

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**JÚLIA FARIA DENADAI**

**EFEITOS DE DOSES TERAPÊUTICAS DE DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) SOBRE  
ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA VIA CÂMERA DE NEBULIZAÇÃO**

VILA VELHA – ES

2024

**JÚLIA FARIA DENADAI**

**EFEITOS DE DOSES TERAPÊUTICAS DE DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) SOBRE  
ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA VIA CÂMERA DE NEBULIZAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
disciplina de Estágio Supervisionado do Curso de  
Medicina Veterinária da Universidade Vila Velha.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Tadokoro.

VILA VELHA – ES

2024

ESTE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO FOI ELABORADO SEGUNDO AS  
NORMAS DA REVISTA CIÊNCIA RURAL (REVISTA CIENTÍFICA DO CENTRO DE  
CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA)

DENADAI, J. F. **Efeitos de doses terapêuticas de dimetilsulfóxido (DMSO) sobre asma experimental induzida via câmara de nebulização.** Vila Velha – ES, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Vila Velha, Vila Velha – ES, 2024.

### **Resumo**

A asma é uma doença crônica inflamatória das vias aéreas, com elevada prevalência e morbidade. Na medicina veterinária, as espécies que apresentam quadro asmático mais recorrente são os felinos e os equinos. Estudos relatam que a poluição do ar afeta diretamente o quadro asmático: seus efeitos são elucidados através de trabalhos experimentais que utilizam modelos animais, em especial, roedores. Para a investigação do quadro asmático, protocolos de indução em camundongos via câmara de inalação se mostraram menos invasivos e mais próximos da realidade de exposição ao alérgeno. O dimetilsulfóxido (DMSO) é uma substância orgânica amplamente utilizada em aplicações laboratoriais e clínicas, sendo o objetivo e interesse científico deste trabalho verificar seu efeito imunomodulador sobre a asma. Camundongos foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle, grupo imunizado e não tratado, grupo imunizado e tratado com DMSO. Os animais passaram por desafio e foram eutanaziados para coleta de amostras de sangue e linfonodos, analisadas por citometria de fluxo. O uso de doses terapêuticas de DMSO em camundongos induzidos a asma resultou na diminuição proporcional de células TCD4 no linfonodo mesentérico, demonstrando que o DMSO atuou sobre orquestradores imunológicos da asma.

**Palavras-chaves:** Imunologia, alergia, imunomodulador, inalação, citometria.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>5</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>7</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>5. AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>16</b>
<b>6. COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>16</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>17</b>
<b>8. ANEXO – INSTRUÇÕES AO AUTORES REVISTA CIÊNCIA RURAL.....</b>	<b>22</b>

## **Efeitos de doses terapêuticas de dimetilsulfóxido (DMSO) sobre asma experimental induzida via câmara de nebulização**

### **Effects of therapeutic doses of dimethylsulphoxide (DMSO) on experimental asthma induced via nebulization chamber**

Júlia Faria Denadai<sup>1</sup>; Carlos Eduardo Tadokoro<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Curso de Medicina Veterinária, Universidade Vila Velha, Vila Velha, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Vila Velha, Vila Velha, Espírito Santo, Brasil.

\*Autor para correspondência: carlos.tadokoro@uvv.br

#### **RESUMO**

A asma é uma doença crônica inflamatória das vias aéreas, com elevada prevalência e morbidade. Na medicina veterinária, as espécies que apresentam quadro asmático mais recorrente são os felinos e os equinos. Estudos relatam que a poluição do ar afeta diretamente o quadro asmático: seus efeitos são elucidados através de trabalhos experimentais que utilizam modelos animais, em especial, roedores. Para a investigação do quadro asmático, protocolos de indução em camundongos via câmara de inalação se mostraram menos invasivos e mais próximos da realidade de exposição ao alérgeno. O dimetilsulfóxido (DMSO) é uma substância orgânica amplamente utilizada em aplicações laboratoriais e clínicas, sendo o objetivo e interesse científico deste trabalho verificar seu efeito imunomodulador sobre a asma. Camundongos foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle, grupo imunizado e não tratado, grupo imunizado e tratado com DMSO. Os animais passaram por desafio e foram eutanaziados para coleta de amostras de sangue e linfonodos, analisadas por citometria de fluxo. O uso de doses terapêuticas de DMSO em camundongos induzidos a asma resultou na diminuição proporcional de células TCD4 no linfonodo mesentérico, demonstrando que o DMSO atuou sobre orquestradores imunológicos da asma.

**Palavras-chaves:** Imunologia, alergia, imunomodulador, inalação, citometria.

## **ABSTRACT**

Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways, with high prevalence and morbidity. In veterinary medicine, the species that present asthmatic symptoms most frequently are felines and equines. Studies report that air pollution directly affects asthmatic symptoms: its effects are elucidated through experimental studies using animal models, especially rodents. To investigate asthmatic symptoms, induction protocols in mice via inhalation chambers have proven to be less invasive and closer to the reality of exposure to the allergen. Dimethyl sulfoxide (DMSO) is an organic substance widely used in laboratory and clinical applications, and the objective and scientific interest of this study is to verify its immunomodulatory effect on asthma. Mice were divided into three experimental groups: control group, immunized and untreated group, and immunized and treated with DMSO group. The animals underwent a challenge and were euthanized for collection of blood and lymph node samples, analyzed by flow cytometry. The use of therapeutic doses of DMSO in asthma-induced mice resulted in a proportional decrease in CD4 T cells in the mesenteric lymph node, demonstrating that DMSO acted on immunological orchestrators of asthma.

**Key words:** Immunology, allergy, immunomodulator, inhalation, cytometry.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a poluição é o maior fator ambiental de doenças e de mortes prematuras no mundo (LANDRIGAN et al., 2017). Dentre as formas de poluição ambiental, a poluição do ar se destaca como causa dos efeitos mais severos para a saúde humana. Em 2015, a poluição do ar foi responsável por 6,4 milhões de mortes, 64% foram atribuídas à poluição atmosférica ambiental, e 36% decorrentes da poluição atmosférica nos ambientes interiores das casas em atividades domésticas (FOROUZANFAR et al., 2016; LANDRIGAN, 2017). No mesmo ano, o uso de tabaco causou 7 milhões de mortes; a tuberculose, 1,1 milhões; e a malária, 700 mil (LANDRIGAN, 2017; WANG et al., 2016). Mantidas as condições atuais de controle das emissões de poluentes e considerando os incrementos projetados nos níveis de poluentes na atmosfera, estima-se que a taxa anual de mortes devidas à poluição atmosférica ambiental alcançará valores entre 6 e 9 milhões em 2060 (LANDRIGAN, 2017; OECD, 2016).

São muitos os trabalhos que relatam que a poluição do ar afeta a saúde. Nota-se um forte crescimento no número de publicações a partir da década de 1990, em época coincidente com avanços tecnológicos e maior difusão dos métodos de monitoramento da qualidade do ar e crescimento da conscientização ambiental em escala global. Nestas últimas décadas, um grande número de estudos epidemiológicos e toxicológicos têm demonstrado associações entre o aumento das concentrações de material particulado e o aumento da morbidade e mortalidade causada por doenças cardiopulmonares (DOCKERY et al., 1993; HAMRA et al., 2014; LADEN et al., 2006; LANDRIGAN, 2017; MARTIN et al., 2010; PETERS e POPE III, 2002; POPE III e DOCKERY, 2006; RIVA et al., 2011). Apesar dos estudos experimentais com seres humanos serem os melhores em termos de obtenção de dados diretamente relacionados com a população de interesse, por motivos éticos e de padronização dos grupos experimentais, ainda há a necessidade de utilização de modelos animais. Entre os animais de laboratório encontramos os camundongos e ratos como os animais mais utilizados na pesquisa científica. Estes roedores têm sido utilizados para estudos dos efeitos de poluentes atmosféricos para emulação de ambientes poluídos e descrição dos seus efeitos para diferentes doenças, incluindo, cardiopulmonares, resposta inflamatória alérgica e estresse oxidativo, permitindo a investigação do impacto do PM para a saúde (MAES et al., 2010; MARTIN et al.,



2010; OGINO et al., 2014; ORONA et al., 2016; RIVA et al., 2011; YOSHIZAKI et al., 2017).

A asma é uma doença crônica das vias aéreas, com elevada prevalência e morbidade em todo o mundo, caracterizada por limitação do fluxo aéreo e hiper-responsividade brônquica (GUALDI et al., 2010). A inflamação brônquica exerce um papel central na fisiopatogenia da doença, orquestrada principalmente por linfócitos T-helper (Th), que expressam citocinas que ativam a resposta alérgica, como interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13 (FULKERSON, 2005). A presença e atividade de eosinófilos, macrófagos, mastócitos, imunoglobulina (Ig) E específica para alérgenos e linfócitos Th2 nas vias aéreas são características da doença (NIALS e UDDIN, 2008).

Na medicina veterinária, as espécies que apresentam quadro asmático mais recorrente e, conseqüentemente, possuem mais estudos acerca da enfermidade (no que se refere aos mecanismos da doença, sinais clínicos, diagnóstico e tratamento) são os felinos e os equinos. O termo “síndrome da asma equina” engloba a doença inflamatória das vias aéreas, a obstrução recorrente de vias aéreas e sua variante associada às pastagens de verão. A asma equina apresenta-se como uma das condições mais comumente diagnosticadas que afetam as vias aéreas de menor calibre de equinos estabulados, com alta prevalência mundial (SAD, 2019). Outra condição clinicamente similar foi relatada durante os meses de verão, conhecida como asma equina grave associada a pastagens de verão, atribuída a uma maior umidade do ar concomitante com temperaturas mais elevadas. Ainda segundo SAD (2019), doenças inflamatórias não infecciosas do trato respiratório posterior compartilham grandes semelhanças com a asma humana em termos de etiologia, apresentação clínica, alterações de remodelamento tecidual e resposta à terapia. Nos gatos, a asma, de modo semelhante ao homem, tem como processo subjacente uma reação de hipersensibilidade tipo I. As semelhanças existentes entre a doença nas duas espécies, reforça a importância de cruzar e utilizar informações existentes na medicina humana, em especial no diagnóstico e terapêutica, na medicina veterinária (RIBEIRO, 2020).

Para a investigação científica do quadro asmático, são utilizados protocolos de indução em camundongos (ZOZKY e SLY, 2007). Camundongos da linhagem BALB/c desenvolvem inflamação pulmonar semelhante aos humanos, marcado pelo

recrutamento de mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, IgE e hipersecreção de muco (GUEDERS et al, 2009). Uma vez que o protocolo de indução de asma via câmara de inalação se mostrou menos invasivo e mais próximo da realidade de exposição ao alérgeno, visto que não é necessário sedar o camundongo, e apresentou resultados equivalentes ao método de instilação, que já vem sendo muito utilizado, optou-se pelo uso da câmara de nebulização. Além disso, o uso da câmara de nebulização vai de encontro ao princípio dos “3 Rs” (*Replacement, Reduction and Refinement*), criado por Russell e Burch em 1959, que tem como premissa uma abordagem mais humanitária para os animais utilizados em experimentação científica.

O dimetilsulfóxido (DMSO) é uma substância muito utilizada em experimentos como veículo de diversos tipos de ácidos, carboidratos e lipídios, por ser muito eficaz em penetrar membranas. Atualmente, o DMSO é amplamente utilizado para a preservação de várias linhagens celulares e tecidos para aplicações laboratoriais e clínicas (LOVELOCK e BISHOP, 1959). Na clínica, tem sido usado para fins terapêuticos no tratamento de diversas doenças (HUANG et al., 2018). Estudo realizado por ELISIA et al. (2016) demonstrou que o tratamento com DMSO a 2% reprimiu a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ . Ainda em aplicações clínicas, SHEALY (1966) observou a ocorrência de perda total de resposta central à dor ao administrar solução de DMSO a 10%, por via subcutânea, na dose única de 4g/kg em gatos. Recentemente, estudos demonstraram os efeitos imunomoduladores do DMSO (HUANG, 2020). SALIM (1992) propôs seu uso para o tratamento de colite ulcerosa. Enquanto em SOLER et al. (2008) foi demonstrado que o uso de DMSO a 50% reduz inflamação de bexiga induzida por cistite não bacteriana, em ratos da linhagem Wistar. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é verificar os efeitos imunomoduladores do uso de doses terapêuticas de DMSO sobre a asma experimental.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi executado nos laboratórios da Universidade Vila Velha, enquanto as amostras foram processadas e analisadas por citometria de fluxo no laboratório *Enterprise*. As etapas consistiram no cálculo estatístico para determinar o tamanho

da amostra, definição dos grupos experimentais, imunização, reforço e desafio dos animais.

Para determinar o cálculo estatístico do tamanho da amostra, utilizou-se os resultados obtidos no estudo "*Macrophage and dendritic cell subset composition can distinguish endotypes in adjuvant-induced asthma mouse models*" (ÖZKAN et al., 2021), baseando-se nos resultados do padrão Th2 da resposta asmática em camundongos obtidos nesse estudo. Considerando-se que o experimento proposto para esse projeto é unilateral e não pareado, adotando-se desvio padrão ( $\alpha = 0,05$ ), pelo cálculo estatístico quantitativo obtém-se o tamanho da amostra aproximado de 9,24 animais por grupo experimental, ou seja, 10 animais por grupo.

Uma vez determinado o número mínimo da amostra, foram utilizados, ao todo, 30 camundongos machos da linhagem BALB/c, obtidos no biotério da Universidade Vila Velha (UVV). Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo Controle (CTR); Grupo Imunizado e não tratado com DMSO (IM) e Grupo Imunizado e tratado com DMSO (IMD).

A etapa de imunização foi realizada no dia 0 do experimento; foram injetados 200uL de solução contendo albumina de galinha (OVA), como alérgeno indutor do processo asmáticos, e Hidróxido de Alumínio ( $[Al(OH)_3]$ ) por animal (concentração de 20mg/mL de OVA e 10mg/ml de Hidróxido de Alumínio), pela via intraperitoneal. No grupo controle (CTR) foi injetado 200uL de solução salina (PBS), também pela via intraperitoneal.

A etapa do reforço foi realizada no dia 14 do experimento; foram injetados 200uL de solução contendo OVA e  $Al(OH)_3$  por animal (concentração de 20mg/mL de OVA e 10mg/ml de Hidróxido de Alumínio), via intraperitoneal. No grupo controle (CTR) foi injetado 200uL de PBS, também pela via intraperitoneal.

Quanto ao tratamento com DMSO, foi administrado em dose terapêutica (0,5 g/kg intraperitoneal BID – solução a 10%) no grupo IMD durante três dias consecutivos, correspondentes aos dias do desafio experimental. Cada animal pesava em média 25g. Foi injetado um volume de 100uL/animal (12,5uL de DMSO + 87,5uL de PBS).

A etapa de Desafio consistiu em: inalação de solução com OVA durante três dias consecutivos, com intervalo de 24h entre os períodos de inalação; injeção de solução com OVA na pata direita de todos os animais, no primeiro dia de desafio,

seguido da posterior medição dessas patas em intervalos pré-definidos (0,5h, 1 h, 2h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h após a aplicação). Nestes três dias foi realizado o tratamento com DMSO, administrado em dose terapêutica (0,5 g/kg IV BID – solução a 10%) no grupo IMD.

Para a inalação, os animais foram divididos em dois procedimentos:

- (a) Camundongos do Grupo IM e IMD foram alocados em uma caixa de plástico, com tampa, conectada a dois aparelhos de nebulização. Cada aparelho continha solução de OVA, na concentração de 10mg/mL, em seu respectivo recipiente. A nebulização foi feita por um período de 30 minutos.
- (b) Camundongos do Grupo CTR foram alocados em uma caixa de plástico, com tampa, conectada a dois aparelhos de nebulização. Cada aparelho continha PBS em seu respectivo recipiente. A nebulização foi feita por um período de 30 minutos.

Nos testes de inflamação cutânea, foram injetados 30uL da solução de OVA (20mg/mL) na pata direita de todos os animais, independente do grupo, de modo que cada animal recebesse 600ug de ova. Em seguida, foi realizada medição dessas patas em intervalos de 0,5 hora (h), 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h após a aplicação, para mensuração da resposta inflamatória nos respectivos intervalos.

A etapa de Desafio foi realizada nos dias 22, 23 e 24 após imunização dos animais. No dia 25 do experimento, todos os animais foram eutanasiados (através da superdosagem de anestésicos) para que amostras de sangue, de pulmão direito e de linfonodos (mesentérico e mediastinal) fossem processadas em citometria de fluxo, para avaliação dos tipos celulares presentes.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para avaliar qual a possível interferência do DMSO nos padrões Th1 e Th2, foi mensurada a resposta inflamatória pelo aumento da espessura das patas após desafio com OVA em animais imunizados ou não com OVA e Al(OH)<sub>3</sub>, e tratados ou não com DMSO. A medição dessas patas foi realizada em intervalos de 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h após a aplicação. Os valores obtidos foram compilados na Figura 1.

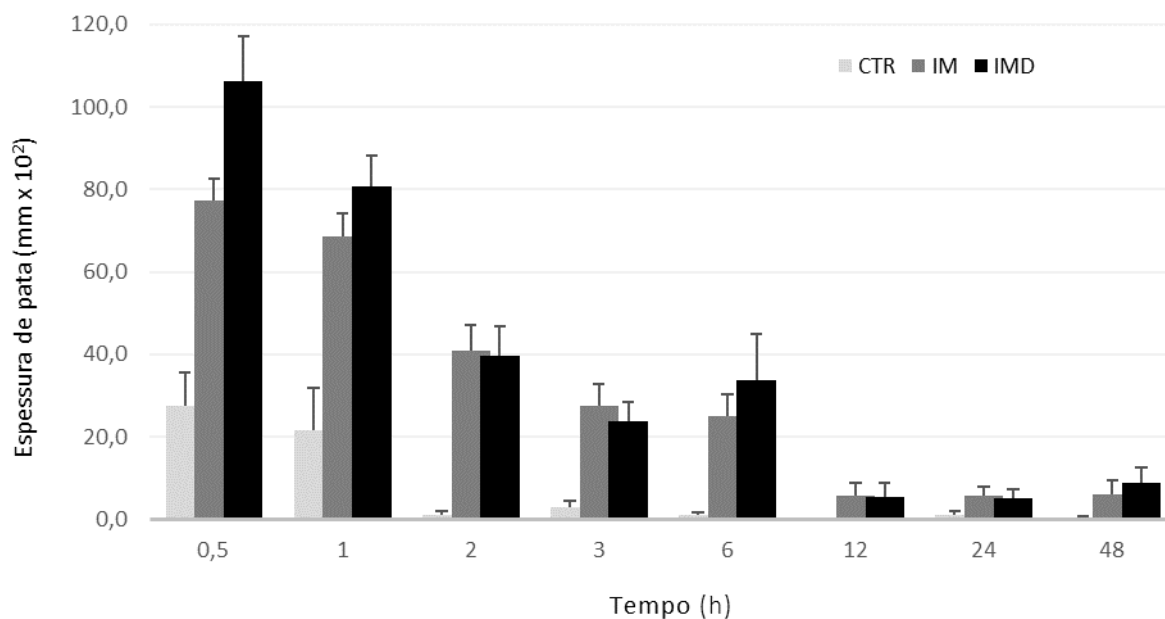


Figura 1 - Mensuração da resposta inflamatória através da medição de patas. Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais: Grupo Controle (CTR); Grupo Imunizado e não tratado com DMSO (IM) e Grupo Imunizado e tratado com DMSO (IMD). Após realizado o protocolo para indução de asma experimental (imunização e reforço), foi injetado 30uL de solução de OVA e Al(OH)<sub>3</sub> (concentração de 20mg/mL de OVA e 10mg/ml de Hidróxido de Alumínio) na pata direita de todos os animais, em intervalos de 30min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, 24h e 48h após a aplicação; os resultados referentes à espessura média das patas de cada grupo em cada intervalo de tempo estão apresentados nesta figura.

A mensuração da resposta inflamatória observada nas patas sugere a eficiência do protocolo de imunização experimental (fase de imunização e reforço). Animais imunizados com solução de OVA e Al(OH)<sub>3</sub> apresentam um inchaço imediato e uma resposta de fase tardia que apresenta intensidade máxima em 24 h (JANCAR et al., 1997). Os resultados de espessura de pata obtidos (Figura 1) demonstram que o processo de imunização dos grupos IM e IMD foi satisfatório para os primeiros minutos e horas após o desafio: nos intervalos de 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, e 6 h, quando comparados ao grupo CTR e, para respostas tardias, em 12 h, 24 h e 48 h, também é possível verificar um grau de inflamação maior em relação ao grupo CTR, embora com intensidade reduzida (Figura 1). A resposta exacerbada em 0,5 h é condizente com o esperado na resposta de hipersensibilidade imediata (tipo I), dependente do padrão Th2 de resposta imune. Ou seja, demonstrou-se que os

grupos que foram submetidos ao processo de imunização e reforço desenvolveram um padrão Th2 de resposta imune.

O uso de DMSO na medicina se tornou, nos últimos anos, amplamente utilizado por seu efeito anti-inflamatório (PARKIN et al., 1997). No entanto, comprovou-se que o DMSO induz uma resposta de fase aguda durante a inflamação, induzindo a infiltração de leucócitos dérmicos (SJOGREN e ANDERSON, 2000). Além dessa resposta, também se comprovou que o DMSO aumenta a liberação de histamina (SWANSTON et al., 1982). Um estudo realizado por MATIĆ et al. (2004) demonstrou que uma injeção intraperitoneal de DMSO (1 mg/g de peso corporal) em ratos induziu uma resposta de fase aguda no início da fase de inflamação. Ainda na Figura 1, observa-se que, especialmente nas primeiras 0,5 h, a espessura de pata do grupo IMD foi superior se comparada aos demais grupos, revelando que o uso de DMSO, nesta etapa do experimento, pode ter apresentado o mesmo efeito pró-inflamatório relatado em outros estudos. Após este primeiro intervalo, percebe-se que a diferença entre o grupo IM e IMD tornou-se cada vez menor, demonstrando que o uso de DMSO não interferiu na imunidade inata dos animais já submetidos ao tratamento nesta etapa do procedimento pois, em ambos os grupos imunizados, houve resposta alérgica (sem diferença estatísticas entre os grupos), independente do uso de DMSO em sua dose terapêutica.

Amostras de sangue, pulmão direito e de linfonodos (mesentérico e mediastinal) foram analisadas em citometria de fluxo para que fossem observadas alterações relacionadas ao padrão Th2 de resposta (aumento de eosinófilos - Eos. Siglec-F+ - é uma característica marcante nos casos de asma) e, concomitantemente, foram analisadas também as porcentagens das células reguladoras (CD3+CD4+FoxP3+), uma vez que estas células suprimem respostas inflamatórias. As frequências das populações de células B (CD19+), células T CD8 ou CD4, células dendríticas mieloides (CD11c+CD11b+), neutrófilos (Ly-Gr1+), e macrófagos inflamatórios (CD11b+F4/80+) também foram avaliadas, pois alterações nestas frequências poderiam influenciar a resposta inflamatória. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 2 a 4.

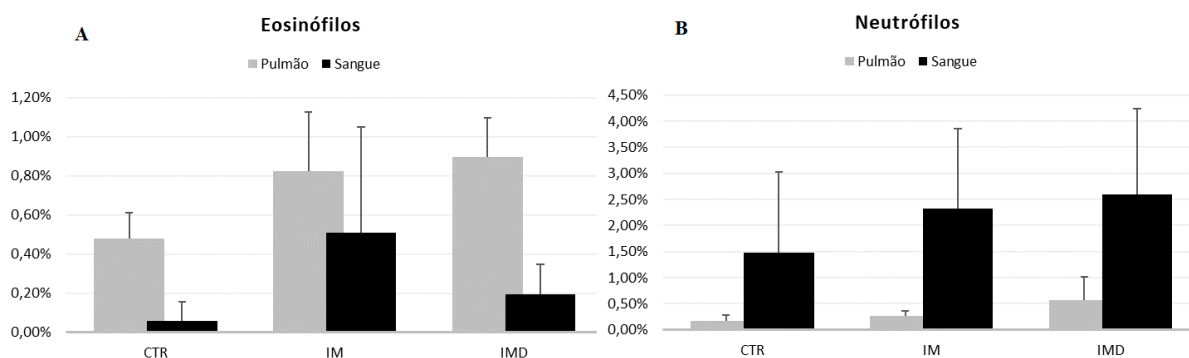


Figura 2 - Efeito do tratamento com DMSO nas células efetoras da Imunidade Inata. Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais: Grupo Controle (CTR); Grupo Imunizado e não tratado com DMSO (IM) e Grupo Imunizado e tratado com DMSO (IMD); após realizado o protocolo para indução de asma experimental, os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de pulmão e sangue para análise em citometria de fluxo, sendo os resultados obtidos representados nesta figura, onde as colunas representam as médias da porcentagem de células: A, células CD11c-, CD11b-, SiglecF+, LyGr1-; B, células CD11c-, CD11b-, SiglecF-, LyGr1+.

Embora o infiltrado inflamatório seja composto de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, a presença de eosinofilia é um marcador importante para o diagnóstico de asma (CAMPOS e PEREIRA, 2009). Na Figura 2A é possível observar que a porcentagem de eosinófilos no pulmão é maior se comparada a taxas no sangue e, concomitantemente, as porcentagens são mais elevadas nos grupos de animais onde a asma experimental foi induzida (IM e IMD). Com isso, pode-se comprovar a eficácia do protocolo de indução de asma utilizado.

Na maior parte dos estudos que demonstram o efeito de DMSO sobre a imunidade inata se restringem à análise de suas propriedades terapêuticas para neoplasias malignas; nestes casos, o uso de DMSO aumentou a capacidade das células Natural Killer (NK) e a lise mediada por linfócitos T citotóxicos em linfomas (YAMASAKI et al., 1988). Um estudo realizado por ORLATO (2006), em que cães saudáveis receberam DMSO a 10% por via intravenosa (dose de 1g/kg de peso corporal) a cada doze horas, durante três dias, concluiu que não houve alterações no leucograma destes animais. A partir dos resultados obtidos e expressos na Figura 2, também se conclui que não foi observada diferença estatística entre os grupos IM e IMD, demonstrando que o uso de DMSO em sua dose terapêutica não interferiu na resposta inata dos animais induzidos a asma, resposta essa avaliada pela porcentagem de eosinófilos e neutrófilos.

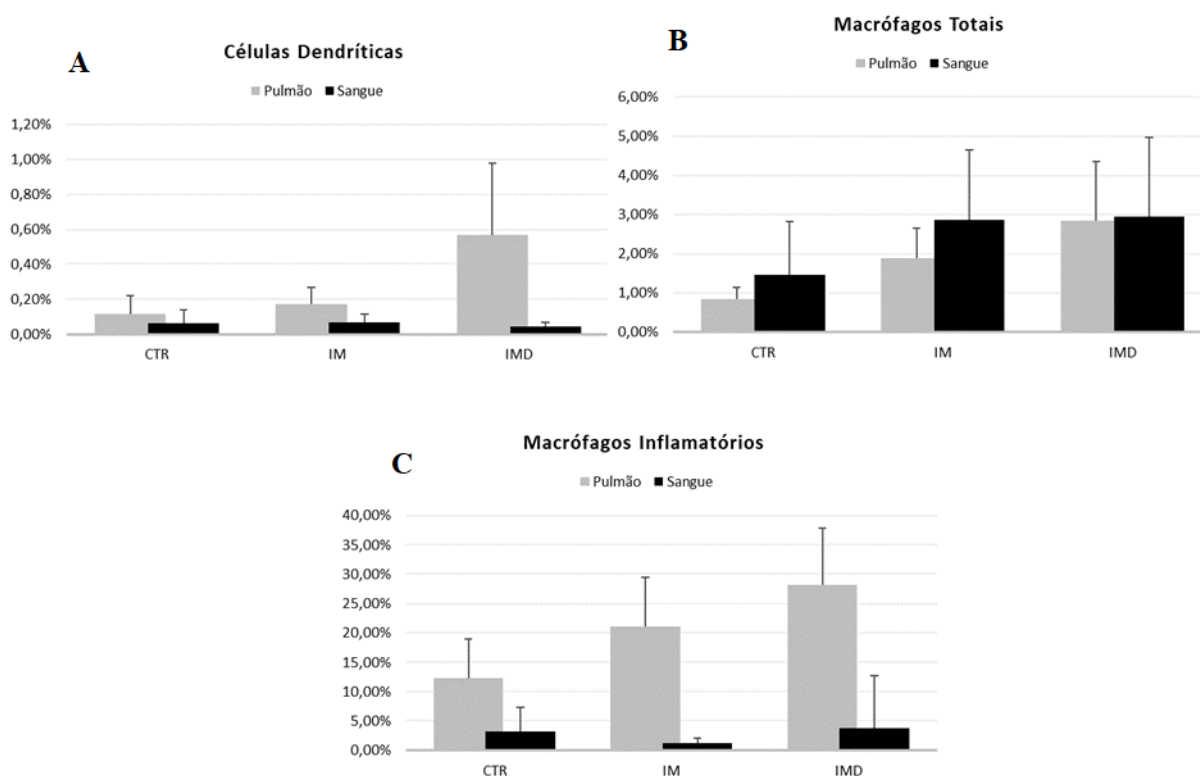


Figura 3 - Efeito do tratamento com DMSO nas Células Apresentadoras de Antígenos (APC). Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais: Grupo Controle (CTR); Grupo Imunizado e não tratado com DMSO (IM) e Grupo Imunizado e tratado com DMSO (IMD); após realizado o protocolo para indução de asma experimental, os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de pulmão e sangue para análise em citometria de fluxo, sendo os resultados obtidos representados nesta figura, onde as colunas representam as médias da porcentagem de células: A, células CD11c+, CD11b+; B, células CD11c-, CD11b+; C, CD11c-, CD11b+, F4/80+.

O uso de DMSO diminui a concentração de células dendríticas em camundongos diabéticos não obesos (LIN et al., 2015). Em macrófagos, seu uso inibe a polarização M1 e M2 (ELISIA et al., 2016). Entretanto, conforme os resultados experimentais expressos na figura 3, não foi observada diferença estatística entre os grupos IM e IMD no que refere a células apresentadoras de antígenos (APCs).



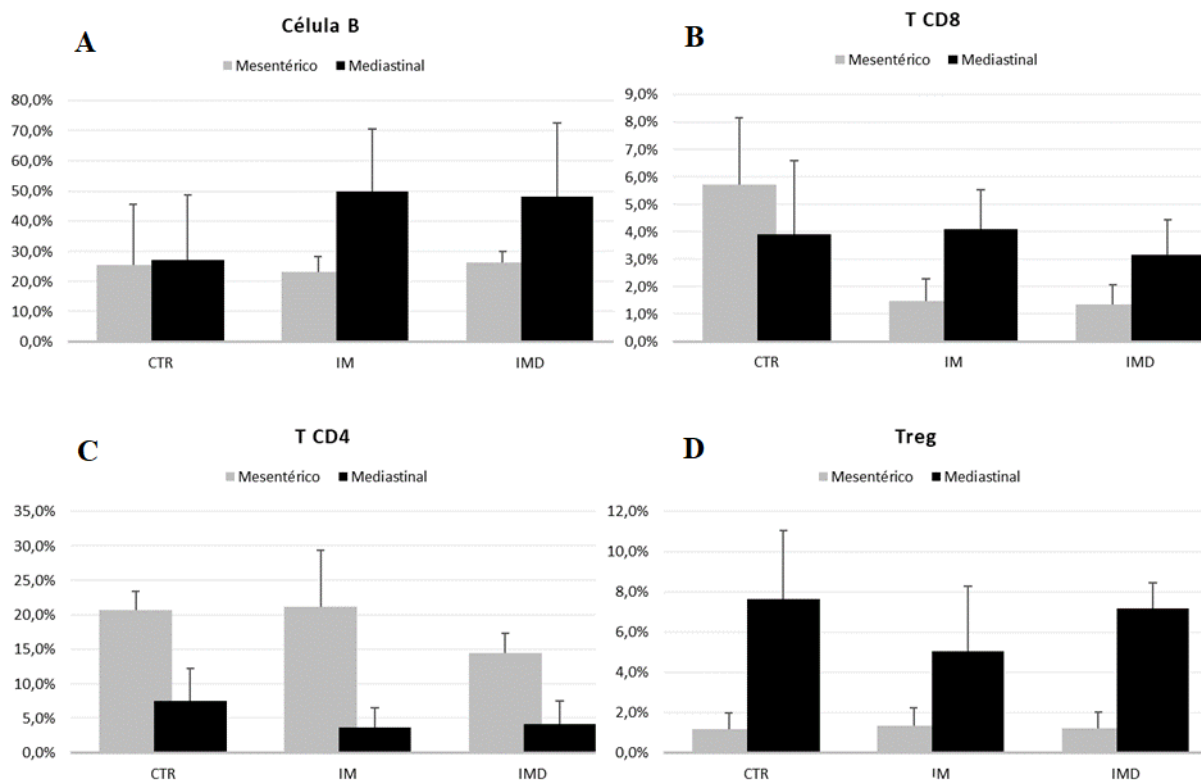


Figura 4 - Efeito do tratamento com DMSO nas células efectoras da Imunidade Adaptativa. Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais: Grupo Controle (CTR); Grupo Imunizado e não tratado com DMSO (IM) e Grupo Imunizado e tratado com DMSO (IMD); após realizado o protocolo para indução de asma experimental, os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de linfonodo mesentérico e linfonodo mediastinal para análise em citometria de fluxo, sendo os resultados obtidos representados nesta figura, onde as colunas representam as médias da porcentagem de células: A, células B (DC19+); B, células T CD8 (CD3+;CD8+); C, células T CD4; D, células Treg (Foxp3).

Em modelos animais de doenças alérgicas das vias aéreas, as Tregs podem suprimir a inflamação estabelecida das vias aéreas e a hiperresponsividade das vias aéreas. (ROBINSON, 2009). Estudos comprovam que, em pacientes asmáticos, as Treg são deficientes em número e qualidade. O uso de DMSO induz a diferenciação desse tipo de célula a partir de células T CD4 naive (LIN et al., 2019). Entretanto, tratando-se dos resultados expressos na Figura 4, observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos IM e IMD em relação a células da imunidade adaptativa: diferentemente do relatado pela literatura, o grupo tratado com DMSO não apresentou efeito imunomodulador no sentido de aumentar a porcentagem de Tregs; a porcentagem de célula B também não apresentou diferença estatística entre os grupos.

A redução da porcentagem células T CD4 e T CD8 era esperada, uma vez que o uso de DMSO diminui a proliferação de T CD4 e CD8 (COSTA et al., 2017). Entretanto, apesar de não ser observada diferença estatística entre os grupos IM e IMD, observa-se que, no linfonodo mesentérico, a relação CD4/CD8 do grupo IMD foi inferior se comparada ao grupo IM, conforme exposto na Tabela 1. Quando o pulmão é imunizado, aumenta-se a concentração de células T CD4, entretanto, com o uso do DMSO observou-se que houve redução da proliferação de T CD4 ativada.

Tabela 1 - Proporção células CD4/CD8 em Linfonodo Mesentérico e Mediastinal de cada grupo experimental.

<b>Grupo Experimental</b>	<b>Linfonodo Mesentérico</b>	<b>Linfonodo Mediastinal</b>
<b>CTR</b>	3:1	1:1
<b>IM</b>	13:1	1:1
<b>IMD</b>	10:1	1:1

Os camundongos foram divididos em três grupos experimentais: Grupo Controle (CTR); Grupo Imunizado e não tratado com DMSO (IM) e Grupo Imunizado e tratado com DMSO (IMD); após realizado o protocolo para indução de asma experimental, os animais foram eutanasiados e foram coletadas amostras de linfonodo mesentérico e linfonodo mediastinal para análise em citometria de fluxo. A análise da proporção entre células TCD4 e TCD8 em linfonodo mesentérico e linfonodo mediastinal são expressas nesta tabela, respectivamente.

Esta redução de células T CD4 ativadas, nos animais submetidos ao tratamento com DMSO, se faz importante no quadro asmático, uma vez que a célula CD4+ é um importante orquestrador da inflamação asmática das vias aéreas, enquanto eosinófilos, mastócitos, basófilos, e leucócitos B são importantes células efetoras (CAMPOS, 2007). Já em relação ao linfonodo mediastinal, não foi observada alteração da relação CD4/CD8, indicando que, devido a localização anatômica e função fisiológica deste, as células TCD4 migraram para o pulmão desses animais, visto que, na etapa de desafio experimental, o pulmão foi imunizado por 3 dias consecutivos.

#### **4. CONCLUSÃO**

O uso de doses terapêuticas de DMSO em camundongos induzidos ao quadro asmático não gerou alterações em eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, células B e Treg, indicando que o tratamento instituído com DMSO não promoveu efeitos imunomodulares no sentido de atenuar o padrão inflamatório expresso por estas células efetoras da imunidade inata e adaptativa; entretanto, houve uma diminuição proporcional de células TCD4 no linfonodo mesentérico, que é um dos linfonodos drenantes do local da imunização, indicando que o uso de doses terapêuticas de DMSO pode vir a amenizar o quadro asmático, uma vez que as células TCD4 são determinantes nos processos inflamatórios de hipersensibilidade imediata.

Em experimentos futuros, seria interessante repetir o experimento realizando a aplicação das doses terapêuticas de DMSO durante todo o protocolo de imunização, de forma a garantir maior período de tratamento. Outra forma de continuar a pesquisa nesta área seria fazer o tratamento com DMSO em diferentes grupos, com diferentes doses terapêuticas.

#### **5. AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao laboratório *Enterprise* por ceder espaço e equipamentos para a realização deste experimento e à pró-reitoria de pesquisa, pós-graduação e extensão da Universidade Vila Velha pelo incentivo à ciência e contribuição para com este trabalho experimental.

#### **6. COMITÊ DE ÉTICA**

Todos os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Vila Velha, número de protocolo/parecer: 626-2022.

## 7. REFERÊNCIAS

CAMPOS, H. S. Asma: suas origens, seus mecanismos inflamatórios e o papel do corticosteróide. **Revista Brasileira de Pneumologia Sanitária**, v. 15, n. 1, p. 47-60, 2007.

CAMPOS, L.E.M., PEREIRA, L.F.F.. Eosinofilia pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, p. 561-573, 2009.

COSTA, L., SANTOS, M.G., MEIRELES, A.B., ALMEIDA, V., PEREIRA, W., FREITAS, B., Eustaquio Alvim Brito-Melo, G. **Dimethyl sulfoxide (DMSO) decreases cell proliferation and TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-2 cytokines production in cultures of peripheral blood lymphocytes**. *Molecules* 22, 2017.

DOCKERY, D.W., POPE III, C.A., XU, X., SPENGLER, J.D., WARE, J.H., FAY, M.E., FERRIS, B.G., SPEIZER, F.E. **An Association between Air Pollution and Mortality in Six U.S. Cities**. *N. Engl. J. Med.* 329, 1753–1759. doi:10.1056/NEJM199312093292401, 1993.

ELISIA, I., NAKAMURA, H., LAM, V., HOFST, E., CEDERBERG, R., CAIT, J., HUGHES, M.R., LEE, L., JIA, W., ADOMAT, H.H., GUNS, E.S., MCNAGNY, K.M., SAMUDIO, I., KRYSTAL, G. **DMSO represses inflammatory cytokine production from human blood cells and reduces autoimmune arthritis**. *PLoS One* 11, e0152538, 2016.

FOROUZANFAR, M.H., AFSHIN, A., ALEXANDER, L.T. et al. **Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015**. *Lancet* 388, 1659–1724. doi:10.1016/S0140-6736(16)31679-8, 2016.

FULKERSON, P.C; ROTHENBERG, M.E; HOGAN, S.P. **Building a better 1. mouse model: experimental models of chronic asthma**. *Clin Exp Allergy*;35:1251-3, 2005.

GUALDI, L. P. et al. Modelos murinos para pesquisas em asma: uma análise crítica atualizada. **Scientia medica**, v. 20, n. 3, 2010.

GUEDERS, M.M. et al. Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. **Inflammation research**, v. 58, p. 845-854, 2009.

HAMRA, G.B., GUHA, N., COHEN, A. et al.. **Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: A systematic review and meta-analysis.** Environ. Health Perspect. 122, 906–911. doi:10.1289/ehp.1408092, 2014.

HUANG, S.; WU, C.; CHEN, S.; SYTWU, H.; LIN, G. Immunomodulatory effects and potential clinical applications of dimethyl sulfoxide. **Immunobiology**, volume 225, Issue 3, 2020.

HUANG, Y., WLODKOWIC, D. Unsuitable use of DMSO for assessing behavioral endpoints in aquatic model species. **Science of The Total Environment**, volume 615, p. 107-114, 2018.

IYANOVIC M., DINIC, S., MIHAILOVIC, M., GRIGOROV, I., BOGOJEVIC, D., POZNANOVIC, G. **Acute-phase protein expression in DMSO-intoxicated rats.** Toxicol. Lett. 147,153–159, 2004.

JANCAR, S.; SIQUEIRA, A.L.P.; RUSSO, M.; STEIL, A.A.; FACINCONE, S.; MARIANO, A. A new murine model of pulmonary eosinophilic hypersensitivity: contribution to experimental asthma. **Journal Allergy Clin. Immunol.**, v.100, p. 383-388, 1997.

LADEN, F., SCHWARTZ, J., SPEIZER, F.E., DOCKERY, D.W. **Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities Study.** Am. J. Respir. Crit. Care Med. 173, 667–672. doi:10.1164/rccm.200503-443OC, 2006.

LANDRIGAN, P.J. **Air pollution and health.** **Lancet Public Heal.** 2, e4–e5. doi:10.1016/S2468-2667(16)30023-8, 2017.

LANDRIGAN, P.J., FULLER, R., ACOSTA, N.J.R. et al. **The Lancet Commission on pollution and health.** Lancet 1–51. doi:10.1016/S0140-6736(17)32345-0, 2017.

LIN, G.J., SYTWU, H.K., YU, J.C., CHEN, Y.W., KUO, Y.L., YU, C.C., CHANG, H.M., CHAN, D.C., HUANG, S.H. **Dimethyl sulfoxide inhibits spontaneous diabetes and autoimmune recurrence in non-obese diabetic mice by inducing differentiation of regulatory T cells.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 282, 207–214; 2015.

LIN, G. et al. Adoptive transfer of DMSO-induced regulatory T cells exhibits a similar preventive effect compared to an in vivo DMSO treatment for chemical-induced experimental encapsulating peritoneal sclerosis in mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 378, p. 114641, 2019.

LOVELOCK, E. J; BISHOP, M. W. Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulfoxide. **Nature**. 183:1394-5, 1959.

MAES, T., PROVOOST, S., LANCKACKER, E.A., CATALDO, D.D., VANOIRBEEK, J.A.J., NEMERY, B., TOURNOY, K.G., JOOS, G.F. **Mouse models to unravel the role of inhaled pollutants on allergic sensitization and airway inflammation.** *Respir. Res.* 11, 7. doi:10.1186/1465-9921-11-7, 2010.

MARTIN, S., ALANIS, E., DELFOSSE, V., EVELSON, P., YAKISICH, J.S., SALDIVA, P.H., TASAT, D.R. **Low doses of urban air particles from Buenos Aires promote oxidative stress and apoptosis in mice lungs.** *Inhal. Toxicol.* 22, 1064-71. doi:10.3109/08958378.2010.523030, 2010.

MATIĆ, Svetlana Ivanović et al. Acute-phase protein expression in DMSO-intoxicated rats. **Toxicology letters**, v. 147, n. 2, p. 153-159, 2004.

NIALS, A.T, UDDIN, S. **Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge.** *Dis Model Mech*;1:213-20, 2008.

OGINO, K., ZHANG, R., TAKAHASHI, H. et al. **Allergic airway inflammation by nasal inoculation of particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) in NC/Nga mice.** *PLoS One* 9, 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0092710, 2014.

OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. **The Economic Consequences of Outdoor Air Pollution.** OECD Publishing, Paris. doi:10.1787/9789264257474-en, 2016.

ORLATO, D. **Efeitos do DMSO (dimetilsulfóxido), administrado por via intravenosa, sobre as funções renal e hepática, perfil hidrossalino e hemograma de cães saudáveis.** Tese de mestrado, 2006.

ÖZKAN, M.; ESKIOCAK, Y.C.; WINGENDEER, G. Macrophage and dendritic cell subset composition can distinguish endotypes in adjuvant-induced asthma mouse models. **Plos one**, v. 16, n. 6, p. e0250533, 2021.

PARKIN, J., SHEA, C., SANT, GR. **Dimetilsulfóxido intravesical (DMSO) para inter cistite sticial:** uma abordagem prática. *Urologia* 49, 105–107, 1997.

PETERS, A., POPE III, C.A. **Cardiopulmonary mortality and air pollution.** *Lancet* 360, 1184– 1185. doi:10.1016/S0140-6736(02)11289-X, 2002.

POPE III, C.A., DOCKERY, D.W. **Health effects of fine particulate air pollution:** Lines that connect. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 56, 709–742. doi:10.1080/10473289.2006.10464485, 2006.

RIBEIRO, M. F. **Asma Felina:** Qual o Paralelismo Clínico Com a Doença no Homem?. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa (Portugal), 2020.

RIVA, D.R., MAGALHÃES, C.B., LOPES, A.A. et al. **Low dose of fine particulate matter (PM2.5) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice.** *Inhal. Toxicol.* 23, 257–267. doi:10.3109/08958378.2011.566290, 2011.

ROBINSON, D.S. Regulatory T cells and asthma. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 9, p. 1314-1323, 2009.

SAD, E.P. **Caracterização molecular da resposta inflamatória da asma em equinos mantidos a pasto.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, p. 2, 2019.

SALIM, A.S. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, pp. 710-717, 1992.

SHEALY, C.N. The physiological substrate of pain. **Headache**, v.6, p.101-108, 1966.

SJOGREN, F., ANDERSON, C. **The spectrum of inflammatory cell response to dimethyl sulfoxide.** Contact Derm. 42, 216–221, 2000.

SOLER, R., BRUSCHINI, H., TRUZZI, J.C., MARTINS, J.R., CAMARA, N.O., ALVES, M.T., LEITE, K.R., NADER, H.B., SROUGI, M., ORTIZ, V. Urinary glycosaminoglycans excretion and the effect of dimethyl sulfoxide in an experimental model of non-bacterial cystitis. **Int. Braz. J Urol.**, v. 34, pp. 503-511, 2008.

SWANSTON, D.W., GLEADLE, R.I., COLGRAVE, H.F., MARRS, T.C. **Atividade de liberação de histamina cutânea de dimetilsulfóxido (DMSO) em porquinhos-da-índia.** Tóxico. Deixe 10, 87–90; 1982.

WANG, H., NAGHAVI, M., ALLEN, C. et al. **Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015.** Lancet 388, 1459–1544. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1, 2016.

YAMASAKI, T., KLEIN, G., LJUNGGREN, H.G., HOGLUND, P., OHLEN, C., PETERSSON, M.G., KARRE, K. **Effects of dimethyl sulfoxide treatment on H-2 expression and susceptibility to NK- or cytotoxic T-lymphocyte-mediated lysis of the YAC-1 lymphoma and its beta 2-microglobulin-deficient variant.** J. Natl. Cancer Inst. 80, 263–269, 1988.

YOSHIZAKI, K., BRITO, J.M., SILVA, L.F. et al. **The effects of particulate matter on inflammation of respiratory system: Differences between male and female.** Sci. Total Environ. 586, 284–295. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.221, 2017.

ZOZKY, G.R., SLY, P.D. **Animal models of asthma.** Clin Exp 5. Allergy; 37:973-88, 2007.



## ANEXO

### 8. ANEXO – INSTRUÇÕES AO AUTORES REVISTA CIÊNCIA RURAL

#### SCOPO:

1. **Ciência Rural (CR)** – A Revista Científica do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas relativas à área de Ciências Agrárias, que devem ser enviados com exclusividade.
2. Os **artigos científicos, revisões e notas** deverão ser enviados eletronicamente e editados **preferencialmente em inglês**. Aqueles enviados em português poderão ser traduzidos após a 1ª rodada de avaliação para que ainda possam ser revisados por consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Porém, **se não forem traduzidos nesta fase e forem aprovados** para publicação, terão que ser **traduzidos para o inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e deverão apresentar o certificado de tradução das mesmas para continuarem o processamento no CR.

#### Empresas credenciadas:

- American Journal Experts ( <http://www.journalexperts.com/> )
- Bioedit Scientific Editing ( <http://www.bioedit.co.uk/> )
- BioMed Proofreading ( <http://www.biomedproofreading.com> )
- Edanz ( <http://www.edanzediting.com> )
- Editage ( <http://www.editage.com.br/> )
- Editione ( <http://www.editione.com> )
- Enago ( <http://www.enago.com.br/forjournal/> )
- GlobalEdico ( <http://www.gloaledico.com/> )
- JournalPrep ( <http://www.journalprep.com> )
- Liberty Medical Communications ( <http://libertymedcom.com/> )
- Proofreading Copyediting Ireland ( <http://www.proofreading-copyediting-ireland.com/> )
- Proof-Reading-Service.com ( <http://www.proof-reading-service.com/pt/> )
- Quality Proofreading Services UK ( <https://londonproofreaders.co.uk/> )
- Readytopub ( <https://www.readytopub.com/home> )
- STTA ( <https://www.stta.com.br/> )
- Translation ( <https://traduciencia.com.br/site/> )

**LIMITE DE PÁGINAS:**

Todas as linhas devem ser numeradas e paginadas no canto inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com no máximo 25 linhas por página, espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita de 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O **número máximo** de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados no final do texto e individualmente por página, não podendo ultrapassar as margens ou ser apresentados no formato paisagem.

Considerando o formato de publicação eletrônica, consideraremos manuscritos com páginas adicionais além dos limites acima. Porém, trabalhos aprovados que possuam excesso de páginas incorrerão em custo adicional para publicação (ver taxa).

**ESTRUTURA:**

3. O artigo científico (Modelo .doc, .pdf) **deve conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstrato; Palavras-chave; Introdução com Revisão de Literatura; Material e métodos; Resultados e Discussão ou resultados/discussão (em conjunto); Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuições dos autores; Fontes de Aquisição; Relatório verbal; O Comitê de Ética e Biossegurança deve comparecer antes das referências. **Pesquisas envolvendo seres humanos e animais deverão apresentar parecer de aprovação de comitê de ética institucional no momento da submissão. Alternativamente, um dos modelos abaixo pode ser enviado (Modelo de declaração humano , Modelo de declaração animal).** A Ciência Rural aceita arquivos eletrônicos multimídia (animações, imagens, tabelas, filmes, áudio, etc.) e outros arquivos suplementares para serem publicados online juntamente com artigo, nota e revisão. Esse recurso pode acrescentar informações ao artigo do autor. Se deseja que o material suplementar seja considerado no manuscrito, os dados devem estar em um repositório permanente. No manuscrito inserir o título Material suplementar com o link para acesso aos dados. Sendo o autor totalmente responsável pela permanência das informações na base de dados.
4. A revisão bibliográfica (Modelo .doc, .pdf ) deve conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstrato; Palavras-chave; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuições dos autores; Fontes de Aquisição e Relatório Verbal; O Comitê de Ética e Biossegurança deve comparecer antes das referências. **Pesquisas envolvendo seres humanos e animais deverão apresentar parecer de aprovação de comitê de ética institucional no momento**

da **submissão. Alternativamente, um dos modelos abaixo pode ser enviado** (Modelo de declaração humano, Modelo de declaração animal). A Ciência Rural aceita arquivos eletrônicos multimídia (animações, imagens, tabelas, filmes, áudio, etc.) e outros arquivos suplementares para serem publicados online juntamente com artigo, nota e revisão. Esse recurso pode acrescentar informações ao artigo do autor. Se deseja que o material suplementar seja considerado no manuscrito, os dados devem estar em um repositório permanente. No manuscrito inserir o título Material suplementar com o link para acesso aos dados. Sendo o autor totalmente responsável pela permanência das informações na base de dados.

5. A nota (Modelo .doc, .pdf ) **deve conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstrato; Palavras-chave; Texto (sem subdivisão, mas com Introdução; Metodologia; Resultados e Discussão e Conclusão; pode conter tabelas ou figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuições dos autores; Fontes de Aquisição e Relatório Verbal; O Comitê de Ética e Biossegurança deve comparecer antes das referências. **Pesquisas envolvendo seres humanos e animais deverão apresentar parecer de aprovação de comitê de ética institucional no momento da submissão. Alternativamente, um dos modelos abaixo pode ser enviado** (Modelo de declaração humano, Modelo de declaração animal). A Ciência Rural aceita arquivos eletrônicos multimídia (animações, imagens, tabelas, filmes, áudio, etc.) e outros arquivos suplementares para serem publicados online juntamente com artigo, nota e revisão. Esse recurso pode acrescentar informações ao artigo do autor. Se deseja que o material suplementar seja considerado no manuscrito, os dados devem estar em um repositório permanente. No manuscrito inserir o título Material suplementar com o link para acesso aos dados. Sendo o autor totalmente responsável pela permanência das informações na base de dados.

#### **COVER LETTER:**

6. No preenchimento do campo “**cover letter**”, as seguintes informações deverão ser apresentadas em inglês, exceto para artigos submetidos em português (lembrando que os artigos deverão ser submetidos preferencialmente em inglês).
- a) What is the major scientific achievement of your study?
  - b) The question your research answers?
  - c) Your major experimental results and overall findings?
  - d) The most important conclusions that can be drawn from your research?

- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?
7. Nenhuma impressão será fornecida. Os artigos estão disponíveis em formato PDF no site da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr) .

### TÍTULOS:

8. Descrever o título em português e inglês (se o artigo for em português) – Inglês e português (se o artigo for em inglês). Apenas a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula, exceto no caso de nomes próprios. Evite abreviações e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser utilizado quando estritamente necessário. Devem aparecer nas palavras-chave, resumo e outras seções quando necessário.
9. As citações dos autores no texto devem ser feitas em letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Estes resultados estão de acordo com os relatados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como malformação congênita (MOULTON, 1978).
10. Este [link](#) fornece o estilo o arquivo de estilo para uso com o software **EndNote** (EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). O arquivo de estilo para uso com o software **Mendeley** também está disponível neste [link](#).

### REFERÊNCIAS:

11. As referências deverão ser feitas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) de acordo com as normas próprias da revista.

#### 11.1. Citação de livro:

JENNINGS, PB **The practice of large animal surgery** . Philadelphia: Saunders, 1985. 2v.  
TOKARNIA, CH et al. (More than two authors) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus: INPA, 1979. 95p.

#### 11.2. Citação de livro de autoria de:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, JB; SMITH, FROM **The thyroid** . Baltimore: Williams & Wilkins, 1964. Ch.2, p.32-48.

**11.3.** Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, WC The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3rd ed. New York: John Willey, 1977. Ch.4, p.72-90.

TURNER, AS; McILWRAITH, CW Fluid Therapy. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em grandes animais**. São Paulo: Roca, 1985. p.29-40.

**11.4.** Artigo

completo:

O autor deverá adicionar a url do artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research** , Amsterdam (City optional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)> . Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, AR et al (More than 2 authors). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural** , Santa Maria (City optional), v. 38, no. 8, p.2103-2108, nov. 2008 . Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, DA et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Countryside'. **Ciência Rural** , Santa Maria, v. 47, no. 3, e20150705, 2017 . Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso)>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dec-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Article published electronically).

**11.5.** Resumo:

RIZZARDI, MA; MILGIORANÇA, ME Evaluation of cultivars from the national sunflower trial, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: UFSM RESEARCH JOURNEY, 1., 1992, Santa Maria,

RS. **Annals...** Santa Maria: Dean of Postgraduate Studies and Research, 1992. V.1. 420p. p.236. (NOTE: try to avoid this type of citation).

#### 11.6. Tese e dissertação:

COSTA, JMB **Comparative study of some digestive characteristics between cattle (Charolais) and buffaloes (Jafarabad)** . 1986. 132f. Monograph/Dissertation/Thesis (Specialization/Master's/Doctorate in Animal Science) – Postgraduate Course in Animal Science, Federal University of Santa Maria. (NOTE: try to avoid this type of citation).

#### 11.7. Boletim:

ROGIK, FA **Lactose industry** . São Paulo: Department of Animal Production, 1942. 20p. (Technical Bulletin, 20). (NOTE: try to avoid this type of citation).

#### 11.8. Informação verbal:

Identified in the text itself immediately after the information, through the expression in parentheses. Example: ... are findings described by Vieira (1991 – Verbal report). At the end of the text, before the Bibliographic References, cite the author's full address (include E-mail), and/or place, event, date and type of presentation in which the information was issued.

#### 11.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, JM **Surgical conditions of the spine: analysis of the possibilities of surgical treatment** . São Paulo: Department of Surgery, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (NOTE: try to avoid this type of citation).

GRIFON, DM Arthroscopic diagnosis of elbow dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar. 18, 2005 (NOTE: try to avoid this type of citation).

UFRGS. **Transgenics** . Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 March. 2000. Specials. Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001 (NOTE: try to avoid this type of citation).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas** (Ireland), v.34,

n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtained via MEDLINE database. 1994-2000. Online. Available from: <<http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, NL Comparative analysis between two recovery techniques for non-infected corneal ulcers at the mid-stromal level. In: SEMINARIO LATINOAMERICAN DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes: Facultad de Ciencias Veterinarias – UNNE, 1997. Floppy disk. 1 31/2 floppy disk. For use on PC. (NOTE: try to avoid this type of citation).

### **DESENHOS, GRÁFICOS E FOTOGRAFIAS:**

12. Os desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não utiliza o nome pintura. As figuras deverão ser disponibilizadas individualmente por página. Desenhos, figuras e gráficos (com largura máxima de 16cm) deverão ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com no mínimo 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismos arábicos e não devem ultrapassar uma página.
13. Será obrigatório o cadastro de todos os autores nos metadados de submissão. O artigo não será processado até que este item seja atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia ao Comitê Editorial, outro método poderá ser utilizado.
14. Checklist (Checklist [.doc](#) [.pdf](#) ) .
15. Os artigos serão publicados por ordem de aprovação.
16. Os artigos não aprovados serão arquivados, porém será fornecida justificativa para a rejeição.
17. Em caso de dúvida, consulte artigos de números já publicados antes de entrar em contato com o Comitê Editorial.
18. Todos os artigos reencaminhados deverão pagar taxa de processamento (taxa de processamento). Artigos reenviados (com decisão de **Rejeitar e Reenviar**) deverão pagar novamente a taxa de processamento. Artigos arquivados por vencimento do prazo não terão devolução da taxa de processamento.
19. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio através do programa “Cross Check”.

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

### 21. Contribuição dos autores

Para se qualificar como autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados devem ter feito contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto para sua preparação. Use um dos exemplos abaixo ou faça o seu próprio.

#### Exemplo um

RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA realizaram os experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB supervisionou e coordenou os experimentos com animais e forneceu dados clínicos. O BB realizou análises estatísticas de dados experimentais. WC, MB e NO prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

#### Exemplo dois

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

#### Exemplo três

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

#### ORCID:

22. ORCID (Open Research and Contributors Identification) permite a criação de identificadores digitais únicos (ORCID ID) para pesquisadores, facilitando a identificação nacional e internacional de pesquisadores e sua produção. Portanto, **recomendamos** que todos os autores de cada submissão adotem o registro ORCID em suas publicações.

#### CIÊNCIA ABERTA:

23. A Ciência Rural vem se alinhando às práticas de comunicação da Ciência Aberta, em conformidade com o que é promovido pelo Programa SciELO. Portanto, a partir de 01/01/2022, os autores deverão fazer uso do Formulário de Conformidade de Ciência Aberta, que deverá ser submetido como arquivo suplementar a todo manuscrito submetido à Ciência Rural. A conformidade relatada pelos autores será verificada durante a revisão inicial dos manuscritos e posteriormente pelos editores e pareceristas. Informamos aos autores que os artigos publicados na edição v52n1 já conterão a identificação do editor-chefe e editor da área responsável pelo



processamento dos manuscritos no CR, conforme norteado pelas práticas da Ciência Aberta.

24. A Ciência Rural recomenda que todos os autores depositem preprints para acelerar a circulação dos dados dos artigos antes da revisão por pares. Se a pesquisa com preprint for aceita para publicação em CR, o preprint e o manuscrito publicado serão vinculados entre si na publicação online. Todos os autores devem vincular seu respectivo ORCID tanto à pré-impressão quanto ao manuscrito publicado. CR also recommends editors to consider the comments and information available in the preprint to support the editorial process and, when relevant, editors can incorporate the information into editorial decisions for authors.

CR recomenda totalmente repositórios de pré-print como [BioRxiv](#) , [AgriRxiv](#) e [SciELO Preprints](#) .

#### **OPEN ACCESS, COPYRIGHT E POLÍTICA DE AUTO-ARQUIVAMENTO:**

Todo o conteúdo da Ciência Rural (CR) e artigos publicados pela revista, salvo indicação em contrário, estão licenciados sob a licença Creative Commons Attribution.

Os autores de artigos publicados pela Ciência Rural (CR) mantêm os direitos autorais de seus trabalhos, licenciando-os sob a licença Creative Commons Attribution, que permite a reutilização e distribuição de artigos sem restrições, desde que o trabalho original seja corretamente citado.

A Ciência Rural (CR) incentiva os autores a autoarquivar seus manuscritos aceitos, publicando-os em blogs pessoais, repositórios institucionais e redes sociais acadêmicas, bem como publicando-os em suas redes sociais pessoais, desde que a citação completa esteja incluída na versão do site da revista.