável pelo crescimento do osso durante sua formação. Seu desaparecimento por ossificação determina a parada do crescimento dos ossos, quando eles atingem seu tamanho máximo (ASZÓDI et al., 2000).

As principais células que constitui o tecido ósseo são os osteoblastos, que sintetiza a parte orgânica da matriz óssea, os osteócitos, que fornece manutenção a matriz e os osteoclastos, com a função de reabsorver a matriz óssea e de remodelar osso (ARANA, 2013; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Estudos que abordam o potencial toxicológico do ácido úsnico durante o período embrionário e/ou fetal encontram-se bastante limitados, principalmente da ação deste composto sobre o sistema esquelético. Assim, torna-se necessário avaliar os efeitos tóxicos deste composto a fim de elucidar os cuidados na sua aplicação terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar à influência do ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* na deposição do colágeno da cartilagem hialina nos membros anteriores e posteriores da prole provenientes de ratas Wistar expostas ao composto durante a prenhes.

3.2 ESPECÍFICOS

- Descrever histologicamente a cartilagem hialina durante a formação óssea nos membros anteriores e posteriores dos neonatos expostos ao ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* durante o período da organogênese.
- Analisar histomorfometricamente a quantidade total de colágeno na cartilagem hialina dos membros anteriores e posteriores dos neonatos submetidos ao ácido úsnico purificado de *Cladonia substellata* na dose de 25 mg/kg.

4 REFERÊNCIAS

ARANA, V. **Biologia celular e tecidual para odontologia: moléculas, células e tecidos**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2013.

ASZÓDI, A. F. et al. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix. What can we learn from knockout mice? **Cell structure and function**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 73-84, 2000.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: _____. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 59-71.

BATTS, J. E.; CALDER, L. J.; BATTS, B. D. Utilizing stable isotope abundances of lichens to monitor environmental change. **Chemical Geology**, [S. L], v. 204, n.3, p. 345-368, 2004.

BEHERA, B. C.; MAHADIK N.; MOREY M. Antioxidative and cardiovascular-protective activities of metabolite usnic acid and psoromic acid produced by lichen species *Usnea complanata* under submerged fermentation. **Pharmaceutical Biology**, [S. L], v. 50, p. 968–979, 2012.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, [S. L], v. 10, n. 6, p. 499-503, 2003.

BIANCO, P. et. al. Bone formation via cartilage models: the “borderline” chondrocyte. **Matrix Biology**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3, p. 185-192, 1998.

BISSELL, M. J.; BARCELLOS-HOFF, M. H. The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message? **Journal of cell science**, United States of America, v. 1987, n. 8, p.327-343, 1987.

BOMFIM, R. R. et. al. Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, Argentina, v. 28, n. 4, p. 580-584, 2009.

BUGNI, T. S. et al. Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. **Fitoterapia**, [S. L], v. 80, n. 5, p. 270-273, 2009.

BUDEL, B.; SCHEIDEGGER, C. **Thallus morphology and anatomy**. In: NASH, T. III (Ed.) **Lichen Biology**. 2. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 2008. p. 40-68.

BRISDELLI, F. et. al. Cytotoxic Activity and Antioxidant Capacity of Purified Lichen Metabolites: An In Vitro Study. **Phytotherapy Research**, [S. L], v. 27, n. 3, p. 431-437, 2013.

BRUNO, M. et. al. (p)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S. L], v. 21, n. 7, p. 1834-1843, 2013.

CAMPANELLA, L. et.al. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. **Biochimie**, [S. L], v. 84, n. 4, p. 329-334, 2002.

- CARVALHO, E. A. et. al. Effects of usnic acid from *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: na ultrastructural study. **Micron**, Estados Unidos, v. 36, n. 1, p. 155-161, 2005.
- COCCHIETTO, M. et. al. A review on usnic acid, an interesting natural compound. **Naturwissenschaften**, [S. L], v. 89, n. 4, p. 137-146, 2002.
- CHEN, S. et. al. The role of autophagy in usnic acid-induced toxicity in hepatic cells. **Toxicological Sciences**, [S. L], v. 142, n. 1, p. 33-44, 2014.
- DE CARVALHO, E. A. B. et. al. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. **Micron**, Estados unidos, v. 36, n. 2, p. 155-161, 2005.
- DE OLIVEIRA, M. F. F. et. al. Influência de poluentes atmosféricos em Belo Jardim (PE) utilizando *Cladonia verticillaris* (líquen) como biomonitor. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1072-1076, 2007.
- DUEWELHENKE, N.; KRUT, O.; EYSEL, P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. L], v. 51, n. 1, p. 54-63, 2006.
- EINARSDÓTTIR, E. et. al. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. **Planta médica**, São Paulo, v. 76, n. 10, p. 969-974, 2010.
- ELIX, J. A. Biochemistry and secondary metabolites. **Lichen biology**, [S. L], v. 1, p. 154-180, 1996.
- ELO H.; MATIKAINEN J.; PELTTARI E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Naturwissenschaften**, [S. L], v. 94, n. 6, p. 465-468, 2007.
- EYRE, D. R.; WU, J. J. Collagen structure and cartilage matrix integrity. **The Journal of Rheumatology**, [S. L], v. 22, n. 1, p. 82-85, 1995.
- FOURNET, A. et. al. Activity of compounds isolated from chilean lichens against experimental cutaneous Leishmaniasis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, Elmsford, v. 116, n. 1, p. 51-54, 1997.
- FRAVEAU, U. J. et. al. Severe hepatotoxicity associated with the dietary supplement lipokinetix, **Annals of Internal Medicine**, [S. L], v. 136, n. 8, p. 590-595, 2002.
- GUSTAFSSON, E. et. al. Role of collagen type II and perlecan in skeletal development. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 995, n. 1, p. 140-150, 2003.
- GREGORY, K.; OXFORD, J. T.; CHEN, Y. Structural organization of distinct domains within the non-collagenous N-terminal region of collagen type XI. **Journal of Biological Chemistry**, [S. L], v. 275, n. 15, p. 11498-06, 2000.
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. Química dos liquens-Divulgação. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.1, p. 110-125, 1998.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Now York, v. 1092, p. 385-396, 2006.

HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. **Naturwissenschaften**, [S. L], v. 86, n. 12, p. 559-570, 1999.

INADA, M. et. al. Critical roles for collagenase-3 (Mmp) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. L], v. 101, n. 49, p. 17192-17197, 2004.

INGOLFSDOTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, [S. L], v. 61, n. 7, p. 729-736, 2002.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KÄFFER, M. I. et. al. Novas ocorrências de líquens corticícolos crostosos para a região sul do Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Minas Gerais, v. 24, n. 4, p. 948-951, 2010.

KOHLHARDT-FLOEHR C. et. al. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. L], v.101, n. 1, p. 97–102, 2010.

KADLER, K. E. et. al. A. collagen fibril formation. **Biochemical Journal**, [S. L], v. 316, n. 1, p. 1-11, 1996.

KRISTMUNDSDÓTTIR, T. et. al. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. **European journal of pharmaceutical sciences**, [S. L], v. 24, n. 5, p. 539- 543, 2005.

KRONENBERG, H. M. Developmental regulation of the growth plate. **Nature**, [S. L] v. 423, n. 6937, p. 332-336, 2003.

LINSENMAYER, T. F. Collagen In: **Cell Biology of extracellular matrix**. New York, p. 7-43, 1991.

LONG, F.; ORNITZ, D. M. Development of the endochondral skeleton. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. L], v. 5, n. 1, p. 8334, 2013.

MACKIE, E. J.; TATARCZUCH, L.; MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. **Journal of Endocrinology**, [S.L], v. 211, n. 2, p. 109-121, 2011.

MAIA, M. B. S. et. al. Anticonceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from lichen *Cladina dendroides* (des. Abb) AHTI. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, [S. L], v. 21, n. 3, p. 259-264, 2002.

MARTINS, M. C. B. **Aplicações Biotecnológicas de Compostos Obtidos dos Líquens**. 2013. p. 302. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MARTINS, S. M. A.; KÄFFER, M. I.; LEMOS, A. Lichens como bioindicadores da qualidade do ar numa área de termoelétrica, Rio Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v, 35, n. 3, p. 425-433, 2008.

MELO, M. G. D. et. al. Purification, Physicochemical Properties, Thermal Analysis and Antinociceptive Effect of Atranorin Extracted from *Cladonia Kalbii*. **Biological & Pharmaceutical**, [S. L], v, 31, n. 10, p. 1977-1980, 2008.

MOLNÁR, K.; FARKAS, E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. **Zeitschrift für Naturforschung C**, [S. L], v. 65, n. 3-4, p. 157-173, 2010.

MONTES, G. S.; BEZERRA, M. S. F. & JUNQUEIRA, L. C. U. Collagen distribution in tissues. In: **Ultrastructure of the connective tissue matrix**. Springer US, p. 65-88, 1984.

MORRIS K. S.; KOPPERMAN, H. L. L. Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. L], v. 31, n. 6, p. 625-625, 1975.

MORRIS, N. P.; BACHINGER, H. P. Type XI collagen is a heterotrimer with the composition ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) retaining none-triple-helical domains. **Journal of Biological Chemistry**, [S. L], v. 262, n. 23, p. 11345-50, 1987.

MOTA FILHO, F. D. O. et. al. Influence of atmospheric pollutants in Belo Jardim (PE) using *Cladonia verticillaris* (lichen) as biomonitor. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1072-1076, 2007.

NASH, T. H. Lichen Biology. Cambridge: **Cambridge University Press**, São Paulo, p. 303, 2008.

NEAMATI, N. et. al. Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: discovery of novel inhibitors through 3D database searching. **Journal of Medicinal Chemistry**, [S. L], v. 40, n. 6, p. 942-951, 1997.

NUNES, P. S. et. al. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. L], v. 2011, p. 1-9, 2011.

ODABASOGLU, F. et. al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Ethnopharmacology**, [S. L], v. 103, n. 1, p. 59-65, 2006.

OLSEN, B. R.; REGINATO, A. M.; WANG, W. "Bone development." **Annual review of cell and developmental biology**, [S. L], v.16, n. 1, p. 191-220, 2000.

PARCCELI, F. S. S. S. et. al. Análise histológica do impacto da isotretinoína na ossificação endocondral em ratos Wistar. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Pombal-PB, v. 10, n. 1, p. 75-80, 2015.

- PEREIRA, E.C. et. Al. Anticonceptive activity of crude extracts and atranorin obtained from lichen *Cladonia dendroides* (des. Abb) AHTI. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 21, n. 3, p. 259-264, 2002.
- PLICHET, A. Usnic acid from lichens in therapy of tuberculosis. **Presse Medica**, [S. L], v. 63, n. 17, p. 350, 1995.
- PROCKOP, D. P. et. al. The biosynthesis of collagen and its disorders. **New England Journal of Medicine**, [S. L], v. 301, n. 1, p. 12-23, 1979.
- PRAMYOTHIN, P. et. al. Hepatotoxic effect of (+) usnic acid from *Usnea siamensis* Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria. **Journal Ethnopharmacol**, [S. L], v. 90, n. 2, p. 381-387, 2004.
- RANKOVIC, B. R.; KOSANIC, M. M.; STANOJKOVIC, T. P. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. **BMC complementary and alternative medicine**, [S. L], v. 11, n. 1, p. 97, 2011.
- RIBEIRO-COSTA, R. M. et. al. *In vitro* and *in vivo* properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres. **Journal of Microencapsulation**, [S. L], v. 21, p. 371-384, 2004.
- RIMINUCCI, M. et. al. Vis-a-vis cells and the priming of bone formation. **Journal of bone and mineral Research**, [S. L], v. 13, n. 12, p. 1852-1861, 1998.
- SAIKI, M. et. al. Biomonitoring of the atmospheric pollution using lichens in the metropolitan area of São Paulo city, Brazil. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, [S. L], v. 127, n. 1, p. 213-219, 2007.
- SANCHEZ, W. et. al. Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary supplement containig usnic acid, **Mayo Clinic Proceedings**, [S. L], v. 81, n. 4, p. 541-544, 2006.
- SANTOS, N. P. et. al. Efeito da sazonalidade na produção de metabólitos com ação antitumoral em *Cladonia verticillaris* (líquen). **Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas**, Manaus, v. 1, n. 2, p. 23-43, 1997.
- SANTOS, N. P. S. et. al. Nanoencapsulation of usnic acid: Na attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [S. L], v. 64, n. 2, p. 154-160, 2006.
- SCIRPA, P. et. al. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. **Minerva ginecologica**, [S. L], v. 51, n. 6, p. 255-260, 1999.
- SEGATORE, A. B. et. al. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine**, [S. L], v. 19, n. 3, p. 341-347, 2012.
- SILVA, C. R. Toxicologia do Ácido Úsnico obtido da *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o ciclo reprodutivo das fêmeas Wistar. 2014. p. 62. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em bioquímica e fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, São Paulo, v.71, n. 3, p. 530-539, 2012.

SINGH, N. et. al. Usnic acid inhibits growth and induces cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma A549 cells. **Nutrition and cancer**, [S. L], v. 65, n. 1, p. 36-43, 2013.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; LIRA, M. C. B.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Validação de método analítico espectrofotométrico UV para determinação de ácido úsnico em lipossomas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 1-8, 2008.

SOARES, J. F. et. al. Absorção de chumbo antrópico por populações de líquens do gênero *Usnea* em área industrial. **Revista Monografias Ambientais**, Santa Maria-RS, v. 13, n. 5, p. 3831-3836, 2014.

SHAKIBAEI, M.; MERKER, H. J. β -Integrins in the cartilage matrix. **Cell Tissue Research**, [S. L], v. 296, n. 3, p. 565-573, 1999.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; & YOSHINARI, N. H. Collagen in osteoarthrotic cartilage. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 160-166, 2003.

VERA, J. P. et. al. The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space. I. Influence of UV radiation and space vacuum on the vitality of lichen symbiosis and germination capacity. **International Journal of Astrobiology**, [S. L], v. 1, n. 4, p. 285-293, 2002.

VERA, J. P. et. al. The potential of the lichen symbiosis to cope with extreme conditions of outer space. II. Germination of UV radiation capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions. **Advances in Space Research**, [S. L], v. 33, n. 8, p.1236-1243, 2004.

VIJAYAKUMAR, C. S. et. al. Anti-inflammatory activity of (+)- usnic acid. **Fitoterapia**, [S. L], v. 71, n. 5, p. 564–566, 2000.

WILL-WOLF, S.; HAWKSWORTH, D. L.; MCCUNE, B. Lichenized fungi. In: Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. **Elsevier Academic Press**, [S. L], p. 173-195, 2004.

5. ARTIGO

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA REVISTA **CIÊNCIA ANIMAL BRASILEIRA**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM EM ANEXO.



ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DA DEPOSIÇÃO DO COLÁGENO DOS MEMBROS DA PROLE DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS AO ÁCIDO ÚSNICO DURANTE A PREENHES

RESUMO

Este estudo tem por objetivo avaliar a deposição de colágeno na cartilagem hialina dos membros da prole de ratas prenhas expostas ao ácido úsnico na sua forma livre. Foram utilizadas 12 ratas prenhas distribuídas aleatoriamente em grupos controle (n=6) e tratado (n=6), foram analisados 60 fetos, distribuído 30 fetos para cada grupo. As ratas do grupo controle receberam 1,0 mL de solução fisiológica, e as do grupo tratado 25 mg/kg de ácido úsnico livre por via oral de administração. Ao 20º dia de gestação as fêmeas foram eutanasiadas e seus fetos retirados e analisados. Os resultados da análise microscópica dos membros revelaram alterações durante a formação óssea, com retardo na proliferação dos condrócitos e diminuição na quantidade de condrócitos hipertróficos. Na análise histomorfométrica, a quantidade de colágeno nos membros dos fetos no grupo tratado foi significativamente menor do que a do grupo controle. Com base nestes resultados pode-se inferir que a administração do ácido úsnico de *Cladonia substellata* purificado na dose de 25 mg/kg durante o período gestacional acarretou alterações degenerativas sobre o desenvolvimento ósseo e deposição do colágeno.

PALAVRAS-CHAVES: Fetotoxicidade; Líquens; Tecido ósseo

HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF COLLAGEN DEPOSITION OF WISTAR
ROUTE PROLEUM MEMBERS SUBMITTED TO ASYUNIC ACID DURING PRESSES

ABSTRACT

This study aims to evaluate the deposition of collagen in the hyaline cartilage of offspring members of pregnant rats exposed to the unic acid in its free form. 12 female Wistar rats in pregnancy were randomly distributed in the control group (n= 6) and treatment group (n= 6), and analyzed 60 fetuses, distributed 30 fetuses for each group. The female from the control group received a 1.0 mL of physiological solution and the treatment group received 25 mg/kg of purified usnic acid by oral administration. At the 20th day of gestation, all females were euthanized and their fetuses were removed. The microscopic analysis of the limbs from the treatment group showed alterations in their bone formation, such as delay in chondrocyte proliferation and decrease in the amount of hypertrophic chondrocytes. Furthermore, the amount of collagen in the fetal limbs from the treatment group was lower than the control group. Based on these results, it can be inferred that the administration of *Cladonia substellata* purified single dose at a dose of 25 mg/kg during the gestational period causes degenerative changes on bone development and collagen deposition.

KEYWORDS: Fetotoxicity; Lichens; Bone tissue

INTRODUÇÃO

O ácido úsnico, composto de origem natural resultante do metabolismo secundário de líquens é descrito na literatura com várias propriedades farmacológicas, tais como: antitumoral, antimicrobiano, antiviral, antiproliferativo e anti-inflamatório. Apesar das diversas atividades biológicas relatadas para o ácido úsnico, a sua aplicação terapêutica é limitada, devido as suas propriedades físico-químicas desfavoráveis, como baixa solubilidade em água, difícil interação com as barreiras biológicas e diversos casos de hepatotoxicidade⁽¹⁻³⁾.

No que se relaciona ao ciclo reprodutivo, estudos realizados com o ácido úsnico durante o período da organogênese relatam relevantes sinais de toxicidade na prole de ratas prenhes expostas ao composto. Os fetos provenientes das fêmeas submetidas ao tratamento com o composto apresentaram malformações ósseas, como atrofia dos membros anteriores e posteriores⁽³⁾.

Existem compostos que possuem interações negativas com o sistema esquelético, principalmente no que se diz respeito à exacerbação na dosagem da droga e, a sua utilização em fases críticas do desenvolvimento, como o período gestacional e a idade infantil⁽⁴⁾. Os impactos dessas interações negativas com o sistema esquelético podem estar diretamente relacionados às alterações sobre as redes de colágeno. Assim, podem causar efeitos drásticos no organismo em desenvolvimento⁽⁵⁻⁶⁾.

Alguns casos de toxicidade do ácido úsnico indicam a necessidade de estudos pré-clínicos, para avaliar o potencial do composto em provocar efeitos adversos nos indivíduos expostos, em especial, os efeitos decorrentes da exposição no período gestacional⁽⁷⁾.

Considerando à toxicidade do ácido úsnico durante o ciclo reprodutivo, em especial, durante o período da organogênese, torna-se necessário uma investigação do seu potencial teratogênico na deposição do colágeno na cartilagem hialina dos membros de neonatos expostos ao composto.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram utilizadas 12 ratas Wistar com idade de aproximadamente 60 dias e peso médio de 250 a 300g. De cada rata foram analisados cinco fetos com um total de 60 fetos analisados provenientes do Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. As ratas foram mantidas à temperatura ambiente a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob ciclo dia/noite natural (12h luz e 12h escuro) com

livre acesso de água e alimento durante o experimento. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 23076.029828/2013-94).

Procedimento Experimental

Inicialmente, as fêmeas foram submetidas ao estudo do ciclo estral, no intuito de se determinar o período fértil. Foram coletadas células da parede vaginal e através da técnica de esfregaço foram preparadas lâminas, que posteriormente foram coradas com SHORR. Através de análises microscópicas (Olympus BH-2, Japan) foi identificado o período de ovulação, denominado estro.

Após a confirmação do período de ovulação as fêmeas foram pareadas com machos (2:1) *overnight* e o acasalamento foi confirmado com a presença do "*plug*" (massa esbranquiçada de espermatozoides na abertura vaginal) ou pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal. As primeiras 24 horas após a confirmação do acasalamento foram consideradas como dia zero (D0).

Os animais do grupo controle receberam 1,0 mL de solução fisiológica e as do grupo tratado receberam uma solução com ácido úsnico purificado de *C. substellata* na dose de 25 mg/kg por via oral de administração. A administração foi do 6º ao 15º dia de gestação.

No final da gestação as fêmeas foram eutanasiadas pelos anestésicos cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8mg/kg), por via intramuscular. Após esse procedimento foi realizado o procedimento de cesárea para abertura do útero de cada fêmea e retirada dos fetos. Os fetos também foram eutanasiados pelos anestésicos citados acima. Após a eutanásia foram coletados os membros anteriores e posteriores dos fetos.

Processamento e Análise Histomorfométrica

O material coletado foi fixado em formalina a 10% neutra tamponada (NBF), processados e em seguida submetidos à técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. Os blocos obtidos foram cortados em espessura de 4 µm, corados por Hematoxilina e Eosina (HE) e picrossírius red. Em seguida as lâminas obtidas foram analisadas e fotografadas através do programa Motic® Imagens Plus 2.0 com uma câmera digital acoplada ao computador e ao microscópio óptico (Olympus BH-2, Japan). As lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina foram analisadas 120 lâminas (membros anteriores e posteriores de cada feto) em um aumento total de 40X e 100X. Para a análise histomorfométrica, as lâminas coradas pela coloração

picrosírius red o microscópio óptico foi equipado com um polarizador de luz. Foram obtidas 10 fotomicrografias por lâmina em aumento total de 100X.

Foi utilizado o software *ImageJ* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), nas fotomicrografias obtidas com a coloração de picrosírius red para mensurar a quantidade de colágeno presente na cartilagem hialina. A área do conteúdo de colágeno foi dividida pela área total (mm²). O colágeno presente nos campos analisados foi medido através da seleção de tonalidade birrefringentes (avermelhadas ou alaranjadas), correspondente às bandas de colágeno polarizadas.

Análises estatísticas

Os valores obtidos com as devidas mensurações foram avaliados estatisticamente através do teste-*t* de Student (*software* SPSS, versão 15.0), com significância $p < 0,05$ e expressos no formato de média \pm DP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise microscópica dos membros dos conceptos foi observado que as epífises em ambos os grupos apresentaram-se em molde de cartilagem hialina intacta (Figura 1 A e B). O centro de ossificação primária do grupo controle apresentou-se praticamente com toda a diáfise ossificada (Figura 1 A), enquanto no grupo tratado, o tecido ossificado estava restrito a uma pequena área no centro diafisário (Figura 1 B). Estes resultados indicam um retardo na formação do osso primário.

Na análise da cartilagem hialina durante o processo de ossificação endocondral, foi observado que o grupo tratado demonstrou um retardo na proliferação dos condrócitos (Figura 2 B), assim como, uma menor quantidade de condrócitos hipertróficos (Figura 2 B), comparado ao grupo controle (Figura 2 A). Estas alterações comprometem tanto o crescimento ósseo quanto a formação óssea.

A análise histomorfométrica do colágeno da cartilagem hialina indicou uma menor quantidade de colágeno do tipo II no grupo tratado em relação ao grupo controle (Figura 3 A e B) (Tabela 1).

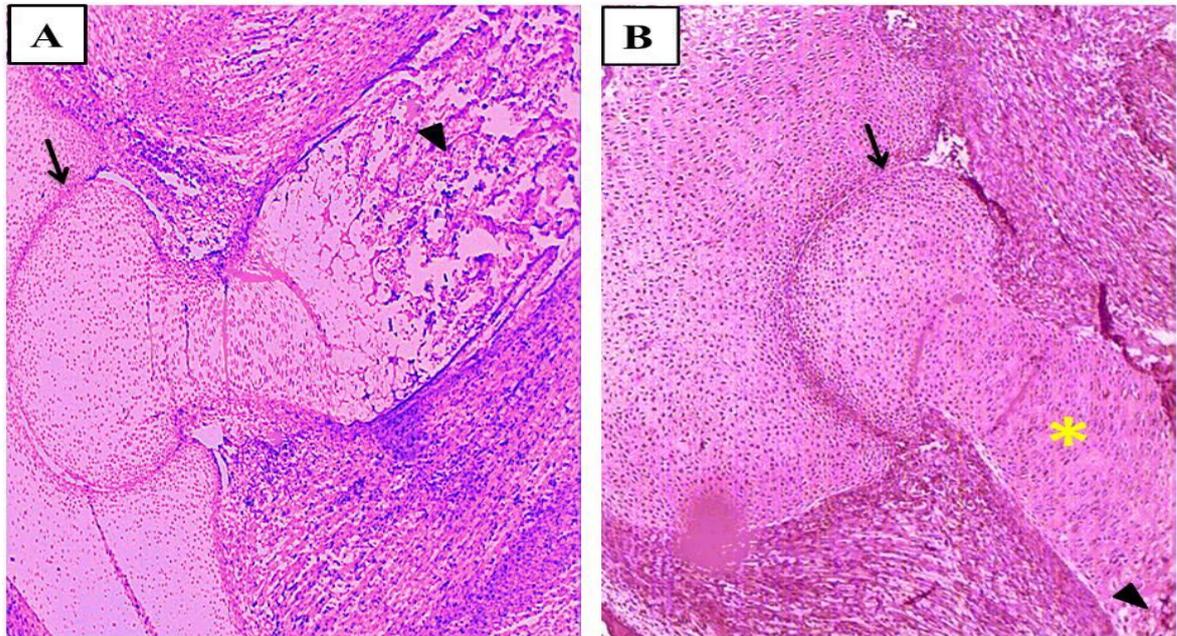


Figura 1. Fotomicrografia do membro anterior da prole do grupo controle (A) e grupo tratado com 25 mg/kg de ácido úsnico purificado de *C. substellata* (B). Visualização das epífises em molde de cartilagem hialina (setas), tecido ósseo no centro primário de ossificação (cabeça de seta), diáfise em molde de cartilagem hialina (asterisco). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento total 40X.

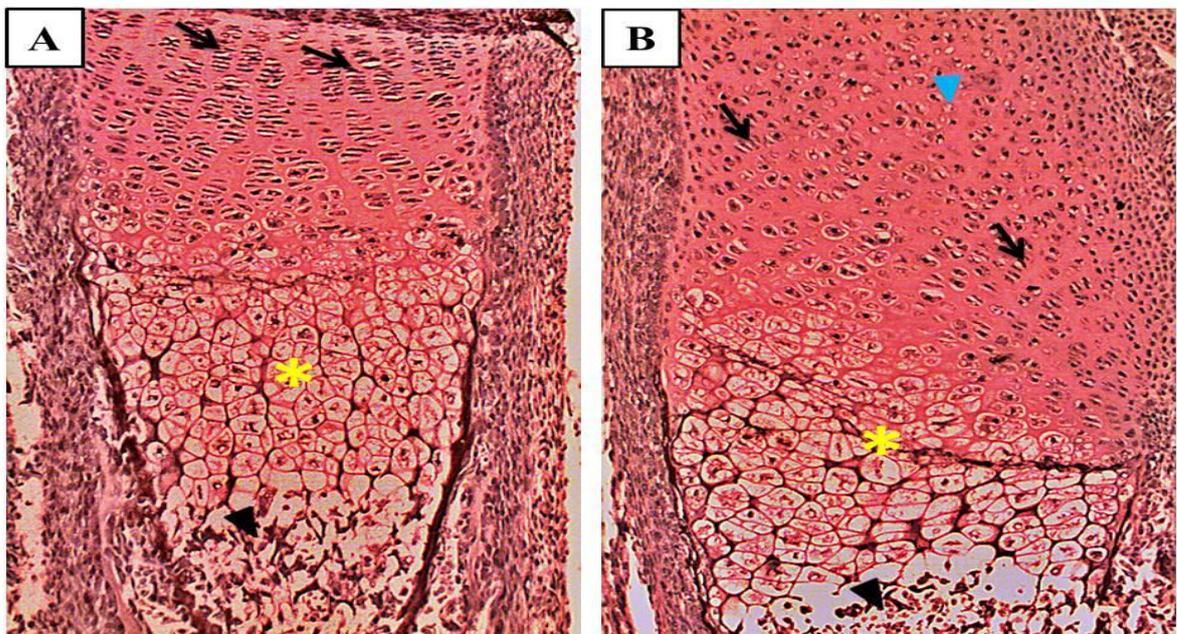


Figura 2. Fotomicrografia do membro da prole do grupo controle (A) e grupo tratado com 25 mg/kg de ácido úsnico purificado (A). Visualização da zona de proliferação dos condrócitos (setas), cartilagem hialina sem modificações (cabeça de seta azul), condrócitos hipertróficos (asterisco), tecido ósseo (cabeça de seta preta). Coloração Hematoxilina e Eosina. Aumento total 100X.

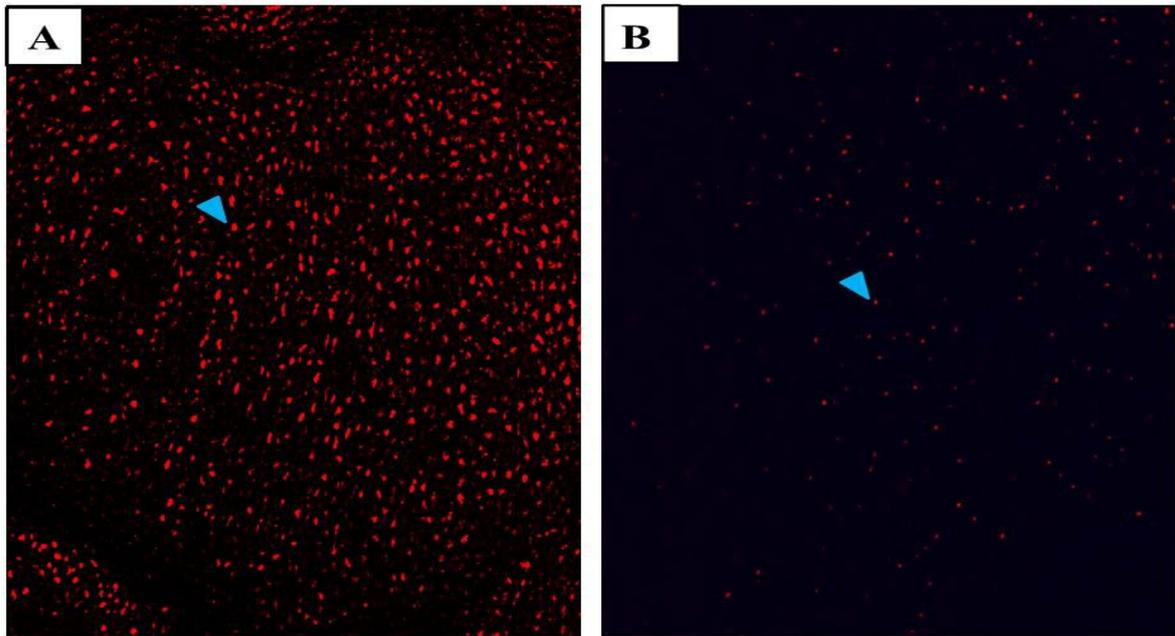


Figura 3. Fotomicrografia da quantidade de colágeno do grupo controle (A) e grupo tratado (B) presente na cartilagem hialina dos membros anteriores e posteriores dos neonatos expostos ao ácido úsnico durante o período da organogênese. Rede de colágeno com birrefringência em vermelho (cabeça de seta) Coloração: picosírius red. Aumento total 100X.

Tabela 1. Análise histomorfométrica da quantidade de colágeno na cartilagem hialina dos membros de neonatos submetidos ao ácido úsnico.

GRUPOS	Média ± (DP)
Controle	0,010 ± 0,006*
Tratado	0,005 ± 0,003

* diferem estatisticamente ao teste *t* a 5% ($P < 0,05$). Dados expressos com média ± desvio padrão (DP). $p = 0,001$

Algumas substâncias tóxicas podem atravessar a barreira placentária e interferir no desenvolvimento embrionário. Por isso, a utilização de qualquer medicamento deve ser feita com cuidado, principalmente em fases críticas do desenvolvimento, como o período gestacional que é uma fase bastante sensível do ciclo reprodutivo⁽⁸⁻¹⁰⁾.

Investigações do potencial toxicológico do ácido úsnico durante o período da organogênese relatam relevantes sinais de toxicidade na prole de ratas prenhas tratadas. Os fetos provenientes das fêmeas submetidas ao tratamento com ácido úsnico durante a gestação não conseguiram prosseguir o seu desenvolvimento, e nos que prosseguiram foram visualizados a presença de malformações, como atrofia dos membros superiores e inferiores⁽³⁾. Estes dados confirmam as alterações degenerativas causadas pelo ácido úsnico encontradas em nossos resultados.

Compostos com propriedades farmacológicas semelhantes a do ácido único, como a betalapachona e a isotretinoína apresentam interações negativas com o sistema esquelético. Pois, segundo Parccelli ⁽¹¹⁻¹²⁾, algumas drogas possuem substâncias tóxicas que podem influenciar diretamente na formação óssea e causar efeitos negativos no desenvolvimento do osso, como um retrocesso na osteogênese e imperfeição dos elementos que constitui o tecido ósseo.

No presente estudo, o retardo na formação do osso confirma o potencial toxicológico do ácido único purificado de *C. substellata* sobre os membros dos fetos expostos a este composto. Estes resultados corroboram com os encontrados por Parccelli ⁽¹²⁾, após realizar um experimento com a isotretinoína. Nesse estudo, os animais expostos ao composto apresentaram um retardo no processo de ossificação, caracterizado histologicamente por um retrocesso e redução dos componentes teciduais que constituem a cartilagem hialina e inibição da osteogênese que causou malformações ósseas.

De acordo com Abad ⁽¹³⁾, retardo na proliferação dos condrócitos compromete o desenvolvimento do osso, já que é a responsável pelo seu crescimento. Essas evidências confirmam as alterações no desenvolvimento ósseo encontradas no presente estudo.

A menor quantidade de condrócitos hipertróficos implica em uma menor mineralização na matriz da cartilagem, a qual pode se tornar resistente à invasão vascular. A vascularização é de extrema importância para formação do osso, através dela as células osteoprogenitoras invadem o tecido cartilaginoso e se diferenciam em osteoblastos, cujos tem a função de sintetizar a matriz orgânica do tecido ósseo ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

As alterações nas redes de colágeno na cartilagem hialina encontradas em nossos estudos podem ser explicadas por Franklin e Hitchen ⁽¹⁷⁾, que algumas substâncias podem influenciar na síntese do colágeno inibindo a ação de algumas enzimas, como a prolina hidroxilase e a lisina hidroxilase que são responsáveis pelo processo de hidroxilação durante a síntese do colágeno. As Alterações nas redes de colágeno presente na cartilagem hialina podem causar malformações ósseas durante o desenvolvimento embriofetal, como a redução dos componentes que constitui o tecido ósseo, diminuição da resistência e tensão ⁽⁵⁾.

O modelo experimental utilizado no presente trabalho demonstrou que o ácido único purificado de *C. substellata* é capaz de provocar alterações no desenvolvimento ósseo. Estas alterações sobre o sistema esquelético pode estar diretamente relacionada à síntese do colágeno, principalmente no colágeno do tipo II.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o ácido úsnico administrado na dose de 25mg/kg causou alterações degenerativas sobre a formação óssea nos membros dos neonatos, com diminuição na quantidade total de colágeno, assim como o crescimento e a formação óssea.

REFERÊNCIAS

1. COCCHIETTO M, SKERT N, NIMIS PL, SAVA G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*. 2002; 89(4): 137-146.
2. INGOLFSDOTTIR K. Usnic acid. *Phytochemistry*. 2002; 61(7): 729-736.
3. SILVA CR. Toxicologia do Ácido Úsnico obtido da *Cladonia substellata* (AHTI) sobre o ciclo reprodutivo das fêmeas Wistar [dissertação]. Recife: Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, 2014. Disponível em https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=163801
4. DUEWELHENKE N, KRUT O, EYSEL P. Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006; 51(1): 54-63.
5. GUSTAFSSON E, ASZODI A, ORTEGA N, HUNZIKER EB, DENKER HW, WERB Z, FASSLER R. Role of collagen type II and perlecan in skeletal development. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003; 995(1): 140-150.
6. SILVA TF, PENNA ALB. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 2012; 71(3): 530-539.
7. BARROS SBM, DAVINO SC. Avaliação da toxicidade. *Fundamentos de Toxicologia*. 3rd ed. São Paulo: Atheneu, p. 59-71, 2008.
8. WANDERLEY AG, LYRA MMA, COSTA-SILVA JH, LIMA CR, ARRUDA VM, ARAÚJO AV, RIBEIRO E, RIBEIRO A, ARRUDA AC, FRAGA MCCA, & LAFAYETTE SSL. Estudo toxicológico reprodutivo da *Azadirachta indica* A. Juss.(Neem) em ratas Wistar. *Revista Fitos Eletrônica*. 2013; 1(2): 53-57.
9. ROMAN S, DAMBROS A, ROSSET A, PISTORE M, SCHIMID A, & CANSIAN R. Toxicidade materna e reprodutiva de extrato hidroalcoólico de *Sonchus oleraceus* L. em ratos wistar. *Revista Perspectiva*. 2014; 38(141): 69-77.

10. OESTENSEN M, KHAMASHTA M, LOCKSHIN M, PARKE A, BRUCATO A, CARP H, DERKSEN R. Anti-inflammatory and immunosuppressive drugs and reproduction. *Arthritis Research & Therapy*. 2006; 8(3): 209-27.

11. DE ALMEIDA ER, LUCENA FRS, SILVA CVNS, COSTA-JUNIOR WS, CAVALCANTI JB, COUTO GBL, SILVA LLS, MOTA DL, SILVEIRA AB, FILHO SDS, & SILVA ACP. Toxicological Assessment of Beta-lapachone on organs from pregnant and non-pregnant rats. *Phytotherapy Research*. 2009; 23(9): 1276-1280.

12. PARCELI FSSS, MEDEIROS HLB, OLIVEIRA TKB, ASSIS TO, VILAR MSA. Análise histológica do impacto da isotretinoína na ossificação endocondral em ratos Wistar. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 2015; 10(1): 75-80.

13. ABAD V, MEYERS JL, WEISE M, GAFNI RI, BARNES KM, NILSSON O, BACHER JD, BARON J. The role of the resting zone in growth plate chondrogenesis. *Endocrinology*. 2002; 143(5): 1851-1857.

14. EDWARDS HMJR. Nutrition and skeletal problems in poultry. *Poultry Science*. 2000;79(7):1018-1023.

15. OLSEN BR, REGINATO AM, WANG W. "Bone development." Annual review of cell and developmental biology. 2000; 16(1): 191-220.

16. KRONENBERG HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003; 423(6937): 332-336.

17. FRANKLIN TJ, HITCHEN M. Inhibition of collagen hydroxylation by 2, 7, 8-trihydroxyanthraquinone in embryonic-chick tendon cells. *Biochemical Journal*. 1989; 261(1): 127-130.

ANEXO A - Normas da revista



Ciência Animal Brasileira é uma publicação da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, com periodicidade trimestral, e que publica trabalhos originais de pesquisa científica em Medicina Veterinária, Zootecnia, Biologia e áreas correlatas, em forma de artigos científicos. Está disponível on-line com artigos na íntegra e acesso livre. É publicada nas datas de 31 de janeiro, 30 de abril, 31 de julho e 31 de outubro.

DIRETRIZES PARA AUTORES

Os trabalhos podem ser redigidos em português ou inglês. Os nomes dos autores, bem como a filiação institucional de cada um dos mesmos, devem ser inseridos nos campos adequados a serem preenchidos durante a submissão e não devem aparecer no arquivo. Ciência Animal Brasileira sugere que o número máximo de autores por artigo seja 6 (seis). Artigos com número superior a 6 (seis) serão considerados exceções e avaliados pelo Conselho Editorial e, se necessário, solicitada a correção como condição para publicação. Sugere-se um número máximo de 20 páginas e as figuras, gráficos e tabelas devem ser colocados no corpo do texto onde forem citados. É importante ressaltar que pesquisas feitas com animais devem citar a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da instituição onde o trabalho foi realizado. A falta dessa aprovação impede a publicação do artigo.

Atualmente a revista não solicita nenhum pagamento financeiro pela submissão ou publicação do artigo, mas se reserva o direito de alterar essa política em circunstâncias futuras, mediante aviso prévio a todos os usuários.

OS TEXTOS DEVEM SER ORGANIZADOS DA SEGUINTE FORMA:

Para submissões em português:

Título em português: Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito;

Resumo: Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado, com um máximo de 200 palavras;

Palavras-chave: idem, e no máximo 5 palavras chave;

Título em inglês (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado;

Abstract (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado;

Keywords: idem

Introdução: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Material e Métodos: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Resultados: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Discussão: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Os tópicos Resultados e Discussão podem ser apresentados juntos dependendo das especificidades da área);

Conclusões: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Agradecimentos: (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Referências (e não bibliografia): Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo. As referências devem ser numeradas na ordem em que aparecem no texto.

A lista completa de referências, no final do artigo, devem estar de acordo com o estilo Vancouver (norma completa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>; norma resumida http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

PARA AS SUBMISSÕES EM LÍNGUA INGLESA, A TIPOGRAFIA E ESPAÇAMENTOS SÃO OS MESMOS, NA SEGUINTE SEQUÊNCIA:

Título em inglês (Title);

Abstract;

Keywords;

Título em português (obrigatório);

Resumo em português (obrigatório);

Palavras-chave;

Introduction;

Material and Methods;

Results and Discussion;

Conclusions;

Acknowledgments (opcional),

References

Artigos do tipo **Nota Científica, Relato de Caso e similares** não estão sendo aceitos para submissão. **Artigos de Revisão de Literatura** somente serão publicados quando solicitados por convite do Conselho Editorial.

As referências a partir de resumos simples ou expandidos e trabalhos completos em anais de eventos são, em muitas ocasiões, de difícil recuperação. Por essa razão, solicitamos que esse tipo de fonte **não** seja utilizada como referência.

Com relação às teses, dissertações e monografias, solicitamos que sejam utilizados apenas documentos dos **últimos três anos** e quando não houver o respectivo artigo científico publicado em periódico. Esse tipo de referência deve, obrigatoriamente apresentar o link que remeta ao cadastro nacional de teses da CAPES e os bancos locais das universidades que publicam esses documentos no formato PDF. Solicita-se, também, priorizar referências de periódicos e não de livros-texto.

O editor científico pode solicitar mais informações em relação às referências no momento de editoração do artigo. Seu pronto atendimento agilizará a sua publicação. O

processo de resgate fácil das informações é o ponto principal de uma referência bibliográfica, técnica ou eletrônica.

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

Trabalho em Periódicos:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7282/#A32362>)

Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW. Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. British Poultry Science. 2003;44(1):139-144.

Trabalho em Periódicos Online:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7281/#A55587>)

Gueiros VA, Borges APB, Silva JCP, Duarte TS, Franco KL. Utilização do adesivo Metil-2-Cianoacrilato e fio de náilon na reparação de feridas cutâneas de cães e gatos [Utilization of the methyl-2-cyanoacrylate adhesive and the nylon suture in surgical skin wounds of dogs and cats]. Ciência Rural [Internet]. 2001 Apr [cited 2008 Oct 10];31(2):285-289. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000200015.

Portuguese.

Livro Inteiro:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7271/#A34171>)

Reis JC. Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária. 1st ed. Olinda: Luci Artes Gráficas; 2003. 651p. Portuguese.

Capítulo de Livro:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7271/#A34915>)

Pascoe PJ. Cuidados pós-operatórios do paciente. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 2nd ed. São Paulo: Manole; 1998. p. 287-299. Portuguese.

Legislação:

Os modelos aqui foram adaptados porque a normalização proposta no Estilo Vancouver não corresponde à realidade brasileira.

Brasil. Constituição 1988. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado; 1988. Portuguese.

Brasil. Ministério da Educação e Ministério da Saúde. Portaria interministerial no. 1000 de 15 de abril de 2004. Resolvem certificar como Hospital de Ensino das Instituições Hospitalares que servirem de campo para a prática de atividades curriculares na área da saúde, sejam Hospitais Gerais e, ou Especializados. Diário Oficial da União. 2004 Abr 16; Seção 1. Portuguese.

Programas de Computador:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7244/>)

SAS Institute. Statistical Analysis System: user guide [CD-ROM]. Version 8. Cary (NC): SAS Institute Inc., 2002.

Websites:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/#A59404>)

Silva MET, Flemming S, Martinez JL, Thomazini PL. Rendimento de carcaça de búfalos (*bubalus bubalis* L.) confinados em terminação, com dietas contendo diferentes relações de volumoso e concentrado. 2 - Características Quantitativas [Internet]. Brasília: Associação Brasileira de Zootecnia; 2010 Oct 8 [cited 2013 Jun 27]. Available from: <http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/reproducao-melhoramento-animal/23861-Rendimento-carcaa-bfalos-bubalus-bubalis-confinados-terminao-com-dietas-contendo-diferentes-relaes-volumoso-concentrado---Caractersticas-Quantitativas.html>. Portuguese.

Solicita-se que o número DOI, ou o link correspondente, dos artigos assim identificados seja acrescentado ao final da referência.

Ribeiro Carina Teixeira, De Souza Diogo Benchimol, Medeiros Jr. Jorge Luiz, Costa Waldemar Silva, Pereira-Sampaio Marco Aurélio, Sampaio Francisco José Barcellos. Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle. Acta Cir. Bras. [periódico na Internet]. 2013 Jun [citado 2013 Jun 27]; 28(6): 419-422. Disponível em:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502013000600003>.

Exemplo de citação

Reports of *L. similis* lesion are scarce in the literature. Histopathological studies with three *Loxosceles* species of clinical importance, *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. reclusa*, showed that the venom induces vasodilation, edema, inflammatory infiltrate (mainly neutrophilic), hemorrhage, cutaneous muscle necrosis, thrombosis and arteriolar walls degeneration^(6, 13-15). It is necessary to elucidate whether the histological lesion induced by the *Loxosceles similis* venom is similar to that observed in other species of medical importance. Furthermore, it is important to determine the pathogenesis of the loxoscelic dermonecrotic lesion(...)

According to Zanetti et al.⁽¹⁷⁾ and Nowatzki et al.⁽¹⁸⁾ who studied the action of the *L. intermedia* venom in vitro on endothelial cells, it was observed that 18 hours after the venom action, cells showed plasmatic membrane convolutions and chromatin condensation.

6. Futrell J. Loxoscelism. Am J Med Sci. 1992;304(4):261-7.

13. Smith WC, Micks WD. The role of polymorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider (*Loxosceles reclusa*). Lab Invest. 1970;22:90-3.

14. Strain GM, Snider TG, Tedford BL, Cohn GH. Hyperbaric oxygen effects on brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation in rabbits. Toxicol. 1991;29(8):989-96.

15. Ospedal KZ, Appel MH, Neto JF, Mangili OC, Sanches Veiga S, Gremski W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. Int J Exp Pathol. 2002;83(6):287-94.

17. Zanetti VC, da Silveira RB, Dreyfuss JL, Haoach J, Mangili OC, Veiga SS, et al. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. Blood Coagul Fibrinolysis. 2002;13(2):135-48.

18. Nowatzki J, de Sene RV, Paludo KS, Veiga SS, Oliver C, Jamur MC, et al. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. Toxicol. 2010;56(4):535-43

(Fonte: Pereira NB, Kalapothakis E, Vasconcelos AC, Chatzaki M, Campos LP, Vieira FO et al . Histopathological characterization of experimentally induced cutaneous loxoscelism in rabbits inoculated with *Loxosceles similis* venom. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis [periódico na Internet]. 2012 [citado 2013 Nov 04]; 18(3): 277-286. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167891992012000300005&lng=pt.
<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992012000300005>).

CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. Os autores devem estar cientes de que são os responsáveis diretos por todo o conteúdo de seu artigo.
3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB). No arquivo da submissão, excluir apenas os nomes e identificação dos autores, todos os outros elementos (título em português e em inglês, resumo, palavras chave, abstract e key words) devem permanecer no arquivo. O preenchimento do cadastro inclui todos os autores envolvidos (máximo de 6 autores), selecionando o contato principal. Atentar para o item 6 destas normas.
4. Todos os endereços de URLs no texto (Ex.:<http://www.ibict.br>) estão ativos e prontos para clicar.
5. O texto está em espaço 1,5 com linhas numeradas; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na seção Sobre a Revista.
7. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos). Os nomes de TODOS os autores, com sua respectiva identificação institucional, foi cadastrada nos metadados da submissão, usando a opção incluir autor.
8. Nos casos de artigos que envolvam pesquisa com animais, é obrigatória a inserção da aprovação pelo Comitê de Ética da instituição de origem do trabalho. Caso a pesquisa tenha envolvido questionário aplicado a pessoas, será necessário a aprovação pelo Comitê de Ética Humano da instituição, também.

9. Incluir em documentos suplementares a declaração de anuência com a assinatura de todos os autores do artigo, conforme explicado em notícia da página principal. Veja o modelo da declaração:

Modelo da carta

DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Os autores abaixo-assinados declaram, para fins de submissão à Revista Ciência Animal Brasileira, publicada pela Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, que o artigo "Título" é original, inédito e não foi submetido a outro periódico.

Os autores expressam sua anuência acerca da submissão, assim como da Política Editorial, das Diretrizes para Publicação e da Declaração de Direito Autoral, que se aplicarão em caso de aceite e posterior publicação do artigo. Ao lado de cada nome e assinatura, consta uma descrição breve de como o autor participou da referida pesquisa.

Cidade, data.

Autores

1. Nome, descrição breve da participação, Assinatura
2. Nome, descrição breve da participação, Assinatura
3. Nome, descrição breve da participação, Assinatura
4. Nome, descrição breve da participação, Assinatura
5. Nome, descrição breve da participação, Assinatura
6. Nome, descrição breve da participação, Assinatura

DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

- a. Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a **Licença Creative Commons Attribution** que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.

- b. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.
- c. Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja O Efeito do Acesso Livre).

POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.