

**MORGANA DUARTE DA SILVA**

**ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E FARMACOLÓGICOS COM A DIACEREÍNA  
NO MODELO DE MONOARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE  
FREUND (CFA) EM RATOS.**

Florianópolis

2009

**MORGANA DUARTE DA SILVA**

**ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E FARMACOLÓGICOS COM A DIACEREÍNA  
NO MODELO DE MONOARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE  
FREUND (CFA) EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos.

Florianópolis

2009

**MORGANA DUARTE DA SILVA**

**ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E FARMACOLÓGICOS COM A DIACEREÍNA  
NO MODELO DE MONOARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE  
FREUND (CFA) EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Florianópolis, de de .

---

Professor e orientador Nome do Professor, Título.  
UFSC

---

Prof. Nome do Professor, Título.  
UFSC

---

Prof. Nome do Professor, Título.  
UFSC

**A DOR É INEVITÁVEL.**  
**O SOFRIMENTO É OPCIONAL.**  
*(Carlos Drummond de Andrade)*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Danga e Dite, por me darem a herança mais preciosa que pode existir, a educação. Obrigada pelo exemplo de honestidade e simplicidade, por me ensinarem a respeitar as pessoas e por me darem tanto amor e carinho. Vocês “são” meu coração, amo muito os dois!

À minha irmã, Dada e ao Lu, meu CUnhadinho favorito, por me apoiarem, respeitarem minhas decisões e sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus tios e padrinhos, Totô, Tetê, Lelé e Lula, que de todas as formas contribuíram para minha formação.

Obrigada também a todos os meus primos e amigos, em especial ao Tuca, pela paciência, auxílio e companheirismo no fim dessa jornada. E à Gabi, meu moranguinho com leite condensado, por entender minha distância e nunca deixar de me apoiar.

Ao Professor Adair, por ser ora orientador, ora o “Pai Ada”, por ora brigar, ora compreender... mas por saber que ao seu lado no fim sempre da certo. Desculpa pelas indas e vindas, pelo receio, por às vezes (pra não dizer sempre) não ser aquilo que você esperava, mas saiba que me espelho no seu sucesso e dedicação. Me orgulho de ser sua aluna. Obrigada teacher!

Ao Chiquito por trabalhar comigo nessa pesquisa, fim de semana, feriado e afins, por me dar almoço na casa da sogra, pela amizade, companheirismo e por ser essa pessoa maravilhosa na minha vida.

À professora Elisa e ao Eduardo, pelo trabalho conjunto, sem férias ou praia. Obrigada! À Dani (cansou de ler!), Cris B., Leide, Fer e todos que colaboraram neste trabalho, sendo pelas dicas, correções ou por tratar os animais pra mim. Obrigada meninas!

Enfim à minha família no Laboratório, pessoas que conheci e que quero manter contato eternamente... Às Crises (Baggio-Mamy, Setim-parceira de academia), obrigada pelo exemplo profissional. “Mamy”, obrigada pela força oriental e pelas palavras de coração, você foi e é muito importante pra mim. Cris, obrigada pela alegria, amizade e companheirismo, espero que continue “ablando” comigo

porque eu te adoro. Às “bandidas”: Marinete, por ser minha irmãzinha do coração; Deh, por ser minha galega chata preferida e adorada; Dê, pelas valiosas dicas, amizade e risadas. À Taga (Dani), pela amizade sincera, apoio incondicional, auxílio e por aceitar minhas brincadeiras. Ao Ney e ao Francis, por mostrar que reclamação não leva à nada... Você é um amigo muito querido. Ao Rô, que salvou meu laptop da morte, obrigada pela ajuda e pela doçura. Ao casal de cientistas fisioterapeutas (Leide e Dani), pelo exemplo de trabalho e por me aturarem desde a faculdade. Ao Vini, meu primeiro “orientador”, por me ensinar o trabalho no lab e me iniciar nessa pesquisa. Ao Chico (e à Anja), já escrevi e se ele estiver lendo vai “se achar”. À Fer (minha co roqueira favorita), obrigada pelas discussões, idéias, ensinamentos e pelas idas ao JB. Ao Bira (e Nay) pela amizade, conselhos e pelas brigas. Amo TODOS vocês! À Moniquinha e a todos os lcs que sempre ajudam a galera. Aos que já saíram ou estão chegando: Gi (minha parceira “mor”, cada vez mais linda, inteligente, engraçada e competente, exemplo de força e dedicação. Adoro você minha amiga!), Vanessa (Emmel e Erthal), Ana, Patrícia, Gaúcho...!

À querida Dona Vilma, obrigada pelas festas, cafezinhos, prontidão, conversas e carinho. Obrigada também ao Seu TSC (Tio Seu Carlinhos), pelo carinho, doçura, disponibilidade constante para ajudar no que fosse necessário e pela alegria, apesar de torcer pelo “Havaí”. Ao Nivaldinho, pelo auxílio sem medida e compreensão imensa, um fofo!

Aos professores da Pós-graduação em Neurociências, pelos conhecimentos transmitidos.

A CAPES, CNPq, FAPESC e UFSC pelo suporte financeiro.

## RESUMO

A Osteoartrite (OA) é a forma mais prevalente de doença reumática, que acomete articulações como o joelho, tendo a dor como um dos sintomas mais frequentes entre os pacientes. Tradicionalmente, os fármacos utilizados para o tratamento da OA não reduzem os danos articulares, além de apresentarem diversos efeitos colaterais. Um fármaco estudado para este fim é a diacereína (DIA), ela proporciona efeitos anti-osteoartríticos e condroprotetores, inibe a atividade da IL-1 $\beta$  e a migração celular, além disso, estudos evidenciam que a DIA gera alívio da dor articular em indivíduos com OA. Todavia, seus efeitos ainda não foram bem estabelecidos. Portanto, pesquisas que relacionem o uso desse fármaco e suas implicações em modelos de OA são necessárias. Este trabalho visa estender e analisar a ação farmacológica da DIA no controle da OA utilizando um modelo de OA induzida pela injeção intra-articular (i.a.) de CFA (adjuvante completo de Freund) no joelho de ratos. O CFA induziu hipersensibilidade e inflamação por cerca de 20 dias, além de derrame articular e alterações na membrana sinovial e cartilagem, observados na histologia. Adicionalmente, a DIA (30 mg/kg, v.o., diariamente), inibiu de forma significativa a alodínia mecânica (inibição de  $58 \pm 10\%$  a  $87 \pm 3\%$ ) e térmica (inibição de  $66 \pm 12\%$  a  $87 \pm 8\%$ ) induzida pela injeção i.a. de CFA. Também reduziu o escore de dor espontânea, inibiu a nocicepção verificada pela porcentagem de vocalização ( $41 \pm 11\%$  a  $83 \pm 5\%$ ) e o edema articular em  $40 \pm 9\%$  a  $60 \pm 6\%$ . Além disso, a DIA reduziu as alterações histológicas induzidas pelo CFA após 3, 15 e 23 dias de tratamento. Desta forma, o presente trabalho estende os dados descritos na literatura e demonstra que a DIA (na dose de 30 mg/kg) é capaz de reduzir os danos articulares (derrame articular, alterações na membrana sinovial e cartilagem) e a nocicepção (alodínia mecânica e térmica e nocicepção espontânea) associados a OA induzida pelo CFA em ratos.

Palavras-chave: Monoartrite; Diacereína; Alodínia; Nocicepção.

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent form of rheumatic disease which affects joints like the knee, with pain as one of the most frequent symptoms among patients. Traditionally, drugs used for treatment of OA do not reduce joint damage, and have several side effects. A drug studied for this purpose is diacerein (DIA), which provides anti-osteoarthritic and chondroprotective effects and inhibits the activity of IL-1 $\beta$  and cell migration. Additionally, studies show that DIA promotes joint pain relief in individuals with OA. Nevertheless, its effects have not been well established; therefore, studies which investigate the use of this drug and its implications in models of OA are necessary. This study aims to examine the pharmacological effect of DIA in the control of OA using a model of OA induced by intra-articular injection (i.a.) of CFA (complete Freund's adjuvant) in the rat knee. CFA induced hypersensitivity and inflammation for about 20 days, as well as joint effusion and changes in synovial membrane and cartilage, observed on histology (histological evaluations). Moreover, DIA (30 mg/ kg, orally, daily), significantly inhibited mechanical ( $58 \pm 10\%$  /  $87 \pm 3\%$ ) and thermal ( $66 \pm 12\%$  /  $87 \pm 8\%$ ) allodynia induced by injection of CFA, inhibited nociception in  $83 \pm 5$  to  $41 \pm 11\%$ , verified by the percentage of vocalization, in addition to reducing the score for spontaneous pain and joint swelling in  $60 \pm 6$  to  $40 \pm 9\%$ . Furthermore, DIA reduced the histological changes induced by CFA after 3, 15 and 23 days of treatment. In short, this study extends the data described in the literature and shows that DIA (in the dose of 30 mg/kg) reduces the joint damage (joint effusion, changes in cartilage and synovial membrane) and nociception (mechanical and thermal allodynia and spontaneous nociception) associated with OA induced by CFA in rats.

Keywords: Osteoarthritis; Diacerein; Allodynia; Nociception.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Articulação do joelho no plano parasagital.....	13
Figura 2 Articulações de ratos mostrando a camada de células composta por matriz cartilaginosa.....	29
Figura 3 Cortes, sagital, transverso e axial da articulação do joelho de ratos.....	29
Figura 4 Avaliação do efeito antialodínico (alodínia mecânica) da diacereína.....	44
Figura 5 Avaliação do efeito da diacereína no membro contralateral.....	45
Figura 6 Avaliação do efeito antialodínico (alodínia térmica) da diacereína.....	46
Figura 7 Avaliação do efeito antinociceptivo da diacereína (vocalização).....	47
Figura 8 Avaliação do efeito antinociceptivo da diacereína (dor espontânea).....	48
Figura 9 Avaliação do efeito antiedematogênico da diacereína.....	49
Figura 10 Avaliação histológica de animais que receberam injeção de salina i.a.....	50
Figura 11 Avaliação histológica de animais que receberam injeção de CFA i.a.....	50
Figura 12 Avaliação histológica de animais que receberam injeção de CFA i.a e tratamentos com salina ou diacereína via oral.....	52

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
1.1	ESTRUTURA E FUNÇÃO ARTICULAR.....	11
1.2	DOENÇAS ARTICULARES.....	13
1.2.1	Osteoartrite .....	15
1.2.1.1	Epidemiologia e fatores de risco .....	16
1.2.1.2	Cartilagem articular e alterações na OA.....	17
1.2.1.3	Características da OA.....	21
1.3	DOR.....	21
1.3.1	Dor na OA.....	24
1.4	OA DE JOELHO .....	25
1.4.1	Modelo de OA de joelho.....	26
1.5	TRATAMENTOS DA OA.....	29
1.5.1	Tratamento com diacereína na OA .....	32
2	OBJETIVOS .....	34
2.1	OBJETIVO GERAL.....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3	MATERIAS E MÉTODOS .....	35
3.1	ANIMAIS .....	35
3.2	REAGENTES .....	35
3.3	INJEÇÃO INTRA-ARTICULAR DE ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA).....	36
3.3.1	Avaliação da alodínia mecânica.....	36
3.3.2	Medida de alodinia térmica (estímulo frio) .....	37
3.3.3	Avaliação do comportamento nociceptivo pela vocalização.....	38
3.3.4	Quantificação da dor espontânea .....	39
3.3.5	Avaliação edematogênica .....	39
3.3.6	Avaliação histológica.....	40
3.3.6.1	Preparação das amostras.....	40
3.3.6.2	Técnicas histomorfológicas .....	41
3.3.6.3	Tratamento das imagens.....	41
3.3.7	Análise estatística.....	41
4	RESULTADOS .....	42
4.1	AVALIAÇÃO DA ALODÍNIA MECÂNICA.....	42
4.2	MEDIDA DE ALODÍNIA TÉRMICA (ESTÍMULO FRIO).....	44
4.3	AVALIAÇÃO DA NOCICEPÇÃO PELA VOCALIZAÇÃO.....	45
4.4	QUANTIFICAÇÃO DA DOR ESPONTÂNEA .....	46
4.5	AVALIAÇÃO EDEMATOGÊNICA.....	47
4.6	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA .....	48
5	DISCUSSÃO .....	52
6	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Estrutura e função articular

As articulações são regiões de união entre quaisquer das partes rígidas (ossos ou cartilagens), formando estruturas distintas, classificadas estruturalmente conforme o tipo de material que une os ossos articulados (MAO, 2005).

Existem três tipos de articulações: fibrosas, cartilagueas e sinoviais. As articulações fibrosas são formadas por tecido fibroso. Fazem parte dessas articulações as suturas cranianas, a gonfose (entre os alvéolos da maxila ou mandíbula e os dentes) e as sindesmoses. As articulações cartilagueas são unidas por cartilagem ou por uma combinação de cartilagem e tecido fibroso. Estas articulações incluem as sínfises (púbica e dos corpos vertebrais) e as sincondroses. (FILHO et al., 1994; MAO, 2005).

As articulações sinoviais são do tipo mais comum. Proporcionam movimento livre entre os ossos que unem e caracterizam quase todas as articulações dos membros. Estas articulações são denominadas sinoviais porque contém uma substância lubrificante chamada líquido sinovial que é produzido pela membrana sinovial. São características distintas da articulação sinovial a presença de cavidade articular, extremidades ósseas revestidas por cartilagem articular e estarem envolvidas por cápsula fibrosa revestida internamente por membrana sinovial. A camada interna, ou membrana sinovial, é pregueada e reveste toda a cavidade, exceto a cartilagem das superfícies articulares. Ela é constituída por tecido fibroadiposo frouxo e vascularizado revestido por células ora plano ou pavimentadas, ora cúbicas, sem estruturas juncionais, que se localizam entre as fibras colágenas e formam às vezes, vilosidades com capilares sanguíneos. Além disso, são encontrados a partir das pregas internas da membrana sinovial, os sacos pediculados os quais são denominados bursas (FILHO et al., 1994).

Estas articulações também podem ser reforçadas por ligamentos formados por tecido conjuntivo denso modelado e que normalmente tem como

funções unir um osso ao outro, dar estabilidade ao corpo e impossibilitar movimentos indesejados.

Estes ligamentos podem ser capsulares, intracapsulares ou extracapsulares. Quando as superfícies dos ossos são incongruentes, algumas articulações sinoviais apresentam meniscos ou discos articulares fibrocartilaginosos. Um disco ou menisco está presente diretamente entre os côndilos. Assim, um côndilo é definitivamente constituído por dois diferentes tecidos: cartilagem articular e osso subcondral (MAO, 2005).

Em uma típica articulação sinovial, os ossos articulares encontram seus respectivos côndilos, cada um deles constituído por cartilagem articular que está ancorada ao osso subcondral (Figura 1) (MAO, 2005).

Através da microscopia eletrônica, podem ser identificados alguns tipos celulares ou sinoviócitos: a) célula A ou M, semelhante ao macrófago, sendo a mais freqüente, possuindo enzimas lisossômicas e apresenta intensa atividade fagocítica e b) célula B ou F, que se assemelha ao fibroblasto, tem retículo endoplasmático rugoso abundante e sintetiza ácido hialurônico (FILHO et al., 1994).

A cartilagem articular é avascular, resistente, e não mineralizada (GRODZINSKY et al., 2000; GUILAK; MOW, 2000; CHAO; INOUE, 2003; WONG ; CARTER, 2003). Ela é adaptada para suportar e absorver grandes choques e tensões e mostra condrócitos em disposição zonal organizada em uma matriz composta de 68 a 85% de seu peso em água, que é responsável pela elasticidade do tecido cartilaginoso (FILHO et al., 1994). Diferentemente, o osso subcondral é vascular, rígido e mineralizado (ZYSSET et al., 1999; BURR, 2004). No entanto, a cartilagem articular e o osso subcondral trabalham juntos harmoniosamente para executar algumas das mais diversificadas funções entre os mamíferos terrestres: locomoção e mastigação, os quais geralmente são atividades motoras específicas (MAO, 2005).

Preenchendo a cavidade articular, há líquido sinovial, incolor e viscoso, formado de transudato e ácido hialurônico, que promove a lubrificação e facilita o deslizamento das superfícies articulares (FILHO et al., 1994).

A articulação do joelho é uma articulação sinovial típica, pois apresenta basicamente todos os componentes que podem ser encontrados nesse tipo de articulação (Figura 1).

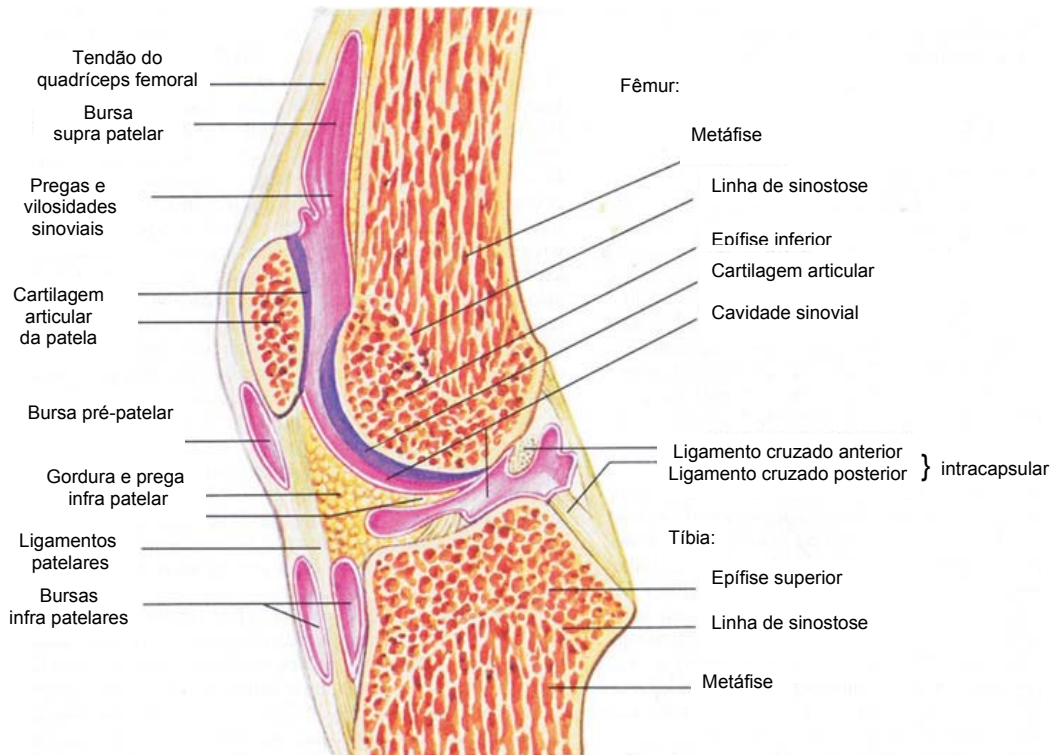


Figura 1 – Articulação do joelho no plano parasagital. Mostrando o côndilo femoral distal e proximal formando, com o côndilo tibial, uma articulação do tipo sinovial (joelho). Os ligamentos cruzados (anterior e posterior) são ambos intracapsulares. A cavidade articular contém líquido sinovial. Adaptada de Mao (2005).

## 1.2 Doenças Articulares

As doenças articulares são muito freqüentes e constituem uma das principais causas de incapacidade física temporária ou permanente. Elas englobam um grande número de doenças que apresentam similarmente comprometimento do sistema musculoesquelético, ou seja, ossos, cartilagem, estruturas peri-articulares (localizadas próximas às articulações, como tendões, ligamentos e fâscias) e/ou de músculos. São altamente prevalentes e afetam aproximadamente 3 a 8% da população mundial e representam a terceira causa de todas as consultas médicas, provocando maior incapacitação que doenças cardíacas e o câncer. Cerca de um quarto da população adulta sofre de algum problema relacionado às estruturas musculoesqueléticas, que resulta em importante impacto médico, social e

econômico. Isto deve-se a significativa frequência na população, afastamento do trabalho e gasto do dinheiro público (FILHO et al., 1994).

As doenças reumáticas representam grande desafio para o tirocínio clínico, devido à cronicidade, variabilidade, tendência a exacerbar e regredir, complexidade bioquímica e imunológica, patogenia desconhecida, resposta variável aos tratamentos específicos e inúmeros outros efeitos sobre o estilo de vida dos pacientes. As relações familiares, a auto-imagem e a capacidade de obter emprego se combinam para complicar a equação terapêutica (WYNGAARDEN; SMITH; BENNETT, 1993).

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), as condições reumáticas ou musculoesqueléticas compreendem mais de 150 doenças e síndromes que são frequentemente progressivas e associadas à dor. A maioria das doenças reumáticas é provocada por microrganismos (ex. *Staphylococcus aureus* e *Staphylooccus epidermis*) e podem, de maneira geral, ser classificadas como doenças articulares ou artropatias, incapacidade física, alterações espinhais e condições resultantes de traumas. Alterações nas condições musculoesqueléticas são as causas mais importantes da morbidade e incapacidade, ocasionando enormes gastos com a saúde e perda do trabalho. Dentre as condições com maior impacto na sociedade incluem-se a artrite reumatóide, as osteoartrites, as espondiloartropatias (espondilite anquilosante, artrite reativa, etc.), a osteoporose, as alterações espinhais e o trauma severo de membros (TILL; SNAITH, 1999; Relatório da OMS: O impacto das doenças musculoesqueléticas no início do novo milênio, 2003).

A Osteoartrite é a principal causa de deficiência crônica em articulações sinoviais, afetando cerca de 70 milhões de pessoas nos Estados Unidos (KRAUS, 1997; LAWRENCE et al., 1998). O custo do tratamento da artrite e condições afins dos Estados Unidos da América é superior a 65 bilhões de dólares por ano (MAO, 2005).

### 1.2.1 Osteoartrite

Osteoartrite (OA) é a forma mais prevalente de doença reumática, é a doença articular mais comum em todo o mundo e em alguns países torna-se problema de saúde pública. Em populações ocidentais, evidências radiológicas de OA estão presentes na maioria das pessoas de 65 anos de idade e em 80% das pessoas com mais de 75 anos, sendo a causa mais frequente de morbidade e de incapacidade em pacientes idosos. Em países como os Estados Unidos da América, esta doença constitui a segunda causa de incapacidade ocupacional em homens com mais de 50 anos, sendo superada apenas pela isquemia cardíaca. Ela corresponde a um número de ocupação hospitalar maior que o da artrite reumatóide. (LOHMANDER, 2000; FRONTERA; DAWSON; SLOVIK, 2001; HINTON et al., 2002; DENNISON ; COPER, 2003; TORRES ; CICONELLI, 2005).

A OA é definida pelo American College of Rheumatology como sendo “um grupo heterogêneo de condições que produzem sinais e sintomas articulares associados à integridade da cartilagem articular, somados as alterações nas margens do osso subcondral” (ALTMAN et al., 1986).

Recentemente, considera-se que a articulação inteira é afetada na OA, bem como ligamentos, membrana sinovial e músculos periarticulares (KEUTTNER; GOLDBERG, 1995). Creamer e Hochberg (1997) sugerem o termo doença osteoartrítica, pelo fato dos fatores de risco, fisiopatologia e características clínicas variarem nos pacientes, assim como nas articulações afetadas.

Esta doença reumática é caracterizada pela perda progressiva de cartilagem articular, dor (GUZMAN et al., 2003), alterações no osso subcondral e proliferação e formação de osteófitos (KOBAYASHI et al., 2003; MORENKO et al., 2004).

A degeneração da cartilagem articular é a alteração mais característica e importante da OA. O aparecimento de fissuras verticais (fibrilação) da matriz, ulcerações e exposição do osso subcondral são os principais fenômenos ocorridos na degeneração da cartilagem, associados à hipertrofia óssea, com formação de osteófitos. Em estágios clínicos da doença, são observadas alterações na

membrana sinovial, normalmente em conjunto com reações inflamatórias (PELLETIER, 2003).

Esta doença reumática degenerativa acomete articulações sinoviais, entre elas o joelho, estando associada à dor, rigidez articular, deformidade e progressiva perda de função, o que afeta o indivíduo em dimensões orgânicas, funcionais, emocionais e sociais (PETERSSON; JACOBSSON, 2002; DIAS; DIAS; RAMOS, 2003; DE FILIPPIS et al., 2004; BUCKWALTER; SALTZMAN; BROWN, 2004).

A OA pode ser classificada em primária (idiopática) e secundária (associada a condição conhecida), sendo que alguns fatores são reconhecidos como prováveis causas da OA secundária, como alterações metabólicas e anatômicas, trauma em ligamentos cruzados ou meniscos, cirurgias articulares ou artropatia inflamatória prévia (artrite reumatóide) (MANKIN; BRANDT; SHUMAN, 1986; DENNISSON; COOPER, 2003).

#### 1.2.1.1 Epidemiologia e fatores de risco

A incidência de osteoartrite aumenta com a idade. Homens e mulheres são igualmente afetados pela doença, no entanto, os sintomas ocorrem precocemente e com maior severidade nas mulheres. Antes dos 50 anos, a prevalência é maior no sexo masculino, como resultado de traumas sofridos com a prática esportiva ou ocupacional. Porém, após os 50 anos, as mulheres são mais frequentemente acometidas, principalmente nas articulações das mãos e joelhos. (HINTON et al., 2002).

Dentre os principais fatores de risco pode-se destacar: idade acima de 50 anos, alta densidade mineral óssea, história de imobilização, instabilidade ou hipermobilidade articular, neuropatia periférica (HINTON et al., 2002), sexo feminino, índice de massa corporal elevado, hereditariedade e fatores mecânicos como traumas, atividade física pesada e sobrecarga no trabalho (FELSON, 2000).

A OA, no Brasil, ocupa o terceiro lugar na lista dos segurados da Previdência Social que recebem auxílio-doença, ou seja, 65% das causas de



incapacidade estando atrás somente das doenças cardiovasculares e mentais (MARQUES; KONDO, 1998).

Com os avanços da biologia molecular, alguns defeitos genéticos e suas implicações fenotípicas, estão sendo estudados e mutações do gene do colágeno tipo II (COL2 A1) é um dos exemplos de defeitos genéticos que podem estar associados em algumas famílias de indivíduos que manifestaram prematuramente a doença osteoartrítica (RADOMINSKI, 1998). Assim, a história familiar pode ser considerada fator de risco, porém, esse defeito genético não é encontrado amplamente em outros portadores de osteoartrite (SPECTOR; CICUTTINI; BAKER, 1996).

#### 1.2.1.2 Cartilagem articular e alterações na OA

A cartilagem articular é essencial para o movimento normal das articulações, tendo em sua composição, condrócitos imersos em matriz extracelular, que são responsáveis pela biossíntese, homeostase e catabolismo da mesma. A rede de colágeno perfaz 50 a 60% do peso seco da cartilagem articular (HEINEGARD; OLDBERG, 1989).

Na camada superficial da cartilagem, as fibras colágenas e condrócitos estão dispostas paralelamente à superfície, enquanto nas camadas mais profundas, as fibras colágenas se dispõem de modo randômico, e sustentam unidades verticais contendo condrócitos dispostos em filas. Nas camadas basais da cartilagem, as fibras colágenas estão verticalizadas se inserindo na superfície do osso subcondral (WOLLHEIM, 2003).

A cartilagem articular adulta é um tecido aneural constituído de condrócitos que representam 2% do tecido cartilaginoso dispersos em abundante matriz extracelular com 65-80% de água e 20 a 35% de sólidos. O conteúdo de água é criticamente balanceado pelo conteúdo de colágeno e cadeias de proteoglicanos negativamente carregados permitindo um equilíbrio osmótico ativo. O conteúdo de água retido nas malhas de proteoglicanos confere resistência à compressão tecidual (WOLLHEIM, 2003).

A matriz cartilaginosa é o maior componente da cartilagem articular. Nela moléculas de colágeno tipo II se reúnem para formar fibras colágenas, que são estáveis e têm longa vida. A meia vida estimada da fibra colágena é de 100 anos enquanto a do agrecan é de 5 anos (MAROUDAS; PALLA; GILAV, 1992; MAROUDAS et al, 1998). No entanto, até hoje não se conhecem adequadamente os fatores que orientam a reunião das moléculas de colágeno em fibrilas que resultam nas suas dimensões específicas. De fato, existem mais de quarenta proteínas não colágenas da matriz, porém a principal delas e maior é o agrecan (DOEGE et al, 1991).

Leves mudanças no conteúdo e qualidade dos componentes orgânicos da matriz extracelular da cartilagem afetam seu conteúdo de água e conseqüentemente sua função. Os condrócitos se nutrem da matriz e são responsáveis pela fabricação e degradação de seus componentes, eles produzem o colágeno tipo II, que é o componente mais importante e mais abundante da fibra colágena, mas também produzem colágenos tipo XI e IX. Há uma compartimentalização da matriz onde se pode observar composições diversas de elementos. A matriz justaposta ao condrócito, pericelular, e a que vem em seguida, territorial, são as regiões metabolicamente ativas. A matriz interterritorial é inerte e inclui 90% da matriz adulta (BRANDT; DOHERTY; LOHMANDER, 2003).

O colágeno tipo X é produzido nas zonas de cartilagem de crescimento e na zona de transição cartilagem-osso, ele é sintetizado por condrócito hipertrófico restrito à periferia da cartilagem calcificada cobrindo o osso subcondral. O colágeno tipo VI é encontrado na cartilagem adulta, não existindo na embrionária. Estes colágenos são particularmente abundantes na osteoartrite. Outros colágenos podem ser vistos em menores quantidades, como os colágenos III, VII e XIV. O tipo III é visto somente na cartilagem osteoartrítica (BRANDT; DOHERTY; LOHMANDER, 2003).

As alterações da estrutura da cartilagem que ocorrem na osteoartrite foram bem descritas como: (1) aumento da hidratação da cartilagem; (2) diminuição da concentração de proteoglicanos e concentração de colágeno; (3) aumento da proliferação de condrócitos, da atividade metabólica e da espessura de osso subcondral (LOESER, 2000).

A cartilagem de um indivíduo com OA é capaz de produzir mediadores inflamatórios, particularmente a IL-1 (interleucina 1), o TNF- $\alpha$  (fator de necrose

tumoral  $\alpha$ ), a PGE2 (prostaglandina 2) as metaloproteinases de matriz 1,3,7,9,10 e 13. Estes mediadores mantêm-se ativados por mecanismos autócrino e parácrino, alterando o metabolismo da matriz cartilaginosa favorecendo sua destruição (ATTUR et al., 2003).

Esta também é capaz de produzir NO (óxido nítrico), que inibe a polimerização da actina que afeta a adesão celular e a fagocitose, inibe a síntese da matriz e promove a apoptose de condrócitos (KOBAYASHI et al., 2001).

Diversos fatores estão implicados na regulação da síntese e degradação da cartilagem, no entanto, a orquestração de atividades supressoras e estimuladoras pelas citocinas no condrócito não está completamente esclarecida (WOLLHEIM, 2003).

A depleção da agrecana é evento precoce na osteoartrite. Assim, o entendimento de como esta degradação acontece é essencial para o desenvolvimento de drogas adequadas para prevenir a evolução da osteoartrite. Três enzimas (metaloproteinases) são capazes de degradar o agrecan: ADAMTS 1, ADAMTS 4 e ADAMTS 5, sendo que a inativação da ADAMTS 1 não protege o animal da artrite experimental e a ausência de ADAMTS 4 em ratos parece não ter efeito protetor contra a osteoartrite. No entanto, a ADAMTS 5, pode ser a principal agrecanase em modelo animal (KARSENTY, 2005).

A colagenase 3 ou metaloproteinase 13 pode degradar o agrecan entre os domínios G1 e G2. Atualmente conhecem-se colagenases (MMP1, 8, 13), gelatinases (MMP 2, 9), estromelisinases (MMP3, 10, 11) além de 6 tipos conhecidos de metaloproteinases tipo membrana. Estas enzimas existem em formas inativas e precisam de várias etapas e estímulos para sua ativação (GROSS; LAPIERE, 1962; MENGSHOL; MIX; BRINCKERHOFF, 2002).

Além da cartilagem, a membrana sinovial na OA também apresenta alterações. Dentre essas alterações pode-se destacar espessamento sinovial, aumento da vascularização e infiltração celular inflamatória nas membranas sinoviais em todos os graus de OA, até mesmo com identificação de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . A sinovite, à similaridade do que ocorre na artrite reumatóide, está presente e provoca produção de interleucinas, todavia, é discreta e episódica (SMITH et al., 1997).

### 1.2.1.3 Características gerais da OA

As articulações mais afetadas e que apresentam mais sintomas são as articulações apofisárias da coluna, interfalangeanas distal e proximal, carpometacarpiana, primeira articulação metatarsfalangeana e as articulações do joelho, quadril e patelofemoral (FRONTERA; DAWSON; SLOVIK, 2001).

Os pacientes com envolvimento precoce apresentam rigidez articular, tendo destruição progressiva da cartilagem, crepitação (ruído sobre áreas ósseas e articulares lesadas) e dor quando sobrecarregam a articulação afetada. Ainda ocorrem contraturas secundárias em torno da articulação envolvida e das articulações contíguas. A dor é um sintoma prevalente e relaciona-se ao comprometimento (inflamação) dos tecidos adjacentes como, cápsula articular, ligamentos, membrana sinovial e osso subcondral. Geralmente piora com o passar do dia, essencialmente nas articulações que sustentam peso. A amplitude de movimento e a força muscular sofrem importante diminuição, o que interfere de maneira significativa nas atividades de vida diária. Rigidez matinal também é uma queixa freqüente dos pacientes, que embora seja breve, pode ser incapacitante em alguns casos, assim como a rigidez pós-inatividade (MARQUES; KONDO, 1998).

Sintomas como dor articular, sensibilidade, limitação de movimento, crepitação, efusão ocasional, e variáveis graus de inflamação local (sem efeitos sistêmicos) também são característicos da doença. Patologicamente, ela é caracterizada por perda de cartilagem irregularmente distribuída, mais freqüente em áreas de sobrecarga, esclerose de osso subcondral, cistos subcondrais, osteófitos marginais, aumento do fluxo sanguíneo metafisário, e variável inflamação sinovial. Histologicamente, a OA é caracterizada precocemente por fragmentação da superfície cartilaginosa, proliferação de condrócitos, fendas verticais na cartilagem, variável deposição de cristais, remodelação, e ocasional violação da linha limítrofe entre cartilagem e osso subcondral por vasos sanguíneos. Existe também uma tentativa de reparo, particularmente com a formação de osteófitos, e mais tarde pela perda total de cartilagem, esclerose e osteonecrose focal do osso subcondral. Biomecanicamente, a doença é caracterizada por alteração das propriedades compressiva e tênsil e redução da permeabilidade hidráulica da cartilagem com

aumento de água e edema excessivo, onde estas alterações cartilagíneas são acompanhadas por aumento da rigidez do osso subcondral. Bioquimicamente, a doença é caracterizada por redução na concentração de proteoglicanos, possíveis modificações no tamanho e agregação de proteoglicanos, alteração no tamanho e conformação da fibrila colágena, e aumento da síntese e degradação de macromoléculas da matriz (BRANDT, 1989).

A incapacidade funcional na OA é um processo complicado que envolve a interação de diversos fatores, dentre eles, a gravidade da doença, doenças associadas como depressão, doenças cardíacas e pulmonares, fatores sociais e ambientais (ETTINGER; AFABLE, 1994), nível de dor, obesidade e diminuição da força muscular do membro inferior (CREAMER; LETHBRIDGE-CEJKU; HOCHBERG, 2000). As características radiográficas convencionalmente utilizadas para definir OA incluem estreitamento do espaço articular, formação de osteófitos, esclerose subcondral, cistos subcondrais e anormalidades no contorno ósseo, porém cerca de metade dos pacientes com estas alterações não apresentam sintomas (HOCHBERG et al., 1989). Quando sintomática a queixa mais comum dos pacientes é a dor, sendo esta a principal causa de consulta médica (BRANDT, 1989). É difícil localizar a dor em uma área restrita da articulação, além disso, pacientes com OA nos joelhos relatam dor em toda a articulação (CREAMER; LETHBRIDGE-CEJKU; HOCHBERG, 1998).

### 1.3 Dor

Dentre os vários mecanismos de controle da homeostasia do organismo, a dor exerce uma função importante, pois seu papel fisiológico é alertar sobre as possíveis ameaças ao bem estar e a integridade do organismo, e reter nossa atenção até que a causa de sua ativação tenha sido identificada e afastada (CHAPMAN; GAVRIN, 1999; WALL, 1999). A dor é um sinal importante para a detecção e avaliação de inúmeras doenças, bem como para induzir um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limitação de danos (MILLAN, 1999; WOOLF, 2000; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK et al., 2004). A Associação

Internacional para o Estudo da Dor a define como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER; MELZACK, 1999). Pode-se então relacionar um componente fisiológico e outro psicológico ou emocional, e a junção de ambos são o que os humanos entendem como sendo dor. Portanto, em animais avalia-se a dor de forma indireta, sendo que não há aparatos que permitam mensurar algum componente emocional advindo deles. Avalia-se somente o componente fisiológico, ao qual se denomina nocicepção (TJØLSEN; HOLE, 1997). A dor reflete a ativação de receptores sensoriais denominados nociceptores, os quais são sensibilizados quando o estímulo é potencialmente danoso, ou seja, excedem uma determinada faixa que é a considerada fisiológica ou estímulo inócuo (BURGESS; PER, 1967; MILLAN, 1999).

Sherrington, a mais de um século atrás, propôs a existência do nociceptor, que seria um neurônio sensorial primário ativado por estímulos capazes de gerar dano tecidual. Os nociceptores têm limiares característicos que os distinguem de outras fibras nervosas sensoriais, pois estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras e são sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Ainda existem os nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que compreendem uma pequena proporção das fibras aferentes. Eles normalmente não são responsivos a estímulos. Contudo, quando sofrem influência de mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, podem apresentar atividade espontânea ou tornar-se sensibilizados e responderem a estímulos sensoriais (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os nociceptores podem ser sensibilizados pela mudança de temperatura, ou seja, estímulo nocivo térmico, diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), os quais induzem a liberação local de mediadores químicos como bradicinina, prótons, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, adenosina, citocinas, aminoácidos excitatórios, SP (substância P), NO, opióides e acetilcolina, entre outros (JULIUS; BASBAUM, 2001; GRIFFIS; COMPTON; DOERING, 2006). Estes mediadores interagem com receptores específicos e levam à propagação do sinal nociceptivo graças ao aumento na permeabilidade da membrana neuronal a cátions e conseqüente geração do potencial de ação (CARLTON; ZHOU; COGGESHALL, 1998; PASERO; PAICE; McCAFFERY, 1999; RAJA et al., 1999). Estes mediadores podem ainda ser

liberados por fibras simpáticas e por células não neuronais como células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e células inflamatórias ou por plaquetas (BESSON, 1997).

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada por fibras aferentes até o SNC. Os axônios das fibras nociceptivas, localizados em nervos periféricos, estendem-se de seus corpos celulares, reunidos no gânglio da raiz dorsal, e bifurcam-se para enviar prolongamentos concomitantemente à medula espinhal e aos tecidos corporais (MILLAN, 1999).

As fibras aferentes primárias são classificadas por critérios funcionais e anatômicos, como velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização. Neurônios mais mielinizados, com maior diâmetro e que apresentam maior velocidade de condução são as fibras A $\beta$ . Elas respondem ao leve toque ou movimento e são importantes para informar a posição do corpo no espaço (propriocepção). Essas fibras são encontradas nos nervos que inervam a pele e em condições fisiológicas não contribuem para a sensação dolorosa. Ainda existem dois outros tipos de aferentes primários responsáveis pela transmissão da nocicepção da periferia à medula espinhal, que são as fibras de pequeno e médio diâmetro. Elas originam a maioria dos nociceptores e incluem fibras C não mielinizadas e fibras pouco mielinizadas A $\delta$ , responsáveis por transmitir o estímulo nociceptivo (SHELLEY; CROSS, 1994; PLEUVRY; LAURETTI, 1996; MILLAN, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

As fibras nociceptivas sensoriais primárias se conectam com neurônios secundários da substância cinzenta, no corno dorsal da medula espinhal. Estes neurônios projetam seus axônios transmitindo a informação nociceptiva para os centros encefálicos superiores, que através de neurônios terciários enviam a informação ao córtex cerebral. No córtex cerebral ocorre o processamento da informação nociceptiva resultando em consciência da dor (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; ALMEIDA et al., 2004). As principais vias que levam a informação nociceptiva da medula para o encéfalo são os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e espinohipotalâmico (CRAIG; DOSTROVSKY, 1999).

Alguns transtornos usualmente arremetem pacientes que apresentam dor associada a quadros de hipersensibilidade como a hiperalgesia (resposta nociceptiva aumentada a estímulos nocivos) e a alodínia (resposta nociceptiva a

estímulos inócuos) (MILLAN, 1999). Em termos de duração, a sensação dolorosa pode ser transitória (a ativação de nociceptores é feita na ausência de qualquer dano tecidual), aguda (geralmente ocorre lesão e ativação de nociceptores no sítio lesionado) ou crônica. A dor crônica, geralmente é originada por lesão ou doença, podendo ser perpetuada por fatores que não os causadores (LOESER; MELZACK, 1999; WOOLF; MANNION, 1999; MENDELL; SAHENK, 2003).

A dor pode ainda ser classificada por sua origem como: nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica e inflamatória. A dor nociceptiva ocorre pela estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros tecidos; a neurogênica reflete dano de tecido neuronal na periferia ou no SNC; a neuropática, quando há disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos. Porém, quando a dor não é proveniente de fonte somática identificável e pode refletir fatores psicológicos, denomina-se dor psicogênica (MILLAN, 1999).

Finalmente, na dor inflamatória, ocorre significativo dano tecidual, com dor geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação, ocorrendo geralmente quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos, produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação como ocorre na osteoartrite (DRAY, 1997).

### **1.3.1 Dor na OA**

A dor é um dos sintomas que mais comprometem a qualidade de vida de indivíduos que desenvolvem artrite. A quantificação da dor pode contribuir para elucidar os mecanismos desta doença e avaliar os efeitos da medicação antiartrítica. Assim, uma variedade de métodos que permitem explorar a dor artrítica foi desenvolvida empregando modelos animais (MIN et al., 2001).

As alterações em conjunto, como fluido articular, edema marginal ou subcondral, compõem os principais elementos que podem dar início à dor da OA (BONNIN; CHAMBAT, 2008).

A dor na artrite é caracterizada por dor espontânea, hiperalgesia ou alodínia. Esta última ocorre quando a articulação está sendo submetida à execução



de movimento ou quando se aplica uma pressão suave sobre a articulação. O aumento da sensibilidade à dor, resultante de uma sensibilização do sistema nociceptivo, está relacionada com a produção de mediadores inflamatórios como a bradicinina, as prostaglandinas, os neuropeptídeos e as citocinas, os quais ativam receptores nas fibras nervosas correspondentes. Além disso, há um aumento na expressão de receptores, como por exemplo, receptores para a bradicinina e receptores para as neurocininas. Durante a inflamação, também ocorre o desenvolvimento de hiperexcitabilidade dos neurônios da medula espinhal que é produzida por vários sistemas de transmissores/receptores que constituem e modulam a ativação sináptica dos neurônios (SCHAIBLE; EBERSBERGER; VON BANCHET, 2002). Além da sensibilização que leva a hiperalgesia, uma produção elevada de bradicinina, também pode ocasionar dor espontânea na artrite (TONUSSI; FERREIRA, 1997).

#### 1.4 OA de joelho

Osteoartrite de joelho é uma doença causada por alterações biomecânicas que afetam a cartilagem articular e o osso subcondral do joelho. Esta doença causa dor e impotência funcional. A OA pode envolver tanto a articulação tibiofemoral medial, tibiofemoral lateral ou femoropatelar, de acordo com a localização da deterioração da cartilagem (BONNIN; CHAMBAT, 2008).

Na clínica, o diagnóstico da OA fundamenta-se em achados clínicos, radiológicos e parâmetros laboratoriais (CREAMER; LETHBRIDGE-CEJKU; HOCHBERG, 2000). A classificação de Altman et al (1986), elaborada para o Colégio Americano de Reumatologia, determinou como parâmetros diagnósticos para OA de joelhos: idade superior a 50 anos, apresentação de dor no joelho, rigidez matinal menor que 30 minutos, crepitação articular, nível de densidade óssea, alargamento ósseo, ausência de calor local, sedimentação de eritrócitos abaixo de 40, nível de fator reumatóide inferior a 1:40, características do fluido sinovial e formação de osteófitos. Esses fatores apresentaram 95% de sensibilidade e 83% de especificidade para o diagnóstico de OA dos joelhos.

As medidas de capacidade física como força muscular, capacidade aeróbica de trabalho e função articular, que engloba amplitude de movimento e estabilidade são importantes determinantes da limitação física em pessoas com OA nos joelhos (ETTINGER; AFABLE, 1994).

Os indivíduos com OA apresentam diminuição da força dos grupos musculares que envolvem a articulação acometida (TAN et al., 1995; TEIXEIRA; OLNEY; 1995; CREAMER et al., 1998; LETHBRIDGE-CEJKU; HOCHBERG, 2000), sendo esta diminuição de 30 a 50% da resistência e da velocidade de contração quando comparados a indivíduos saudáveis da mesma faixa etária (FISHER et al., 1993). Há também diminuição do arco de movimento e aumento da descarga de peso no membro inferior não afetado quando comparado a indivíduos saudáveis da mesma faixa etária (MESSIER, 1994), além da diminuição da capacidade aeróbica (FISHER; PENDERGAST, 1994), diminuição da acuidade proprioceptiva (CAMARGOS et al., 2004), alterações no equilíbrio (RINGSBERG; GERDHEM; OBRANT, 1999; MESSIER, 2002) e nos 18 padrões de marcha quando comparado a indivíduos saudáveis da mesma faixa etária (KAUFMAN et al., 2001; AL-ZAHRANI; BAKHEIT, 2002; ZACARON, 2005; ARANTES, 2006).

Os exames de imagens também desempenham um papel importante na OA do joelho, uma vez que podem confirmar o diagnóstico da OA, determinar os compartimentos envolvidos, e avaliar o estágio da doença. As imagens também podem confirmar a presença da OA, além dos sintomas iniciais e também fornecem informações sobre a evolução da doença durante o tratamento. Vários tipos de técnicas de imagiologia são úteis para avaliar a OA de joelho como radiografia convencional e ressonância magnética (BONNIN; CHAMBAT, 2008).

#### **1.4.1 Modelo de OA de joelho**

A dificuldade de realização de estudos em humanos por razões técnicas ou éticas levou à necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais de artrites que apresentem semelhança com a patofisiologia da doença humana. Em modelos experimentais com animais podem-se traçar paralelos com as alterações

químicas e histológicas observadas na doença, podem-se realizar manipulações experimentais para testar novos medicamentos ou procedimentos, com controle maior das variáveis envolvidas, como exclusão do placebo, homogeneidade do grupo entre outros (BUTLER et al., 1992; BENDELE et al., 1999).

Em casos de artrite inflamatória, por exemplo, há necessidade de similaridade na sequência de eventos que levam à inflamação e destruição articulares, com características morfológicas, clínicas e bioquímicas da osteoartrite.

A mensuração dos danos da cartilagem é considerada um dos parâmetros necessários para a fidedignidade do modelo, sendo que traduz as diversas alterações teciduais que ocorrem na evolução do processo (BUTLER et al., 1992).

Em investigações pré-clínicas sobre doenças artríticas, um modelo frequentemente utilizado, em ratos, é o de uma injeção intravenosa de Adjuvante Completo de Freund (CFA) para induzir poliartrite (BUTLER et al., 1992). A injeção de CFA em animais de laboratório é um modelo estabelecido, in vivo, de artrite reumatóide, reproduzindo muitas características da doença nos seres humanos, e com histórico comprovado de previsibilidade (BENDELE et al., 1999).

Após a injeção de CFA, ocorre edema de pata e maciça infiltração de leucócitos (linfócitos e macrófagos) na sinóvia e significativa redução do volume ósseo acompanhado de graves lesões osteolíticas (BUTLER et al., 1992, ROMAS et al., 2002).

Estudos demonstram que o CFA é capaz de induzir alterações nos parâmetros morfológicos do osso em ratos, indicando osteólise e desconexão de trabéculas provavelmente devido à reabsorção óssea, enfraquecendo a resistência do osso. Butler et al. (1992) examinaram radiografias de ratos com artrite induzida por CFA e encontraram comumente destruição e extensa proliferação óssea essencialmente limitada à região das articulações afetadas. Bendele et al. (1999) também descreveram marcada reabsorção óssea e proliferação óssea periosteal em modelos de poliartrite induzida por CFA. Em humanos o sistema musculoesquelético apresenta complicações na artrite reumatóide e erosões ósseas focais periarticulares, com osteoporose em sítios de inflamação ativa e perda óssea generalizada (KRANE, 1993; ROMAS et al., 2002). Os estudos também mostram proliferação óssea formada ao redor do osso na proximidade da articulação de joelhos de ratos. Ele reflete a reação periosteal aos danos causados na articulação pelo CFA. Tem sido descrito que, em resposta ao conjunto inflamatório há tendência

de intensa reabsorção e formação óssea, especialmente periosteal, em modelos animais (BENDELE et al., 1999).

O CFA é um agente indutor de inflamação crônica que apresenta capacidade de estimular a resposta imune do organismo, levando à produção e liberação de citocinas e mediadores inflamatórios. O quadro inflamatório característico no modelo do CFA inclui edema articular, migração de leucócitos dentro da articulação e vários graus de degradação da cartilagem. Infelizmente, estes animais não podem ser conservados por um período mais longo, pois ocorrem severas alterações sistêmicas que afetam seu comportamento, fisiologia e bioquímica (BUTLER et al., 1992).

Outros investigadores injetam CFA intraplantar (STEIN; MILLAN; HERTZ, 1988) ou intradermicamente na base da cauda (AWOUTERS et al., 1976), induzindo assim poliartrite do dedo do pé, tornozelo e articulações, mas os animais precisam ser conservados também nestes modelos de doenças sistêmicas para estudos crônicos. Com isso, Butler et al. (1992) injetaram CFA em uma única articulação, a tíbio-tarsal, induzindo assim uma previsível monoartrite em ratos, cujo modelo que pode ser estudado por um período de até 6 semanas, sem que o CFA induza mudanças sistêmicas. As alterações morfológicas no osso são encontradas neste modelo, como observado na figura 3, que foram sumariamente documentadas utilizando radiografias das articulações. Em modelos de OA monoarticular ou monoartrite induzida por CFA, neutrófilos e outras células inflamatórias desempenham um papel importante, que é característica da artrite (BUTLER et al., 1992).

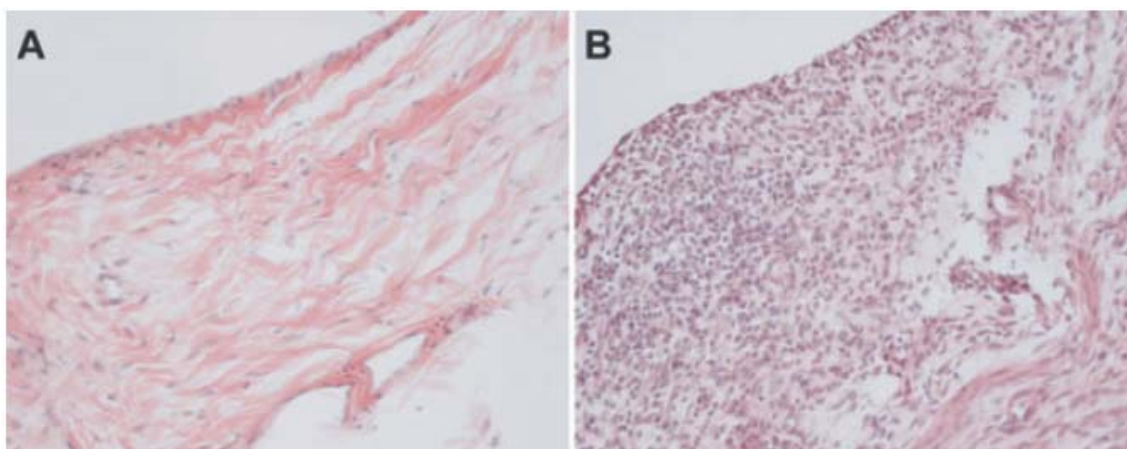


Figura 2. Articulações do joelho de ratos mostrando a camada de células composta por matriz cartilaginosa. O animal que não recebeu tratamento intra-articular apresenta a articulação sem

alterações aparentes (A). Em B pode-se observar a região com hipertrofia sinovial, notando-se predominante proliferação de células sinoviais. Os autores relatam alterações inflamatórias como edema e infiltração de células inflamatórias (LU et al, 2008).

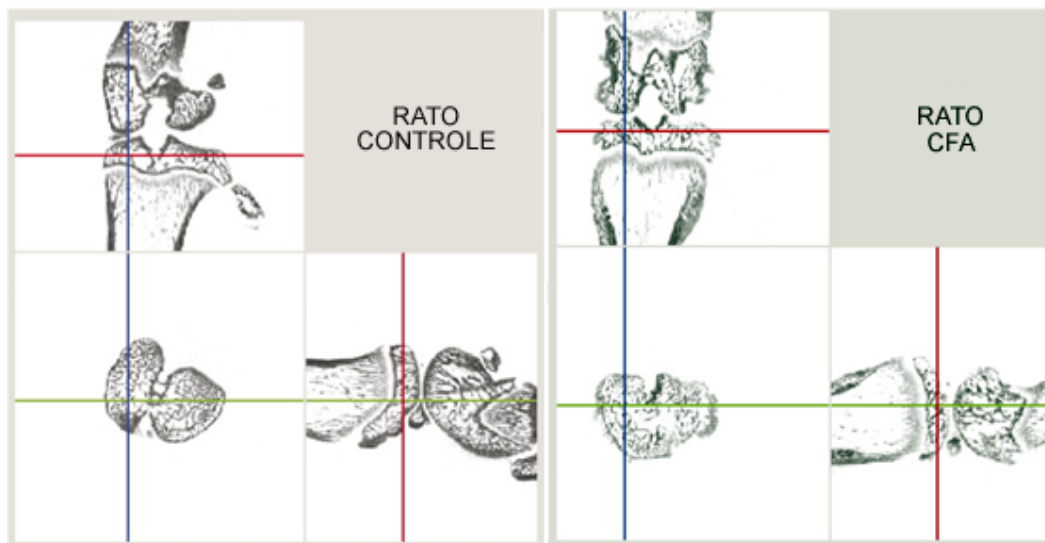


Figura 2 – Cortes, sagital, transverso e axial da articulação do joelho de ratos. Controle ou com osteoartrite induzida por CFA. No animal CFA, há desbaste do osso, reação periosteal com calcificações irregulares e alargando perímetro do osso. Adaptado de Butler et al (1992).

## 1.5 Tratamentos da OA

Foi proposto, em 2002, um consenso com o objetivo de conciliar informações e condutas referentes ao tratamento da OA pelas três principais especialidades envolvidas: reumatologia, fisioterapia e ortopedia. Assim, três recursos terapêuticos foram descritos: 1 – Farmacológico; analgésicos e antiinflamatórios, agentes tópicos, condroprotetores, cloroquina e terapia intrarticular, 2 – Não Farmacológico; programas educativos, fisioterapia, órtese e agentes físicos, 3 – Cirúrgico; osteotomias, desbridamento artroscópico, artroplastia e artrodese (COIMBRA et al., 2002).

Tradicionalmente, fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e drogas anti-reumáticas modificadoras de doença (DMARDs), são as opções terapêuticas mais utilizadas no tratamento das artropatias (BRAUN ; SIEPER, 2002; ANANDARAJAH & RITCHLIN, 2004). Os AINEs são a primeira linha de terapia utilizada para tratar processos artríticos, eles cumprem seus efeitos antiinflamatórios

e analgésicos, principalmente, via inibição da ciclooxigenase, contudo, apresentam rigorosos efeitos adversos que limitam o seu uso clínico em longo prazo. Do mesmo modo, estes fármacos não reduzem os danos articulares e não impedem a evolução natural da doença (TAMURA et al., 2002), podendo assim tornar o tratamento inviável. Já os fármacos glicocorticóides são grandemente utilizados para o tratamento de diferentes artropatias, principalmente quando os pacientes respondem inadequadamente aos AINEs e quando não há um acometimento múltiplo das articulações (PALAZZI et al., 2004). Além disso, as injeções intraarticulares de dexametasona podem promover alívio dos principais sintomas da artrite reumatóide (LASHINA; SOLOV'EV; BALABANOVA, 2000) e osteoartrite (STEIN et al., 1999), entretanto, a absorção sistêmica não permite o uso prolongado deste tipo de medicamento.

Os DMARDs são drogas modificadoras das alterações patobiológicas e patoanatômicas que ocorrem na cartilagem articular, principalmente pela inibição de metaloproteinases (TAMURA et al., 2002). Ao mesmo tempo, muitos dos benefícios dos DMARDs estão associados, também, à inibição de citocinas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . Assim, estas drogas agem limitando os danos articulares, potencialmente irreversíveis, inibindo o rumo natural da doença e reduzindo os principais sintomas inflamatórios articulares (GOLDENBERG, 1999).

Diferente dos antiinflamatórios não esteroidais comuns, a diacereína exerce suas ações através de mecanismos ainda não totalmente compreendidos, mas que provavelmente, não estão associados com a inibição da síntese de prostaglandinas (PELLETIER et al., 1998). A sua efetividade é similar a dos AINEs, porém, o início da sua ação é mais lento (CURATOLO ; BOGDUK, 2001). Estudos in vitro e em modelos animais sugerem que a diacereína pode ter um efeito modificador de doença. Isso é evidenciado, em parte, pelos seus efeitos inibitórios na expressão de enzimas degradadoras de cartilagem (metaloproteinases) e de citocinas como a IL- 1 $\beta$  (MOORE et al., 1998).

Muitos pacientes submetidos ao tratamento com DMARDs, não apresentam uma resposta satisfatória ou esta declina com o tempo. Além disso, a ocorrência de efeitos colaterais importantes contribui para a ineficácia e abandono deste tipo de tratamento. A busca de um melhor entendimento da patofisiologia das artropatias permitiu o desenvolvimento de novas terapias, ditas biológicas, como os agentes anti-TNF $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$ , os quais exercem suas ações via neutralização da

atividade das respectivas citocinas. Ao contrário dos DMARDs, estes agentes têm início de ação rápido, apresentam poucos efeitos colaterais e promovem uma pronunciada redução da evolução da doença (COSTELLO ; HALVERSON, 2003; SHARMA; HOTA; PANDHI, 2004).

Assim, mesmo que as drogas que apresentam atividade moduladora de citocinas importantes na artrite e, que inibem a progressão da doença tenha ganhado certa credibilidade no tratamento delas, a presença de efeitos adversos ou até a ineficácia ou perda da sua atividade antiartrítica é uma realidade. Deste modo, novas terapias são adotadas para o tratamento da artrite, tratando-se de fármacos que inibem de maneira direta e específica citocinas extremamente envolvidas no processo inflamatório artrítico (MAINI et al., 1999; WEINBLATT et al., 2003).

Também existem diferentes estratégias para reduzir a atividade da IL-1 $\beta$ : antagonista de receptor de IL-1 (anakinra), anticorpos monoclonais anti-IL-1 $\beta$  (IL-1 Trap), anticorpos contra o receptor tipo-1 da IL-1 entre outros. Uma desvantagem do tratamento anti-IL-1 $\beta$  é que a duração de seus efeitos é muito curta precisando uma administração diária enquanto a terapia de neutralização do TNF- $\alpha$  pelo uso de anticorpos monoclonais ou receptores solúveis, atuam por vários dias ou semanas (DINARELLO, 2004).

A CINC-1, uma citocina tipicamente quimiotática de neutrófilos (NAKAGAWA et al., 1998), também esta sendo cogitada como um bom alvo terapêutico, pois o estudo desta citocina tem permitido que se estabeleça um paralelo entre seus efeitos em animais e os efeitos da IL-8 em humanos. Citocinas antiinflamatórias como IL-10, IL-13 e IL-4, também estão envolvidas na patofisiologia da artrite desempenhando funções importantes como a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e reduzindo, dessa maneira, a severidade da doença, ou seja, um possível potencial terapêutico destas citocinas na artrite (YIN et al., 1997; MORITA et al., 2001; PULITI et al., 2002).

### 1.5.1 Tratamento com diacereína na OA

Em animais e humanos, a diacereína (ácido 4,5-diacetoxi-9,10-dihidro-9,10-dioco-2-antracencarboxílico) é completamente metabolizada em reína, o seu metabólito ativo (PELLETIER et al., 2000). A reína é uma antraquinona (ácido carboxílico 4,5-bi (oxiacetil) 9,10-dioxi-2 antraceno) encontrada em plantas do gênero *Cássia* com moderadas atividades analgésica, antiinflamatória e pouco efeito laxante (SPENCER ; WILDE, 1997). A diacereína é a forma diacetilada da reína, obtida por esterificação, quando se aumenta a lipofilia da molécula, sendo que é mais bem absorvida pela mucosa intestinal (PELLETIER et al., 2000).

Os primeiros trabalhos sobre a diacereína no tratamento da osteoartrite foram publicados a partir de 1980 (KAY et al, 1980). Os estudos iniciais com a diacereína foram marcados por problemas metodológicos, como número restrito de participantes, patrocínio escasso da indústria farmacêutica e problemas na avaliação. Contudo, nesses estudos, afirmou-se superioridade da diacereína comparada a placebo e antiinflamatórios não hormonais (LINGETTI et al., 1982; ADAMI et al., 1985; CARRABBA et al., 1987; MARCOLONGO, 1988; MAZZARO et al., 1989).

Em 1992, a diacereína foi aprovada na França para tratamento sintomático da OA, e desde setembro de 1994 ela é comercializada neste país (Negma-Lerads). Em agosto de 1996, esta substância foi disponibilizada no Brasil com o nome comercial de Artrodar (TRB Pharma, 2008).

A partir de 1994, outros estudos distinguiram alguns aspectos do fármaco, como o início lento de ação (NGUYEN et al, 1994), e um efeito residual de até 8 semanas após a interrupção do tratamento (LOUTHRENOO et al., 2004; TANG et al., 2004). Estudos com duração maior sugerem efeito de proteção estrutural (DOUGADOS et al., 2001).

Segundo as propriedades farmacológicas da diacereína, colocaram-na como um bom recurso para reduzir os sintomas e talvez até um modificador estrutural da doença (SPENCER; WILDE, 1997; BERDAH; BONO; BODINIER, 1993; YARON; SHIRAZI; YARON, 1999), inibidor da expressão da colagenase (Boittin et al, 1993), redutor da atividade fibrinolítica no líquido sinovial e nos fibroblastos



sinoviais (DEL ROSSO et al, 1990), inibidor de enzimas lisossômicas, redutor da quimiotaxia de neutrófilos (MIAN et al., 1987) e inibidor da enzima conversora de interleucina 1 (MOLDOVAN et al., 2000).

Seu metabólito ativo, a reína, inibe a atividade da IL-1 $\beta$ , reduz a produção de colagenase na cartilagem articular, e inibe a produção de ânion superóxido, a quimiotaxia e a atividade fagocítica de neutrófilos; e a fagocitose e a migração de macrófagos (CURATOLO; BOGDUK, 2001).

A dose terapêutica recomendada da diacereína é geralmente de 50 mg duas vezes ao dia. Alterações como insuficiência hepática não modifica os níveis terapêuticos do fármaco e em casos de insuficiência renal, recomenda-se a diminuição de 50 % da dose se o “clearance” for menor de 30 ml/min. A concentração plasmática é de 3,2 mg/l após 50 mg, o tempo de concentração máxima é de 2,2 horas e a meia vida para eliminação é de 4,3 horas (SPENCER; WILDE, 1997).

Em alguns modelos animais de OA, a diacereína proporciona efeitos anti-osteoartríticos e condroprotetores (MAZIERES; BERDA, 1993; HWA et al., 2001) e aumenta a síntese de hialuronato em células sinoviais (Schongen et al., 1988). Ela aumenta a expressão de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1) (TAMURA et al., 2001) e de TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento transformante beta 1) e TGF- $\beta$ 2 (fator de crescimento transformante beta 2) em condrócitos articulares bovinos o que sugere que estes podem ser alguns dos mecanismos pelo qual esta droga afeta a síntese da matriz óssea articular (FELISAZ et al., 1999).

Estudos demonstram que ao contrário dos antiinflamatórios não esteróides, a diacereína não inibe a síntese de prostaglandinas, desta forma não acarreta prejuízo à mucosa gástrica ou à função renal (LA VILLA et al., 1989; PETRILLO et al., 1991).

Tendo em vista que os trabalhos que demonstram os efeitos da diacereína, utilizam estudos realizados em humanos, pesquisas estas de difícil aplicabilidade e fidedignidade, ou ainda, utilizam modelos em animais de poliartrite ou artrite reumatóide. Um modelo de monoartrite (joelho), induzida por CFA em ratos, pode ser capaz de reproduzir sintomas característicos da doença, bem como provocar alterações morfológicas na articulação encontradas na osteoartrite, podendo assim contribuir no estudo dos efeitos da diacereína nesta doença. Além disso, pesquisas que examinem o uso de uma dosagem menor do fármaco com

eficácia sobre os sintomas e as alterações morfológicas da OA é capaz de minimizar o efeito adverso da diacereína.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar a ação farmacológica da diacereína na dose de 30 mg/kg, no controle das alterações comportamentais e histológicas da OA “*in vivo*”, utilizando o modelo de OA induzida pela injeção intra-articular de adjuvante completo de Freund (CFA) na cavidade sinovial do joelho de ratos.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Padronizar um modelo “*in vivo*” de inflamação crônica que sintetiza OA monoarticular, induzida pelo CFA injetado no joelho de ratos;
2. Verificar o possível efeito antinociceptivo da diacereína na dose de 30 mg/kg no modelo de monoartrite induzida pelo CFA;
3. Analisar o possível efeito da diacereína (30 mg/kg) na alodínia mecânica e térmica no modelo de monoartrite induzida pelo CFA;
4. Analisar o possível efeito anti-edematogênico da diacereína (30 mg/kg) no modelo de OA induzida pelo CFA;
5. Analisar os efeitos da diacereína (30 mg/kg) nas alterações histológicas observadas no joelho de ratos no modelo de OA monoarticular induzido por CFA.

### 3 MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250–300 g. Os animais foram aclimatizados, sob o ciclo claro e escuro (12 h claro/12 h escuro, claro iniciando as 7:00 h), com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e livre acesso à água e comida. Todos os animais utilizados foram aclimatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ofício nº 115/CEUA/PRPe/2008, seguindo as normas éticas para o cuidado dos animais de laboratório e investigação científica da dor em animais (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

#### 3.2 Reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas: diacereína obtida da Trb Pharma em São Paulo, Brasil; CFA (adjuvante completo de Freund), 3,30,5,50-tetramethylbenzidine (TMB) obtidos da Sigma (St. Louis, USA) e acetona PA, Cromato Produtos Químicos, Ltda (Diadema, SP-Brasil). A diacereína foi diluída em solução 0,9% de NaCl, 10% tween 80 e 90% de salina. Para a análise histológica foram utilizados: ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$  65% PA) obtido da VETEC, Xilol (Xileno PA-ACS, QX910.1000) da Quimex, formaldeído e álcool etílico PA (100, 95 e 70%) Cromato Produtos Químicos Ltda.

### 3.3 Injeção intra-articular de adjuvante completo de Freund (CFA)

A injeção intra-articular (i.a.) de adjuvante completo de Freund (CFA; 1mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* em 85% de óleo de parafina e 15% de monooleato de mannide) foi realizada após a depilação do joelho posterior direito dos animais anestesiados inicialmente com isoflurano 4%, sendo que a anestesia foi mantida com 1,5% de isoflurano e 30% de oxigênio durante o procedimento. Para tanto, os animais foram gentilmente imobilizados dentro de um cone de polietileno de maneira que fosse possível ter acesso apenas ao joelho posterior direito, o qual recebeu a injeção intra-articular (i.a.) de CFA. As injeções foram realizadas através do ligamento suprapatelar para dentro da cavidade sinovial, imediatamente após a realização do procedimento de anti-sepsia com solução de álcool iodado.

O volume de CFA injetado na cavidade articular, ou seja, no espaço sinovial do joelho, foi de 0,05 ml (LEVY et al., 2006; MATSON et al., 2007). Os animais controle receberam salina estéril (NaCl 0,9%, 0,05 ml por joelho), com os mesmos cuidados na administração.

A indução do processo inflamatório crônico nos animais no modelo utilizando CFA tem duração de aproximadamente 28 dias (LEVY et al., 2006). No presente estudo os animais foram avaliados por até 19 dias, pois, foram observadas as respostas dos animais em experimentos de dor e inflamação realizados anteriormente no nosso laboratório.

#### 3.3.1 Avaliação da alodínia mecânica

Com o objetivo de avaliar o efeito anti-alodínico da diacereína os animais injetados com CFA (N=8 por grupo) foram tratados pela via oral (v.o.) com salina (10 ml/kg) ou diacereína, na dose de 30 mg/kg, uma hora antes da avaliação experimental, de acordo com observações prévias no laboratório. Outro grupo foi injetado com salina na cavidade articular. O efeito da diacereína ou salina foi analisado na alodínia mecânica dos animais que receberam CFA ou salina na

cavidade articular através do filamento de Von Frey. O filamento utilizado foi o de 4,0 gramas, de acordo com resultados obtidos anteriormente no laboratório. Os animais foram colocados em caixas individuais de acrílico transparente sobre plataformas elevadas para permitir o acesso à parte inferior do corpo dos ratos, sendo que essas plataformas possuem orifícios de tamanhos adequados apenas para o acesso do filamento de Von Frey. O pesquisador toca o filamento na parte medial da superfície plantar das patas posteriores do animal, nesse momento força-se o filamento sobre a pata somente até que ele se encurve, retirando esse contato em seguida. A resposta da frequência de retirada da pata ao estímulo com o filamento foi medida em 10 aplicações com duração de 1 segundo cada, realizado sempre pelo mesmo avaliador (BORTOLANZA et al., 2002). A frequência de retirada foi determinada antes da indução da resposta inflamatória (resposta basal) para obter dados referentes à resposta normal dos animais e após a injeção de CFA (resposta inflamatória), sendo observada no decorrer dos 19 dias de experimento.

### **3.3.2 Medida de alodinia térmica (estímulo frio)**

Com o objetivo de avaliar o efeito anti-alodínico da diacereína, os animais injetados com CFA (N=8 por grupo) foram pré-tratados pela via oral (v.o.) com salina (10 ml/kg) ou diacereína, na dose de 30 mg/kg, uma hora antes da avaliação experimental, de acordo com observações prévias no laboratório. Outro grupo foi injetado com salina na cavidade articular. Os animais foram colocados em caixas individuais de acrílico transparente, sobre plataformas elevadas, 0,05 ml de acetona foi aplicado, com auxílio de seringa de insulina, na parte ventral da pata traseira do animal, iniciando-se a contagem do tempo através de um cronômetro.

Após 20 segundos da aplicação da acetona, a resposta do rato foi monitorada, observando se o animal retirava ou agitava a pata ipsi e contralateral dentro desse período. Caso este não apresentasse resposta, o monitoramento era encerrado. No entanto, se dentro desse período de 20 segundos os animais respondessem ao efeito de resfriamento da acetona, essa resposta era avaliada por um tempo adicional de 20 segundos, ou seja, um total de 40 segundos de

observação. As respostas a acetona foram classificadas com a seguinte escala de 4 pontos: 0, sem resposta; 1, retirada rápida, pincelada ou batida da pata, 2, retirada prolongada ou repetida da pata; 3, retirada repetida da pata com lambidas/mordidas dirigidas à parte ventral da pata. A acetona foi aplicada alternadamente, três vezes em cada pata e as respostas pontuadas categoricamente. Os escores foram, então, obtidos adicionando as pontuações para cada rato, sendo o escore mínimo 0 (não responde a nenhum dos seis estímulos) e a pontuação máxima possível 18, somando-se a resposta das duas patas (lambidas e batidas repetidas de patas em cada um dos seis estímulos) (FLATTERSA; BENNETT, 2004).

### **3.3.3 Avaliação do comportamento nociceptivo pela vocalização**

Uma avaliação comportamental foi realizada com o objetivo de averiguar a nocicepção espontânea, como descrito por Yu et al (2002). Nesta avaliação os animais foram pré-tratados com diacereína (30 mg/kg, v.o.) ou salina (10 ml/kg, v.o.), uma hora antes da avaliação experimental, de acordo com observações prévias no laboratório.

Os ratos foram restringidos com uma das mãos do experimentador, contudo sem lesionar o animal, para assim avaliar a vocalização. A limitação dos movimentos do animal possibilitava que a coxa dele ficasse fixa. Assim, com a outra mão, o avaliador, usando seu segundo dedo e o polegar, estendeu a pata lesionada do animal para um ângulo reto, sem adição de força ou qualquer outra manipulação, permitindo perceber quando o animal demonstrava uma vocalização (grunhido ou gritos agudos audíveis). As medidas foram repetidas 10 vezes com intervalos de 30 segundos e a média foi utilizada para a avaliação final.

### **3.3.4 Quantificação da dor espontânea**

Foi analisado o possível efeito antinociceptivo da diacereína colocando-se os animais em uma plataforma elevada, dentro de caixas de plástico transparentes, adequadas para a avaliação do comportamento do animal. Os animais foram pré-tratados com diacereína (30 mg/kg, v.o.) ou salina (10 ml/kg, v.o.), uma hora antes da avaliação experimental. Uma das características da nocicepção espontânea gerada pelo processo inflamatório na articulação do joelho é a postura em flexão do membro lesado. O ato de proteção do animal após a flexão do membro foi classificado em graus, de acordo com a escala comportamental de dor subjetiva (0-5), onde 0 – normal, 1 – dedos retraídos, 2 – pé em eversão, 3 – suporte parcial do peso, 4 – sem suporte de peso e proteção do membro, 5 – sem contato algum do membro no solo (GOPALKRISHNAN; SLUKA, 2000).

### **3.3.5 Avaliação edematogênica**

Com o objetivo de quantificar o edema causado pelo processo inflamatório produzido pela injeção de CFA intra-articular e avaliar o efeito anti-edematogênico da diacereína, os animais foram pré-tratados com diacereína (30 mg/kg, v.o.) ou salina (10 m//kg, v.o.), uma hora antes da avaliação experimental, de acordo com observações prévias no laboratório. Para avaliar o efeito antiedematogênico da diacereína, utilizou-se um paquímetro a fim de quantificar o diâmetro articular (milímetros) do joelho, usando como resultado a média da diferença entre o joelho injetado com o CFA e o joelho contralateral (BRESSAN et al., 2006).

### 3.3.6 Avaliação histológica

#### 3.3.6.1 Preparação das amostras

Os animais foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo (3º, 15º e 23º dias) e tiveram a articulação do joelho removida. Após a retirada do material, as amostras foram fixadas em formol tamponado com fosfato 0,1 M a pH 7,2 durante seis dias e lavadas em água corrente durante duas horas. Foi necessário o uso de ácido nítrico (5%) para proceder à descalcificação por um período mínimo de 5 dias e novamente as amostras foram lavadas em água corrente durante duas horas. Depois de cuidadosa desidratação em etanol, utilizou-se a metodologia descrita por Cargnin-Ferreira; Sarasquete (2008), para a inclusão em parafina mantida à 58°C, utilizando como líquido intermediário o xilol como descrito abaixo.

Desidratação e inclusão em parafina: Etanol 70% (mínimo 24 horas), Etanol 80% (45 minutos), Etanol 90% (45 minutos), Etanol absoluto 100% I (45 minutos), Etanol absoluto II (45 minutos), Etanol-Xilol 1/1 (45 minutos), Xilol I (45 minutos), Xilol II (45 minutos), Parafina I (1 hora), Parafina II (1 hora), Parafina III (1 hora).

Uma vez o material incluído em parafina e feito seus blocos, os mesmos foram cortados em micrótomo Leica RM 2025 com espessura de 5 µm. Os cortes foram estirados e recolhidos em banho termostático a 52°C e montando-os sobre lâminas gelatinizadas para sua fácil adesão.



### 3.3.6.2 Técnicas histomorfológicas

Os cortes obtidos foram então desparafinizados e hidratados segundo a metodologia de rotina e corados segundo a técnica de Cason (CARGNIN-FERREIRA ; SARASQUETE, 2008).

As preparações histológicas foram dispostas numa solução de Orange G (1%), Fucsina Ácida (1%), Azul de Anilina (1%) e Ácido fosfotúngstico (1%) durante 5 minutos. Passado esse tempo, as lâminas foram então lavadas para retirada do excesso de corante, desidratadas e montadas em resina.

O uso desta técnica, em detrimento da coloração bicromática hematoxilina-eosina, baseia-se no fato de que técnicas tricrômicas, como a usada neste projeto, evidencia compostos protéicos e glicídicos assim como estruturas morfológicas similares com cores distintas, aumentando, portanto os contrastes e evidenciando melhor as estruturas analisadas.

### 3.3.6.3 Tratamento das imagens

As preparações histológicas foram fotografadas em microscópio de luz (Olimpus, mod. Dx 41) com sistema de captura de imagem digital acoplado (Sony Exwave Had).

### 3.3.7 Análise estatística

Todos os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste post hoc Bonferroni e expressos como a média  $\pm$  E.P.M. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado como

indicativo de significância e foram realizados através do software “Graph Pad Instat®” (GraphPad software, San Diego, CA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da alodínia mecânica

A injeção de CFA foi capaz de induzir alodínia mecânica nos animais, quando injetado intra-articular no joelho dos ratos, conforme avaliada pela porcentagem de retirada da pata dos animais no teste do filamento de Von Frey. Além disso, pode-se observar que o efeito alodínico induzido pelo CFA (i.a.) permaneceu durante todo o período de experimentação (Figura 4).

No entanto, o tratamento dos animais com diacereína, uma vez ao dia durante 19 dias consecutivos, foi capaz de inibir de forma significativa a alodínia mecânica induzida pela injeção de CFA, com inibição de  $58 \pm 10\%$  a  $87 \pm 3\%$  ao longo do experimento (Figura 4). Adicionalmente, o efeito antialodínico da diacereína (30 mg/kg, v.o.) apresentou pico de ação em 1 hora, sendo este o tempo determinado para a realização de todas as avaliações comportamentais. O efeito antialodínico da diacereína perdurou até o décimo nono dia de tratamento, sendo que o grupo controle ainda apresentava resposta positiva no teste (Figura 4).

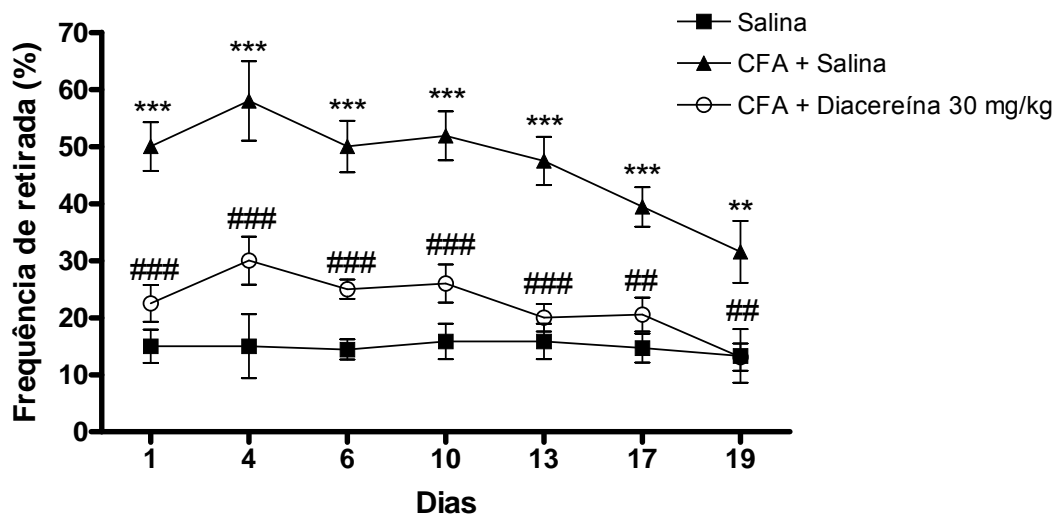


Figura 4 – Avaliação do efeito antialodínico da diacereína (30 mg/kg, v.o.), administrada diariamente por um período de 19 dias, na alodínia mecânica induzida pela injeção de CFA (0,05 ml, i.a.) no joelho de ratos. A análise foi obtida na pata ipsilateral. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo salina (0,05 ml, i.a.) e ####  $p < 0,001$  e ##  $p < 0,01$  comparado ao grupo controle (CFA i.a., que recebeu tratamento com salina v.o. por 19 dias). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste post hoc Bonferroni.

O CFA injetado no espaço sinovial do joelho dos ratos não foi capaz de induzir alodínia mecânica no membro contralateral dos animais, quando avaliados pela porcentagem de retirada da pata dos animais no teste do filamento de Von Frey (Figura 5).

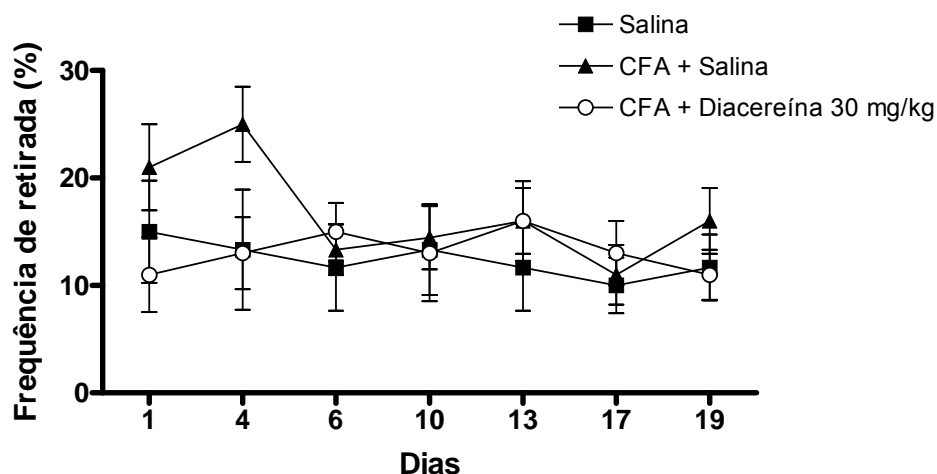


Figura 5 – Avaliação do efeito da diacereína (30 mg/kg, v.o.), administrada diariamente por um período de 19 dias, na alodínia mecânica induzida pela injeção de CFA (0,05 ml, i.a.) no joelho de ratos. A análise foi realizada na pata contralateral. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste post hoc Bonferroni.

#### 4.2 Medida de alodínia térmica (estímulo frio)

Na figura 6 pode-se observar que o CFA injetado na articulação do joelho de rato foi capaz de induzir alodínia térmica ao frio até o 14º dia de experimento. Além disso, pode-se observar que a diacereína (30 mg/kg, v.o.) foi capaz de inibir significativamente a alodínia térmica induzida pelo CFA. O efeito da diacereína ocorreu a partir do quinto dia de administração permanecendo até o décimo quarto dia de tratamento diário, com inibição de  $66 \pm 12\%$  a  $87 \pm 8\%$ .

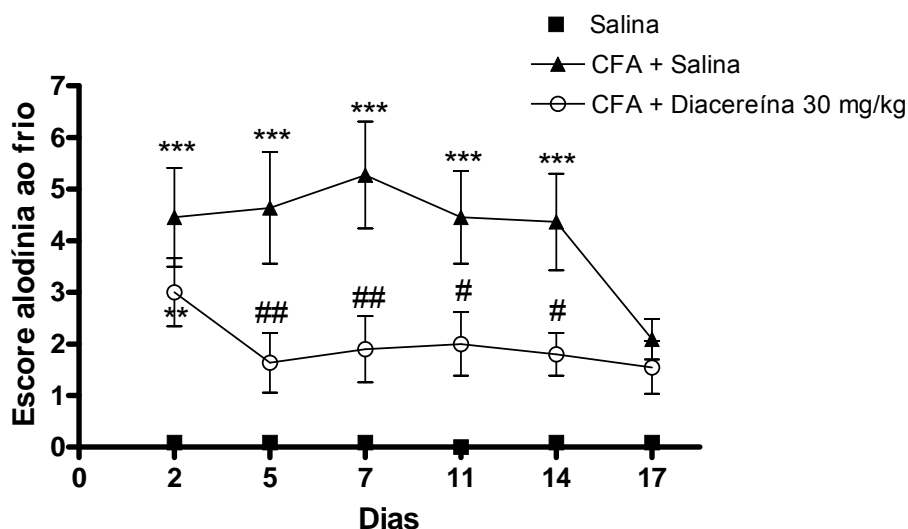


Figura 6 – Avaliação do efeito antialodínico da diacereína (30 mg/kg, v.o.), administrada diariamente por um período de 17 dias, na alodínia ao frio induzida pela injeção de CFA (0,05 ml, i.a.) no joelho de ratos. Os dados estão representados através do escore da avaliação com acetona na pata. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo salina (0,05ml, i.a.) e ##  $p < 0,01$  e #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (CFA i.a., que recebeu tratamento com salina v.o. por 17 dias). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste post hoc Bonferroni.

#### 4.3 Avaliação da nocicepção pela vocalização

Os resultados apresentados na Figura 7 demonstram que os animais que foram injetados com CFA no espaço sinovial do joelho responderam com frequência de vocalização significativamente maior quando comparados a animais que foram injetados com salina injetada no mesmo local. Pode-se também observar que a diacereína (30 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente a nocicepção induzida pelo CFA (i.a.) e avaliada através da porcentagem de vocalização expressa pelos animais, com inibição de  $41 \pm 11\%$  a  $83 \pm 5\%$ .

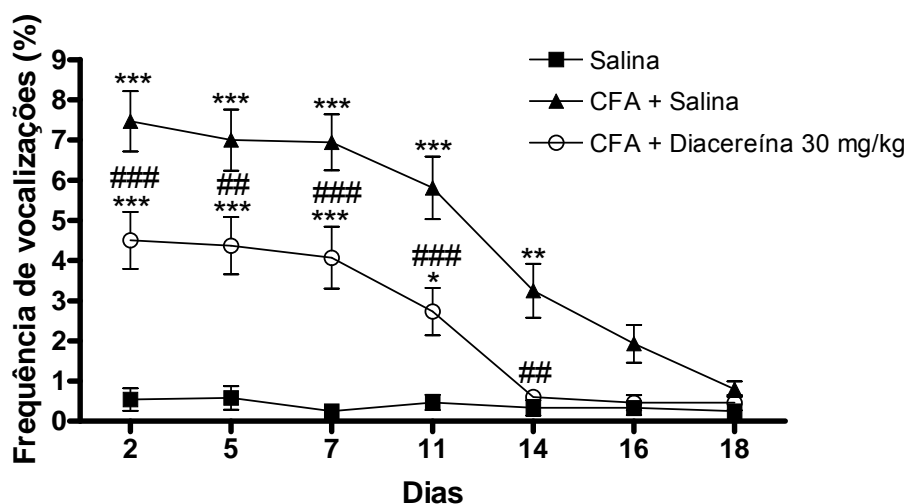


Figura 7 – Avaliação do efeito antinociceptivo da diacereína (30 mg/kg, v.o.), administrada diariamente por um período de 18 dias, na monoartrite induzida pela injeção de CFA (0,05 ml, i.a.) injetado no joelho de ratos. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina (0,05 ml, i.a.) e ###  $p < 0,001$  e ##  $p < 0,01$  comparado ao grupo controle (CFA i.a., que recebeu tratamento com salina v.o. por 18 dias). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste post hoc Bonferroni.

#### 4.4 Quantificação da dor espontânea

O CFA injetado no joelho de ratos foi capaz de alterar a postura do membro lesado dos animais. Este comportamento foi avaliado por escore de dor espontânea (Figura 8). Os animais tratados com diacereína (30 mg/kg, v.o.) foi capaz de reduzir de forma significativa esse escore de dor espontânea quando comparado aos animais que receberam CFA e tratados com salina (grupo controle), a partir do quarto dia permanecendo até o 18º dia de avaliação, como pode ser observado na Figura 8.

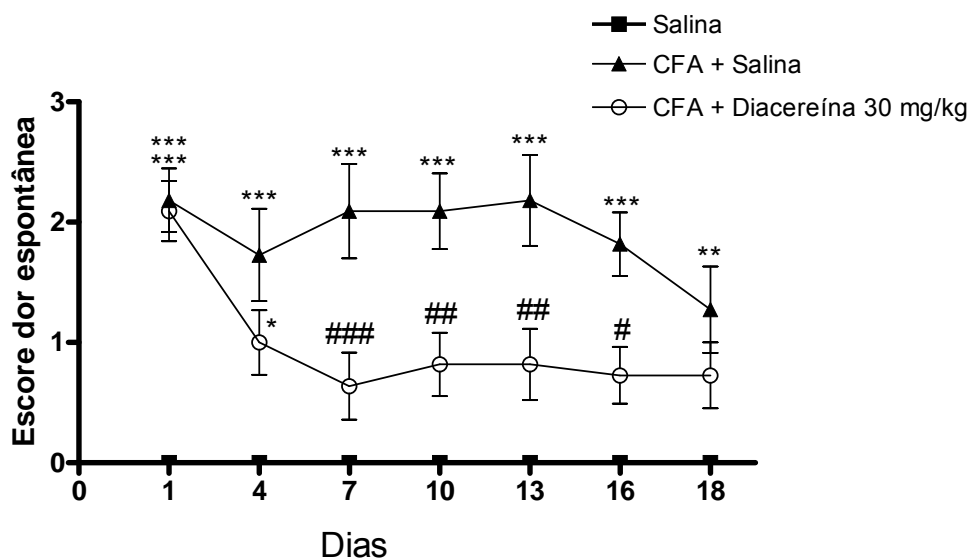


Figura 8 – Avaliação do efeito antinociceptivo da diacereína (30 mg/kg, v.o.), administrada diariamente por um período de 18 dias, na monoartrite induzida pela injeção de CFA (0,05 ml, i.a.) no joelho de ratos. Os dados estão representados através do escore da avaliação de dor espontânea. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina (0,05 ml, i.a.) e ###  $p < 0,001$ , ##  $p < 0,01$  e #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (CFA i.a., que recebeu tratamento com salina v.o. por 18 dias). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste post hoc Bonferroni.

#### 4.5 Avaliação edematogênica

Os animais que foram injetados com CFA na articulação do joelho apresentaram aumento do diâmetro da articulação que variou de 0,12 a 0,42 mm, sendo essa resposta deferida como edema articular (Figura 9). O tratamento dos animais com diacereína (30 mg/kg, v.o.) foi capaz de reduzir de maneira significativa o edema articular induzido pelo CFA, com inibição de  $60 \pm 6$  a  $40 \pm 9$  %.

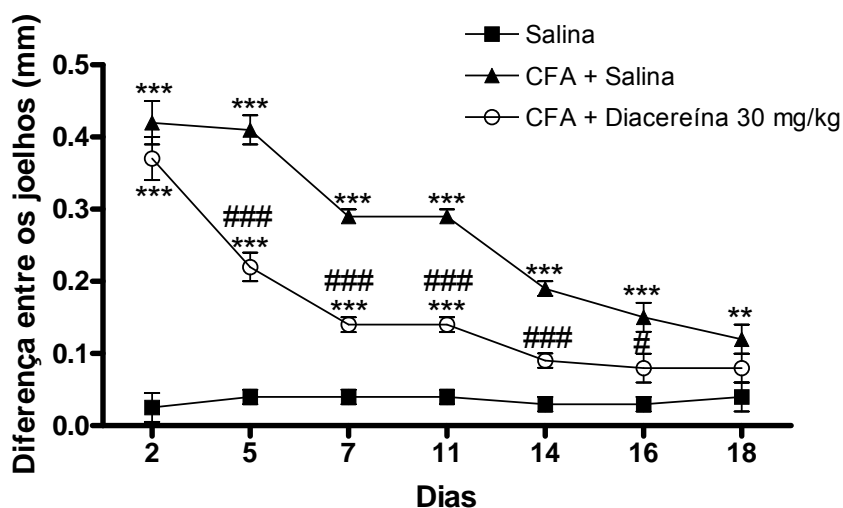


Figura 9 – Avaliação do efeito antiedematogênico da diacereína (30 mg/kg, v.o.), administrada diariamente por um período de 18 dias, no edema induzido pela injeção de CFA (0,05ml, i.a.) no joelho de ratos. Os dados estão representados pela diferença de diâmetro (mm) entre o joelho ipsilateral e o contralateral. Cada grupo representa a média de 8-10 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo salina (0,05 ml, i.a.) e ###  $p < 0,001$  e #  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle (CFA i.a., que recebeu tratamento com salina v.o. por 18 dias). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste post hoc Bonferroni.

#### 4.6 Avaliação histológica

A avaliação histológica foi realizada em animais que receberam salina i.a. e CFA i.a., sendo que estes últimos foram divididos em dois grupos onde um recebeu tratamento v.o. com salina e outro grupo tratamento v.o. com diacereína (30 mg/kg). Cada grupo experimental continha a média de 6-8 animais. No 3º, 15º e 23º dia após a injeção i.a. de CFA os animais foram sacrificados e tiveram seus joelhos retirados e processados para avaliação histológica.

Assim, foi possível observar que todos os animais que receberam salina i.a., independente do dia (3, 15 ou 23 dias), não apresentaram alterações na morfologia do joelho, apresentando cartilagem articular e membrana sinovial íntegras (Figura 10 A,B e C).

Os animais que receberam CFA no joelho e posteriormente tratamento com salina (v.o.) por três dias apresentaram expressiva inflamação intra-articular, periarticular e na própria cartilagem, com comprometimento da matriz cartilaginosa,



além de hemorragia intra-articular (Figura 11 A e 12 A). Os animais que receberam CFA i.a. e posteriormente tratamento com salina v.o., por quinze dias, apresentaram expressiva inflamação intra-articular e periarticular, que se estendeu até músculos da região. Houve também a presença de hemorragia articular e todos os animais mostraram acentuada degradação da cartilagem articular, observada pela presença de fissuras verticais da matriz cartilaginosa (Figura 11 B e 12 B).

Pode-se observar também que os animais que receberam CFA no joelho e foram tratados com salina (v.o.) por um período de 23 dias apresentaram inflamação intra-articular, periarticular e na própria cartilagem, com aspectos de degeneração, além de apresentarem grande número de macrófagos na região (Figura 11 C e 12 C).

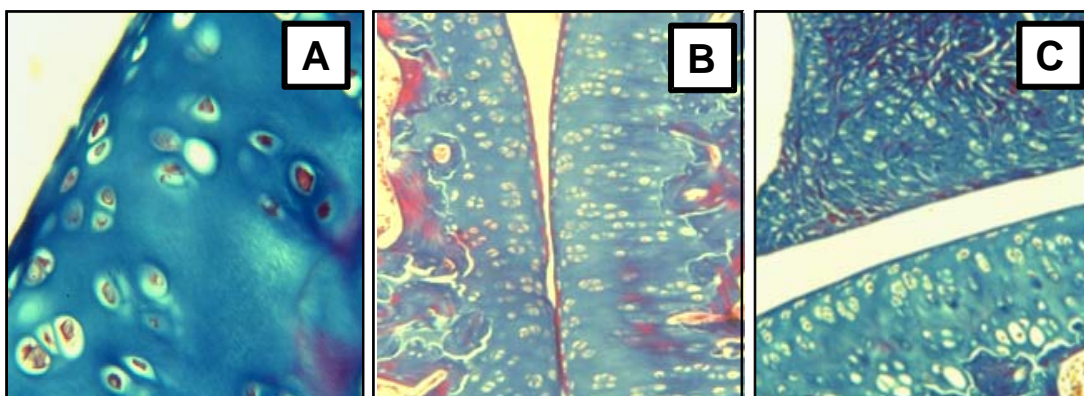


Figura 10 – Detalhe de articulações (diartroses) de joelhos de ratos saudáveis. Coloração pelo método de Cason.

Animais que receberam injeção de salina i.a. (0,05 ml), sacrificados no 3º dia (A), 15º dia (B) e 23º dia (C) após o procedimento. Células da matriz cartilaginosa (A), 400x, Cartilagem articular (B) e Menisco (C), 100x. As figuras A, B e C mostram uma articulação totalmente sadia, possibilitando a visualização de matriz cartilaginosa (A) e fibrocartilagem (B) íntegras e de constituição bioquímica normal, evidenciada pela coloração sem manchas expressivas.

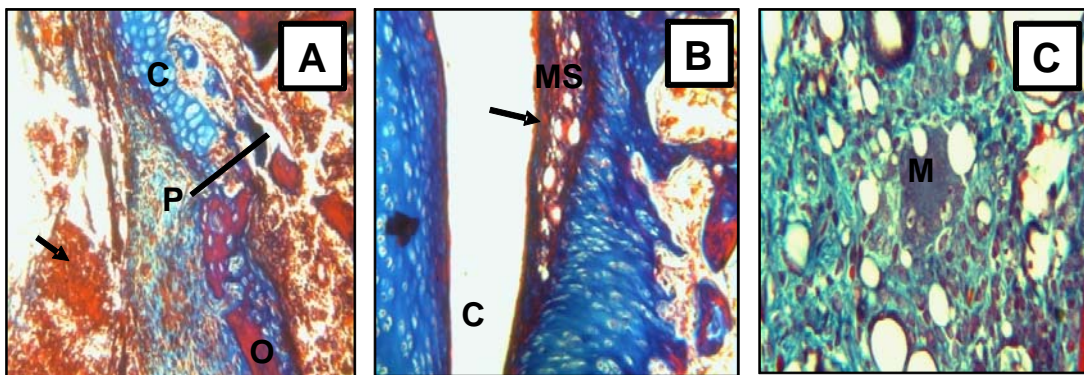


Figura 11 – Detalhe de articulações (diartroses) de joelhos de ratos que receberam CFA intra-articular. Coloração pelo método de Cason.

As figuras A, B e C são de animais que receberam injeção de CFA i.a. (0,05 ml), e tratamento com salina (v.o.), sacrificados no 3º dia (A), 15º dia (B) e 23º dia (C) após o procedimento. Pode-se observar a cavidade articular (A), 100x, com inflamação do periósteo (P) atingindo a região de contato

com a cartilagem articular (CA) e o osso (O), ressaltada pela linha contínua. Nota-se ainda a presença de hemorragia expressiva na cavidade articular (flecha). Na figura B a cavidade articular, 100x, inflamação da membrana sinovial (MS) em contato com a cartilagem. Pode-se ainda observar uma discreta presença de hemorragia (flecha) na cavidade articular (CV). Célula Gigante de Corpo Estranho (C), 400x, visualiza-se nesta imagem uma célula gigante de corpo estranho, oriunda da fusão de vários macrófagos (M). Estas células têm a função de fagocitar células ou substâncias presentes em um processo inflamatório.

Os animais que foram injetados com CFA na articulação do joelho e tratamento com diacereína (30 mg/kg, v.o.) por três dias apresentaram inflamação periarticular e intra-articular, porém aparentemente em menor grau quando comparados com os animais controle. No entanto, eles também apresentaram hemorragia intra-articular. Um dos animais (n=8) analisados apresentou leve alteração na matriz cartilaginosa (Figura 12 A e D).

Na avaliação histológica dos animais que tiveram injetado CFA na articulação do joelho e depois foram tratados com diacereína (30 mg/kg, v.o.) por quinze dias, observaram-se poucas características de inflamação nos tecidos conjuntivos periarticulares, além de inflamação intra-articular, sem presença de hemorragia (Figura 12 E). Contudo, diferentemente dos animais do grupo controle analisados no mesmo período, os animais tratados com diacereína não apresentaram qualquer alteração na cartilagem (Figura 12 B).

Os animais que foram injetados com CFA no joelho e tratados com diacereína (30 mg/kg, v.o.) por um período de 23 dias apresentaram discreta inflamação periarticular e intra-articular, sem comprometimento da cartilagem ou qualquer outra estrutura (Figura 12 F). Os animais que não receberam tratamento com diacereína apresentaram inflamação com aspectos de degeneração (Figura 12 C).

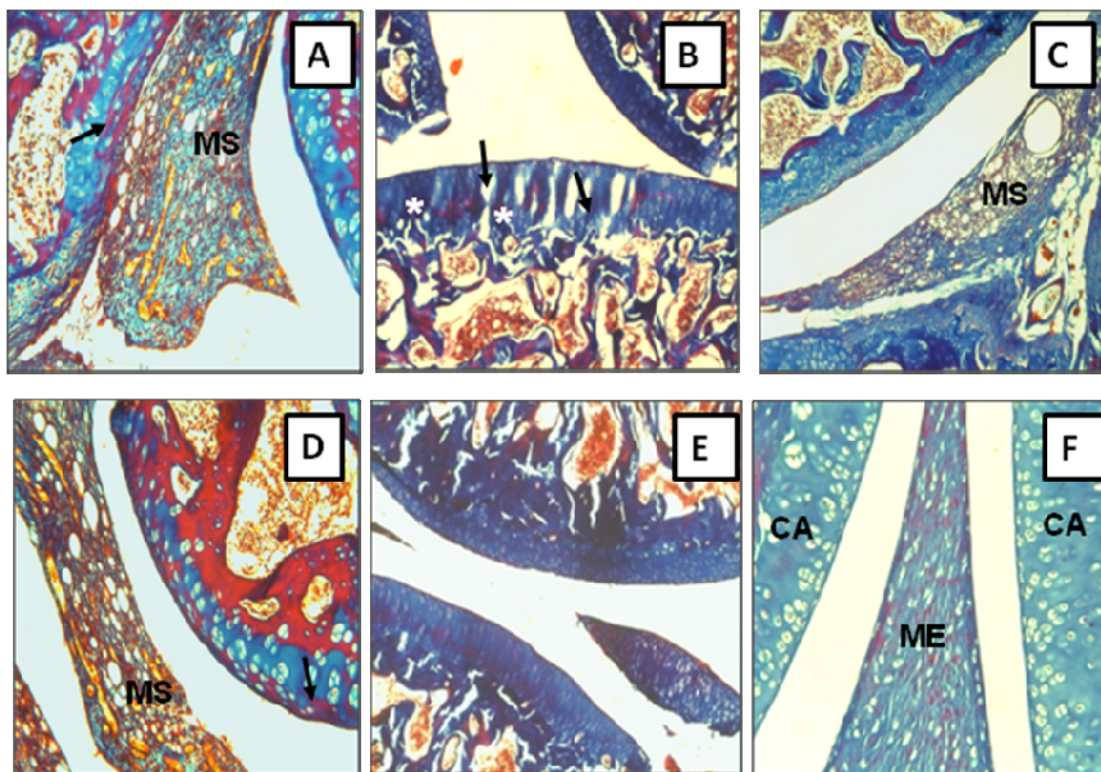


Figura 12 – Detalhe de articulações (diartroses) de joelhos de ratos com diferentes características histológicas e histopatológicas em função dos distintos tratamentos. Coloração pelo método de Cason.

Todas as figuras representadas são de animais que receberam injeção de CFA i.a. (0,05 ml). As figuras A, B e C são de animais que receberam tratamento com salina (v.o.), sacrificados no 3º dia (A), 15º dia (B) e 23º dia (C) após o CFA. As figuras D, E e F são de animais que foram tratados com diacereína (30 mg/Kg, v.o.) e sacrificados no 3º dia (D), 15º dia (E) ou 23º dia (F) após a injeção de CFA. Na figura A pode-se observar a cavidade articular, 100x, com morfologia típica de um quadro inflamatório presente da membrana sinovial (MS). Em relação à cartilagem, pode-se visualizar alteração da matriz cartilaginosa (flecha). Usualmente, uma cartilagem normal é corada somente com azul de anilina, o que lhe confere coloração azulada. Quando há alteração bioquímica da matriz, neste caso, devido ao uso de CFA, esta se cora, além do azul de anilina, com fucsina ácida. Na figura D, nota-se a cavidade articular, 100X, como observado em A, com inflamação da membrana sinovial (MS), a cartilagem articular também apresenta alteração na matriz (flecha). Cavidade articular (Figura B), 40X, com articulação apresentando perda de matriz cartilaginosa, onde se podem visualizar amplos espaços em branco (flecha). Também se pode visualizar alteração na cartilagem evidenciada pela coloração da fucsina ácida (\*). Contudo em E a cavidade articular, 40X, está sadia, evidenciada pela integridade da matriz cartilaginosa, bem como sua coloração eminentemente azul. Na figura C observa-se a cavidade articular, 100X, averiguando-se a membrana sinovial (MS) fortemente inflamada, onde se percebe grande quantidade de "vacúolos". Em F o animal não apresentou alterações, confirmado pela cavidade articular, 100X, onde observa-se uma articulação totalmente sadia, onde se visualiza uma cartilagem (CA) e um menisco (ME) íntegros e de constituição bioquímica normal, evidenciada pela coloração sem manchas vermelhas expressivas.

## 5 DISCUSSÃO

A OA pode ser desencadeada por múltiplos fatores (genéticos, metabólicos e traumáticos) e não afeta simplesmente a cartilagem articular, mas envolve a articulação como um todo, incluindo o osso subcondral, ligamentos, cápsula, membrana sinovial e músculos periarticulares (KENTTER; GOLDBERG, 1995).

Estas estruturas podem apresentar alterações morfológicas, biomecânicas, moleculares e bioquímicas em células e matriz levando ao amolecimento, fibrilação, ulceração, perda da cartilagem articular, esclerose e aumento da densidade e dureza do osso subcondral, osteófitos e cistos subcondrais. Contudo, essas alterações não são encontradas igualmente em todos os indivíduos (KENTTER; GOLDBERG, 1995).

Devido a essa multifatorialidade, o tratamento da OA é complexo e deve ser multidisciplinar, buscando a melhora funcional, mecânica e clínica. Neste sentido, a indústria farmacêutica vem avançando na busca de tratamentos para a OA. Alterações bioquímicas específicas contribuem para a doença, podendo estas serem revertidas através da utilização de fármacos mais específicos (KENTTER; GOLDBERG, 1995).

Baseado no entendimento dos mecanismos patofisiológicos subjacentes ao dano tecidual da articulação osteoartrítica, agentes farmacológicos têm sido desenvolvidos, nos quais o principal mecanismo de ação é a inibição de: (a) enzimas de degradação, como a colagenase; (b) citocinas, tais como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ ; ou (c) de vias envolvidas na síntese dessas citocinas (BOITTIN et al., 1993; PELLETIER et al., 2001; MOORE et al., 1998; MARTEL-PELLETIER et al., 1998).

Dentre esses fármacos, destaca-se a diacereína, uma substância que pertence à classe química das antraquinonas. Ela apresenta efeitos benéficos em modelos animais de OA, além de ter demonstrado efeito anti-artrítico e condroprotetor, quando investigada em modelo de OA, em ratos; também previne lesão de cartilagem (BRANDT et al., 1997; MOORE et al., 1998; DOZIN et al., 2002).

Este fármaco apresenta eficácia no tratamento sintomático de doenças inflamatórias degenerativas da articulação como a AO, tanto em ensaios pré-clínicos como clínicos, os quais sugerem que a diacereína alivia os sintomas da OA

(NGUYEN et al., 1994, 2000; PELLETIER et al., 2000). O uso clínico da diacereína é liberado em alguns países para o tratamento específico de pacientes com doenças articulares degenerativas, como a OA, promovendo melhora dos sintomas clínicos. Contudo, apesar de ser utilizada já há alguns anos, os mecanismos pelos quais ela atua ainda não foram totalmente esclarecidos (LEBLAN; CHANTRE; FOURNIE, 2000; TRB PHARMA, 2008).

Assim, o tratamento com diacereína perdura por pelo menos 3 meses. O alívio dos sintomas torna-se evidente da 2<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> semana e realmente significativo da 4<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> semana. Entretanto, outra característica do fármaco a base de diacereína é o efeito adverso causado, podendo ocorrer diarreia e dores abdominais em pacientes sensíveis aos derivados antraquinônicos (DOUGADOS et al., 2001; TRB PHARMA, 2008).

Contudo, os sintomas diminuem ao reduzir-se a dose diária do fármaco, de 100 mg ao dia, ou seja, duas cápsulas, para 50 mg ao dia, uma cápsula (TRB PHARMA, 2008). É interessante ressaltar que, mesmo com a redução da dose, a maioria dos pacientes que fazem uso de medicamento a base de diacereína continua apresentando alguns efeitos indesejáveis, que vão desde efeitos gastrintestinais até coloração amarela escura intensa na urina (DOUGADOS et al., 2001; TRB PHARMA, 2008).

Neste trabalho, a diacereína foi avaliada não apenas como um fármaco para aliviar os sintomas e alterações morfológicas ocorridas na OA de joelho, mas também em dosagem menor do que a utilizada na clínica, reduzindo assim seus efeitos colaterais. Encontrou-se, portanto, que a diacereína na dose de 30 mg/kg, administrada em ratos pela via oral, foi capaz de inibir a alodínia (mecânica e térmica), nocicepção espontânea, edema e alterações histológicas induzidas pelo CFA injetado diretamente na articulação do joelho, sendo este um modelo de OA de joelho em animais. Além disso, pode-se observar que o efeito adverso da diacereína para o intestino foi reduzido, com a diminuição da dose administrada.

O CFA induziu hipersensibilidade e inflamação, consistente com os resultados descritos anteriormente neste modelo (WILSON et al., 2005; STATON; WILSON; BOUNTRA, 2007; LEVY, 2006), que foi demonstrado pelo quadro alodínico, edema articular, nocicepção e dano articular encontrado no presente trabalho.

Várias podem ser as causas da sensibilização causada pelo CFA. Como já descrito, ele induz inflamação crônica, e é capaz de estimular a resposta imune, levando à produção e liberação de citocinas e mediadores inflamatórios (BUTLER et al., 1992). Alguns autores demonstraram que o modelo de injeção i.a. de CFA é capaz de alterar a produção de mediadores inflamatórios periféricos. Estes facilitam a despolarização da membrana neuronal por tempo prolongado, exacerbando a hiperalgesia ou a alodínia. Isso pode ser resultado do aumento da condutividade de canais de sódio ou cálcio ou pela redução do influxo de potássio ou cloreto para o meio intracelular (WRITHT, 1999).

O CFA no joelho pode, por exemplo, aumentar a imunorreatividade à CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) de neurônios do gânglio da raiz dorsal, desempenhando um papel na patogênese da inflamação aguda e crônica mediada pelo CFA (STATON; WILSON; BOUNTRA, 2007).

Outros agentes flogísticos como o iodoacetato-monossódio injetado no joelho de ratos também é capaz de causar alodínia, avaliada através do filamento de Von Frey, que segundo o autor é caracterizada como alodínia pontual. Este efeito parece ser sinalizado pela ativação de neurônios sensoriais primários A $\delta$ , enquanto a alodínia dinâmica seria sinalizada por neurônios sensoriais A $\beta$  (COMBE; BRAMWELL; FIELD, 2004). Em humanos, a origem da dor articular associada à OA é devido à estimulação das fibras sensoriais do tipo C e A $\delta$  presentes na sinóvia e que envolvem estruturas periarticulares, como ligamentos e músculos (BUCHANAN; KEAN, 2002a,b).

Neste trabalho, a injeção de CFA dentro da articulação do joelho foi capaz de induzir alodínia (mecânica e térmica) e nocicepção nos animais, sendo que a alodínia térmica ao frio e a nocicepção avaliada pela vocalização do animal ao estender-se o membro inflamado permaneceu até o décimo quarto dia. A alodínia mecânica e o escore de dor espontânea permaneceram até os últimos dias de avaliação realizados neste estudo, além disso, houve indução de edema que também permaneceu até o fim das avaliações. Estes dados corroboram outros estudos, que mostram o CFA, em modelos de monoartrite, induzindo hiperalgesia térmica, alodínia, nocicepção e edema (LEVY et al., 2006; SHAN et al., 2007).

Trabalhos demonstram que em modelos de OA monoarticular ou monoartrite induzida por CFA, pode-se induzir inflamação também no joelho contralateral, visto pela quantidade de azul de Evans (denotando extravasamento

plasmático) e edema no joelho ipsilateral e contralateral de ratos que foram injetados com CFA e comparados aos animais injetados com salina. O aumento da perfusão e vasodilatação na articulação contralateral poderiam indicar um “estado pré-inflamatório”, sendo que estas alterações vasculares são ligeiramente menores do que as encontradas no joelho ipsilateral (KELLY; DUNHAM; DONADSON, 2007). No entanto, neste estudo a articulação contralateral não apresentou alteração.

Shan et al (2007), demonstrou, em modelos de monoartrite, que a articulação contralateral não apresentou alteração quando comparada a ipsilateral. Assim, os dados do nosso trabalho confirmam os obtidos por Shan et al (2007), uma vez que não foi observada qualquer alteração no joelho contralateral dos animais submetidos à inflamação induzida pelo CFA. De fato, os animais não apresentaram alodínia na pata ou nocicepção nas avaliações comportamentais no membro contralateral, e nem foram evidenciados edema ou alterações histológicas. A contradição presente quando comparamos dados da literatura com nosso trabalho pode ser devido a diferenças metodológicas, de materiais ou animais utilizados nas pesquisas.

No presente estudo, foram analisados possíveis efeitos antialodínico, antinociceptivo e anti-edematogênico da diacereína, no modelo de OA de joelho, induzido por CFA. A fim de verificar se a diacereína seria capaz de inibir ou reduzir os sintomas causados pelo CFA, a diacereína foi administrada via oral, uma vez ao dia, por um período de até 19 dias consecutivos. Durante este período os animais foram avaliados pelo filamento Von Frey (alodínia mecânica), acetona (alodínia térmica), vocalização causada pela extensão passiva do membro e escore de dor espontânea (nocicepção), além da avaliação do diâmetro articular por paquímetro (edema).

Dessa forma, é importante salientar que a dor é um sintoma muito prevalente na OA e está relacionada à inflamação dos tecidos adjacentes como cápsula articular, ligamentos, membrana sinovial e osso subcondral. Geralmente piora no decorrer do dia, principalmente nas articulações que sustentam o peso do corpo, como o joelho, interferindo de forma significativa nas atividades da vida diária (MARQUES; KONDO, 1998). Em geral, um fármaco que seja capaz de reduzir ou inibir a dor na OA pode vir, assim, a proporcionar uma melhor qualidade de vida e bem estar ao indivíduo.

Estudos clínicos evidenciam que a diacereína gera alívio da dor articular em indivíduos com OA, comparável ao observado com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), e esse alívio persiste após a interrupção do tratamento. Além disso, os indivíduos que utilizam a diacereína utilizam uma quantidade reduzida de AINEs e/ou analgésicos, requerem menos cuidados médicos e têm uma melhora na qualidade de vida quando comparado aos fármacos clássicos utilizadas para OA (AVOUAC, 2002; PROVVEDINI; COHEN, 2002). Porém em alguns estudos, com outros modelos de artrite, a diacereína não apresentou ação antinociceptiva, sugerindo que esta droga pode ser efetiva no alívio da dor em algumas patologias e, ineficaz em outras (BRESSAN, 2005).

Neste trabalho verificou-se que a diacereína foi capaz de inibir a alodínia mecânica induzida pelo CFA em ratos, desde o primeiro até o décimo nono dia de tratamento, quando foram encerradas as avaliações. O grupo tratado com diacereína foi comparado ao grupo controle (CFA i.a.), que apresentou alodínia mecânica por todo o período de avaliação. Quintão (2005) demonstrou que a diacereína foi capaz de inibir a alodínia mecânica induzida pela injeção intraplantar de CFA em camundongos, de forma semelhante à gabapentina (utilizada no tratamento de dor neuropática), sem causar tolerância. Diante disto, sugere-se que a diacereína possa atuar em mecanismos centrais da transmissão da dor.

Na presente pesquisa a diacereína apresentou a partir do sexto dia de avaliação efeito antialodínico significativo 24 horas após o tratamento, mostrando que após poucos dias de administração, com apenas uma dose diária de 30 mg/kg, foi capaz de inibir a alodínia por um período prolongado (dados não mostrados). Adicionalmente, a diacereína foi capaz de inibir totalmente a alodínia ao frio induzida por acetona na pata, a partir do quinto dia de avaliação e tratamento, permanecendo a inibição até o décimo sétimo dia quando o CFA já não mais induziu alodínia ao frio no grupo controle.

Outros achados importantes estão presentes no trabalho de Filho (2003), que demonstrou, ao utilizar um modelo de dor neuropática por avulsão do tronco inferior do plexo braquial de ratos (modelo que causa alodínia nas patas posteriores dos animais), que a diacereína foi capaz de inibir totalmente a hiperalgesia mecânica e alodínia ao frio. Além disso, alguns estudos que avaliam hiperalgesia térmica indicam que neurônios sensoriais (fibras C) desempenham papel fundamental em modelos de monoartrite (COMBE; BRANWELL; FIEL, 2004).



Neste sentido, a dor no joelho e quadril são as principais causas de dificuldade para caminhar e subir escadas entre os idosos na Europa e nos Estados Unidos. Mais de 40% das pessoas acima de 65 anos no Reino Unido sofrem dos sintomas associados à OA de joelho ou quadril (DUNLOP et al., 2001; DAWSON et al., 2004). Assim como dificuldade em caminhar, o indivíduo com OA também apresenta limitação do movimento. Isto ocorre devido à rigidez articular o que dificulta a extensão do membro afetado, bem como o apoio do membro no solo, principalmente em articulações que fazem suporte de peso (MARQUES & KONDO, 1998).

A fim de analisar se o mesmo padrão ocorre no modelo animal de OA utilizado no presente estudo, foi realizada avaliação da extensão passiva do membro, utilizando uma escala de dor espontânea para avaliar a nocicepção causada pelo CFA e o possível efeito antinociceptivo da diacereína (30 mg/kg). Assim, pode se observar que ao estender a articulação do animal, esta se apresentava rígida, no padrão da OA, e os animais respondem com vocalização audível indicativo da presença de nocicepção. Nesta avaliação, os animais controle, que receberam CFA (i.a. e salina v.o.), responderam positivamente até o décimo quarto dia de avaliação. Os animais que foram tratados com diacereína (30 mg/kg, v.o.) também responderam positivamente até o décimo primeiro dia após a injeção de CFA no joelho. Contudo, apesar de diferente significativamente do grupo que recebeu salina i.a., o grupo tratado com o fármaco também foi diferente estatisticamente do grupo controle. Ou seja, a diacereína foi capaz de reduzir a nocicepção causada pela movimentação passiva do membro afetado com OA.

No presente estudo observou-se também se o animal mantinha o apoio total do membro inferior que teve OA induzida pelo CFA. Assim, os nossos dados demonstram que os animais controle (CFA i.a. mais salina v.o.) permaneceram sem apoio total do membro até o décimo oitavo dia após a injeção de CFA, segundo o escore de dor espontânea. Enquanto que os animais tratados com diacereína apoiaram o membro de forma semelhante ao grupo salina i.a., a partir do sétimo dia de avaliação. Neste sentido, após o sétimo dia de tratamento, a diacereína foi capaz de inibir a dor espontânea causada pelo CFA.

A diacereína foi descrita como uma droga de ação lenta, com efeitos modificadores de sintomas da OA que aparecem em média quatro semanas após o início do tratamento (LINGETTI et al., 1982; MARCOLONGO et al., 1988). Ao

contrário do observado no presente estudo, onde sua eficácia foi imediata ou após poucos dias de tratamento.

O primeiro sinal morfológico da cartilagem na OA é o edema das zonas superficial e média da matriz extracelular (GADNER; SALTER; OATES, 1997). Esse edema expande a matriz cartilaginosa, estirando e afinando a malha fibrosa da zona superficial (HWANG et al., 1992), resultando em amolecimento da cartilagem.

No presente trabalho foi observado que a administração i.a de CFA, 24 horas depois, foi capaz de desenvolver edema na articulação do joelho (medido pelo diâmetro articular) que permaneceu por todo o período da avaliação. Estes resultados estão de acordo com outros autores que demonstraram que o CFA induz edema articular tanto em ratos quanto em camundongos (KEEBLE, 2005; LEVY et al., 2006). Assim, pode-se demonstrar que a diacereína foi capaz de inibir significativamente o edema (em mm) a partir do quinto e perdurando até o décimo quarto dia de tratamento.

Segundo Bressan (2005), a diacereína inibe o edema articular induzido pelo LPS, de maneira semelhante ao observado em modelos de artrite autoimune. Adicionalmente, experimentos utilizando modelos de inflamação aguda e crônica e de artrite em ratos demonstraram que a diacereína foi capaz de impedir o desenvolvimento de artrite, inibir o edema e prevenir a perda óssea, apresentando assim, propriedades farmacológicas, em parte, distintas das observadas com o uso de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais clássicos (TAMURA; OHMORI, 2001; TAMURA et al., 2002).

De fato, estudos descritos na literatura sugerem que a diacereína pode inibir a atividade da IL-1 $\beta$ , uma citocina importante na destruição da cartilagem articular (VAN DE LOO; VAN DEN BERG, 1990; YARON et al., 1999; MOLDOVAN et al., 2000), reforçando os possíveis efeitos deste fármaco na prevenção dos danos articulares que se desenvolvem na artrite reativa. Como são raros os estudos sobre a eficácia da diacereína na artrite reativa, o presente estudo contribui para o conhecimento de alguns dos possíveis efeitos desta terapia nesta doença, contudo ainda não esclarece totalmente o seu mecanismo de ação.

Estudos em ratos transgênicos para o TNF- $\alpha$ , que desenvolvem doença artrítica inflamatória crônica, também apontam os efeitos benéficos da diacereína no alívio dos sintomas clínicos de doenças artríticas, na redução da destruição da cartilagem, no grau de sinovite e na erosão óssea, sugerindo potencial efeito

terapêutico da diacereína em pacientes com artrite (DOUNI et al., 2004). Outros trabalhos demonstram que a diacereína é mais potente que o metotrexato (DMARD), mas não tão efetiva quanto à dexametasona ou os agentes anti-TNF $\alpha$  na supressão da evolução da artrite mediada por TNF- $\alpha$  (DOUNI et al., 2004).

Dados da literatura também demonstram que a diacereína suprime, *in vitro*, a síntese de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$ , por tecidos sinoviais e cartilagem de pacientes com OA (YARON; SHIRAZI; YARON, 1999; Moldovan et al., 2000). Já Tamura et al. (1999) demonstrou que a diacereína apresenta efeito de proteção articular contra o desenvolvimento de poliartrite espontânea em camundongos, o que revela sua utilidade no tratamento de doenças articulares inflamatórias crônicas. Além disso, a diacereína apresenta ação inibitória sobre a migração de macrófagos para o exsudato peritoneal e reduz a atividade fagocítica destas células, em modelo de peritonite induzida por tioglicolato (MIAN et al., 1989).

O dano na OA é localizado inicial e mais intensamente nas estruturas articulares sujeitas a sobrecarga mecânica máxima. A reação a isso varia topograficamente em amplitude e duração, dependendo da articulação e de domínios de matriz dentro de cada articulação. A reação à injúria é caracterizada por edema, seguido de destruição e reabsorção de tecidos com subsequente regeneração proliferativa de células. Isto resulta em hiperplasia particularmente de condrócitos na cartilagem articular e remodelação da matriz extracelular. Esta remodelação resulta em hipertrofia e distorção arquitetônica da articulação (PRITZKER, 2003).

A OA apresenta perda de cartilagem irregularmente distribuída, esclerose de osso subcondral, cistos subcondrais, osteófitos marginais, aumento do fluxo sanguíneo metafisário, variável inflamação sinovial, fragmentação da superfície cartilaginosa, proliferação de condrócitos, fendas verticais na cartilagem, variável deposição de cristais, remodelação, e ocasional violação da linha limítrofe entre cartilagem e osso subcondral por vasos sanguíneos, formação de osteófitos, e mais tarde pela perda total de cartilagem, esclerose e osteonecrose focal do osso subcondral (BRANDT; MANKIN; SHULMAN, 1986). Levy e colaboradores (2006) demonstraram que o CFA injetado na cavidade sinovial do joelho de ratos, após 28 dias de uma única injeção de CFA, provocou dano na cartilagem articular.

Neste trabalho pode-se observar que o CFA (i.a. no joelho) após três dias induziu inflamação, derrame articular e alterações na membrana sinovial, que foram

reduzidos com o tratamento com diacereína (30 mg/kg, v.o.). Após 15 dias da indução da OA no joelho foi possível observar a presença de expressiva inflamação intra-articular e periarticular, que se estendeu até músculos da região e também acentuada degradação da cartilagem articular. Entretanto, os animais tratados com diacereína apresentaram inflamação nos tecidos conjuntivos periarticulares, além de inflamação intra-articular, mas sem dano na cartilagem.

A última avaliação foi realizada 23 dias após a injeção de CFA, onde os animais apresentaram inflamação intra-articular, periarticular e na própria cartilagem, com aspectos de degeneração, além de apresentarem grande número de macrófagos na região. No entanto, os animais tratados com diacereína apresentaram discreta inflamação periarticular e intra-articular, sem comprometimento da cartilagem ou qualquer outra estrutura. Assim, pode-se sugerir que a diacereína, na dose de 30 mg/kg, foi capaz de inibir os danos na cartilagem e reduzir a inflamação em modelo experimental de OA monoarticular induzida pelo CFA injetado no espaço sinovial do joelho de ratos.

Alguns autores relatam que a dor na OA pode ser originária dessas alterações presentes na articulação, dos vários tecidos envolvidos, desde o osso, a membrana sinovial, cápsula e outras estruturas adjacentes, como o músculo. A cartilagem lesada libera resíduos no líquido sinovial que provocam reação sinovial, inflamação e dor; a adesão de cristais de vários tipos à cartilagem danificada também gera reação inflamatória local originária de dor. Com o aumento da quantidade do líquido sinovial pode haver distensão da cápsula articular e provocar dor. O osso subcondral é diretamente relacionado à dor na osteoartrite. As terminações nervosas no osso liberam substâncias, por exemplo, substância P em resposta à injúria local e isquemia. Além disso, osteófitos podem causar dor através da distensão direta do perióstio. A distensão de estruturas ligamentares e capsulares no perióstio podem causar dor, assim como também espasmos musculares podem acrescentar maior intensidade ao quadro doloroso articular (ALTMAN; LOSADA, 2003).

Dados clínicos mostram que na dor articular o efeito analgésico da diacereína, após 4 a 6 semanas de uso, é análogo ao obtido com o uso de anti-inflamatórios não esteroidais, este efeito analgésico pode persistir por algum tempo após a conclusão do tratamento. No tratamento de dores persistentes ou crônicas, que necessitam de uso prolongado, a diacereína poderia ser uma excelente opção

terapêutica devido à segurança e tolerabilidade no seu uso, o que dificilmente é encontrado em outras drogas (DOUGADOS, 2001; PROVVEDINI; COHEN, 2002). A diacereína parece exercer efeitos inibitórios sobre a IL-1 $\beta$  (MOLDOVAN et al., 2000; TAMURA et al., 2002; PROVVEDINI; COHEN, 2002; AVOUAC, 2002), mas os seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente elucidados. Sabe-se que a IL-1 $\beta$  pode aumentar a produção de óxido nítrico, e que a diacereína pode, em concentrações terapêuticas, diminuir a produção desta citocina (PELLETIER et al., 1998; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS 1999). A IL-1 $\beta$  também está implicada na modulação da sensibilidade da dor, e na estimulação da síntese de diferentes mediadores inflamatórios, como PGE<sub>2</sub> e TNF- $\alpha$  (WOLF et al., 2003).

Deste modo, além da redução da dor, os efeitos da diacereína podem também proteger dos danos articulares. Felisaz e colaboradores (1999) indicaram que o efeito condroprotetor da diacereína, assim como o efeito sobre os níveis de IL-1 $\beta$  está relacionado com a expressão de TGF $\beta$ 1, que reduziria a produção de IL-1 $\beta$  e TGF $\beta$ 2, que amplificaria o efeito do TGF $\beta$ 1 (PUJOL et al., 2000). Contudo, ainda são necessários mais estudos para a confirmação dos mecanismos pelo qual essa substância atua, bem como determinar sua efetividade e toxicidade no tratamento da OA.

## 6 CONCLUSÃO

Os dados presentes neste trabalho permitem concluir:

1. O modelo de OA monoarticular (joelho), induzida pela injeção de CFA, foi capaz de reproduzir sintomas característicos da doença, bem como provocar alterações morfológicas na articulação;

2. A diacereína (30 mg/kg), administrada em ratos (v.o.) diariamente, foi capaz de inibir a alodínia (mecânica e térmica) induzida pela injeção de CFA no espaço sinovial da articulação do joelho;

3. A diacereína na dose de 30 mg/kg (v.o.) diariamente, por até 19 dias, foi capaz de inibir a nocicepção espontânea induzida pela injeção de CFA em ratos;

4. A diacereína (30 mg/kg, v.o.), também foi capaz de reduzir o edema no modelo de monoartrite induzido pela injeção de CFA em ratos;

5. A diacereína reduziu o dano na cartilagem articular, membrana sinovial e osso da articulação do joelho de ratos que tiveram CFA injetado no espaço sinovial da articulação do joelho.

Em síntese, os nossos dados demonstram que a diacereína foi capaz de reduzir as alterações comportamentais (alodínia mecânica e térmica, dor espontânea e edema) e histológicas (alterações morfológicas na articulação do joelho), induzida pela injeção de CFA na cavidade articular do joelho. Contudo, ainda são necessários estudos adicionais para entender seu mecanismo de ação e possíveis efeitos tóxicos da diacereína.

## REFERÊNCIAS

- ADAMI, S.; BORTOLOTTI, R.; GUARRERA, G.; MARINI, G.; et al. Diacetylrhein in the treatment of degenerative arthropathies. **Clin Ter.** v. 112, p. 439-443, 1985.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.** v. 1000, p. 40-56, 2004.
- ALTMAN, R.; ASCH, E.; BLOCH, D.; BOLE, G.; et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of The American Rheumatism Association. **Arthritis Rheum.** v. 29, p. 1039-1049, 1986.
- ALTMAN, R.; LOZADA, C. J. Osteoarthritis and related disorders: clinical features. In: HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J.; SMOLEN, J. S.; WEINBLAT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Reumatology**. 3. ed. v. 2, London: Mosby, 2003.
- AL-ZAHRANI, K. S.; BAKHEIT, A. M. O. A study of the characteristics of patients with chronic osteoarthritis of the knee. **Disabil Rehabil.** v. 24, p. 275-280, 2002.
- ANANDARAJAH, A.P.; RITCHLIN, C.T. Treatment update on spondyloarthropathy. From NSAIDs and DMARDs to anti-TNF-alpha agents. **Postgrad Med.** v. 116, p. 31-36, 2004.
- ARANTES, P. M. M. **Análise da cinemática e do padrão de ativação muscular da marcha de idosas assintomáticas e com osteoartrite de joelhos.** 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Curso de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
- ATTUR, M.G.; DAVE, M.; AKAMATSU, M.; KATOH, M.; et al. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 10, p. 1-4, 2002. Erratum in: **Osteoarthritis Cartilage.** v. 11, p. 706, 2003.
- AVOUAC, B. Current medical possibilities in the treatment of arthrosis. **Presse Med.** v. 31, p. 5-6, 2002.
- AWOUTERS, F.; DE PROOST, L.M.; LENAERTS, F.M.; LENAERTS, P.M.; et al. A new apparatus for measuring diameter changes of the rat paw and tibiotarsal joint. **Arzneimittelforschung.** v. 26, p. 37-40, 1976.
- BENDELE, A.; MCCOMB, J.; GOULD, T.; MCABEE, T.; et al. Animal models of arthritis: relevance to human disease. **Toxicol Pathol.** v. 27, p.134–142, 1999.
- BERDAH, L.; BONO, I.; BODINIER, M.C. Effets du metabolite actif de la diacérheine sur la production d' IL1 $\beta$  par les monocytes humains en culture. **Rev Rhum.** v. 60, p. 678, 1993.

BESSON, J.M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**. v. 53, p. 1-9, 1997.

BOITTIN, M.; REDINI, F.; LOYAU, G.; PUJOL, J.P. Effect of diacerhein (ART 50) on the matrix synthesis and collagenase secretion by cultured joint chondrocytes in rabbits. **Rev Rhum Ed Fr**. v. 60, p. 68S-76S. 1993.

BORTOLANZA, L.B.; FERREIRA, J.; HESS, S.C.; DELLE MONACHE, F.; et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **Eur J Pharmacol**. v. 25, p. 203– 208, 2002.

BORNIN, M.; CHAMBAT, P. **Osteoarthritis of knee: surgical treatment**. Springer: France, 2008.

BRANDT, K. D.; MANKIN, H. J.; SHULMAN, L. E. Workshop on etiopathogenesis of osteoarthritis. **J Rheumatol**. v. 13, p. 1126-1160, 1986.

BRANDT, K. D. Pain, synovitis, and articular cartilage changes in osteoarthritis. **Semin Arthritis Rheum**. v. 18, p. 77-80, 1980.

BRANDT, K. D.; SMITH, G.; KANG, S. Y.; MYERS, S.; et al. Effects of diacerhein in an accelerated canine model of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 5, p. 438-449, 1997.

BRANDT, K.; DOHERTY, M.; LOHMANDER, L. S. Introduction the concept of osteoarthritis as failure of diarthrodial joint. In: BRANDT, K. D.; DOHERTY, M.; LOHMANDER, L. S., editors. **Osteoarthritis**. 2. ed. v. 2, New York: Oxford University, 2003.

BRAUN, J.; SIEPER J. Therapy of ankylosing spondylitis and other spondyloarthritides: established medical treatment, anti-TNF-alpha therapy and other novel approaches. **Arthritis Res**. v. 4, p. 307-321, 2002.

BRESSAN, E. **Comparação do efeito de fármacos antiartríticos e anticorpos anti-citocinas na artrite reativa ao Ips em ratos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pósgraduação em Farmacologia Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

BRESSAN, E.; CUNHA, F. Q.; TONUSSI, C. R. ontribution of TNFalpha, IL-1beta and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. **Cytokine**. v. 36, p. 83-89, 2006.

BUCHANAN, W. W.; KEAN, W. F. Osteoarthritis. I. Epidemiological risk factors and historical considerations. **Inflammopharmacology**. v. 10, p. 5–21, 2002a.

BUCHANAN, W. W.; KEAN, W. F. Osteoarthritis. II. Pathology and pathogenesis. **Inflammopharmacology**. v. 10, p. 19–48, 2002b.

BUCKWALTER, J. A.; SALTZMAN, C.; BROWN, T. The impact of osteoarthritis: implications for research. **Clin Orthop Relat Res**. v. 427, p. 6-15, 2004.



BURGESS, P.R.; PERL, E.R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **J Physiol.** v. 190, p. 541-562, 1967.

BURR, D. B. The importance of subchondral bone in the progression of osteoarthritis. **J. Rheumatol.** v. 70, p. 77-88, 2004.

BUTLER, S.H.; GODEFROY, F.; BESSON, J.M.; WEIL-FUGAZZA, J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. **Pain.** v. 48, p. 73–81, 1992.

CAMARGOS, F.F.O.; LANA, D.M.; DIAS, R.C.; DIAS, J.M.D. Estudo da propriocepção e desempenho funcional em idosos com osteoartrite de joelhos. **Rev Bras Fis.** v. 8, p. 1-7, 2004.

CARGNIN-FERREIRA, E.; SARAQUETE, C. **Histofisiologia de moluscos bivalvos marinos.** CSIC: Madrid, 2008.

CARLTON, S.M.; ZHOU, S.; COGGESHALL, R.E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. **Brain Res.** v. 790, p. 160-169, 1998.

CARRABBA, M.; MELE, G.; CHEVALLARD, M.; ANGELINI, M. Diacerein: an original approach in the treatment of degenerative and/or extra-articular rheumatism. **Minerva Med.** v. 78, p. 179-185, 1987.

CHAO, E. Y.; INOUE, N. Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. **Eur. Cell. Mater.** v. 6, p. 72-84, 2003.

CHAPMAN, C.R.; GRAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet.** v. 353, p. 2233-2237, 1999.

CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. (eds) **Textbook of pain.** Churchill Livingstone: Edinburgo. p.183-214, 1999.

CREAMER, P.; HOCHBERG, M.C. **Osteoarthritis Lancet.** v. 350, p. 503-508, 1997.

CREAMER, P.; LETHBRIDGE- CEJKU, M.; HOCHBERG, M. C. Where does the hurt? Pain localization in osteoarthritis of the knee. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 6, p. 318-323, 1998.

CREAMER, P.; LETHBRIDGE- CEJKU, M.; HOCHBERG, M. C. Factors associated with functional impairment in symptomatic knee osteoarthritis. **Rheumatology.** v. 39, p. 490-496, 2000.

COIMBRA, I.B.; PASTOR, E.H.; GREVE, J.M.D.; PUCCINELLI, M.L.C. et al. – Consenso brasileiro para tratamento da osteoartrite (artrose). **Rev Bras Reumatol.** v.42, 2002.

COMBE, R.; BRAMWELL, S.; FIELD, M. J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? **Neuroscience Letters.** v. 370, p. 236–240, 2004.

COSTELLO, J.C.; HALVERSON, P.B. A new era in rheumatoid arthritis treatment. **W.M.J.** v. 102, p. 29-33, 2003.

- CURATOLO, M.; BOGDUK, N. Pharmacologic Pain Treatment of Musculoskeletal Disorders: Current Perspectives and Future Prospects. **The Clinical Journal of Pain**. v. 17, p. 25-32, 2001.
- DAWSON, J.; LINSELL, L.; ZONDERVAN, K.; ROSE, P.; et al. Epidemiology of hip and knee pain and its impact on overall health status in older adults. **Rheumatology**. v. 43, p. 497-504, 2004.
- DE FILIPPIS, L.; GULLI, A.; CALIRI, C.; ROMANO, F.; et al. Epidemiologia e fattori di rischio dell'osteoartrosi: review della letteratura e dati dal progetto OASIS. **Reumatismo**. v. 56, p. 169-184, 2004.
- DEL ROSSO, M.; FIBBI, G.; MAGNELLI, L.; PUCCI, M.; et al. Modulation of urokinase receptors on human synovial cells and osteoarthritic chondrocytes by diacetylrhein. **Int J Tissue React**. v. 12, p. 91-100, 1990.
- DENNISON, E.; COOPER, C. Osteoarthritis: epidemiology and classification. In: HOCHBERG, M. C.; SILMAN, A. J.; SMOLEN, J. S.; WEINBLAT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Reumatology**. 3. ed. v. 2, London: Mosby, 2003.
- DIAS, R. C.; DIAS, J. M.; RAMOS, L. R. Impact of an exercise and walking protocol on the quality of life of the elderly with osteoarthritis of the knee. **Physiother Res Int**. v. 8, p. 121-130, 2003.
- DINARELLO, C.A. Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. **Curr Opin Pharmacol**. v. 4, p. 378-385, 2004 .
- DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Can J Physiol Pharmacol**. v. 75, p. 704-712, 1997.
- DOEGE, K. J.; SASAKI, M.; KIMURA, T.; YAMADA, Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. **J Biol Chem**. v. 266, p. 894-902, 1991.
- DOUGADOS, M.; NGUYEN, M.; BERDAH, L.; MAZIERES, B.; et al. Investigators Study Group. Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year, placebo-controlled trial. Evaluation of the chondromodulating effect of diacerein in OA of the hip. **Arthritis Rheum**. v. 44, p. 2539-2547, 2001.
- DOUNI, E.; SFIKAKIS, P.P.; HARALAMBOUS, S.; FERNANDES, P.; KOLLIAS, G. Attenuation of inflammatory polyarthritis in TNF transgenic mice by diacerein: comparative analysis with dexamethasone, methotrexate and anti-TNF protocols. **Arthritis Res Ther**. v. 6, p. R65-R72, 2004.
- DOZIN, B.; MALPELI, M.; CAMARDELLA, L.; CANCEDDA, R.; et al. Response of Young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects. **Mat Biol**. v. 21, p. 449-459, 2002.
- DUNLOP, D.D.; MANHEIM, L.M.; SONG, J.; CHANG, R.W. Arthritis prevalence and activity limitations in older adults. **Arthritis Rheum**. v. 44. p. 212-221, 2001.

ETTINGER, W. H.; AFABLE, R. F. Physical disability from knee osteoarthritis: the role of exercise as an intervention. **Med Sci Sports Exerc.** v. 26, p. 1435-1440, 1994.

FELISAZ, N.; BOUMEDIENE, K.; GHAYOR, C.; HERROUIN, J.; et al. Stimulating effect of diacerein on TGF- $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 expression in articular chondrocytes culture with and without interleukin-1. **Osteoart Cart.** v. 7, p. 255-267, 1999.

FELSON, DT. Osteoarthritis new insights. Part 1: the disease and its risk factors. **Ann Intern Med.** v. 133, p. 637-639, 2000.

FILHO, G. B.; PITTELLA, J. E. H.; PEREIRA, F. E. L.; BAMBIRRA, E. A.; et al. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** v. 2, p. 691-713, 2000.

FILHO, R. R. Estudo **farmacológico de um novo modelo de dor neuropática: avulsão do tronco inferior do plexo braquial de rato**. 2003. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

FISHER, N.M.; GRESHAM, G.E.; ABRAMS, M.; HICKS, J.; et al. Quantitative effects of physical therapy on muscular and functional performance in subjects with osteoarthritis of the knees. **Arch Phys Med Rehabil.** v. 74, p. 840-847, 1993.

FISHER, N.M.; PENDERGAST, D.R. Effects of a muscle exercise program on exercise capacity in subjects with osteoarthritis. **Arch Phys Med Rehabil.** v. 75, p. 792-797, 1994.

FLATTERSA, S. J.L.; BENNETT, G. J. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. **Pain.** v. 109. p. 150–16, 2004.

FRONTERA, R.W., DAWSON, D.M., SLOVIK, D.M. **Exercício físico e reabilitação**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bull.** v. 48, p. 129-141, 1999.

GADNER, D.L.; SALTER, D.M.; OATES, K. Advances in the microscopy of osteoarthritis. **Microsc Res Tech.** v. 37, p. 245-270, 1997.

GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biol Res Nurs.** v. 7, p. 297-312, 2006.

GOLDENBERG, M.M. Leflunomide, a novel immunomodulator for the treatment of active rheumatoid arthritis. **Clin Ther.** v. 21, p. 1837-1852, 1999.

GOPALKRISHAN, P.; SLUKA, K. A. Effect of Varying Frequency, Intensity, and Pulse Duration of Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation on Primary Hyperalgesia in Inflamed Rats. **Arch Phys Med Rehabil.** v. 81, p. 984-90, 2000.

GROSS, J.; LAPIERE, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Nat Acad Sci USA.** v. 48, p. 1014-1022, 1962.

- GUILAK, F.; MOW, V. C. The mechanical environment of the chondrocytes: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. **J. Biomech.** v. 33, p. 1663-1673, 2000.
- GUZMAN, R.E.; EVANS, M.G.; BOVE, S.; MORENKO, B.; et al. Monoiodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: Animal model of osteoarthritis. **Toxicol Pathol.** v. 31, p. 619-624, 2003.
- HEINEGARD, D.; OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. **FASEB.** v. 3, p. 2042-2051, 1989.
- HINTON, R.; MOODY, R.L.; DAVIS, A.W.; THOMAS, S.F. Osteoarthritis: diagnosis and therapeutic considerations. **Am. Family Physicians.** v. 65, p. 841-848. 2002.
- HOCHBERG, M. C.; LAWRENCE, R. C.; EVERETT, D. F.; CORNONI-HUNTLEY, J. Epidemiology associations of pain in osteoarthritis of knee: data from the National health and Nutrition Examination Survey and the National health and Nutrition Examination I: epidemiologic follow-up survey. **Semin. Arthritis Rheum.** v. 18, p. 4-9, 1989.
- HWA, S.Y.; BURKHARDT, D.; LITTLE, C.; GHOSH, P. The effects of orally administered diacerein on cartilage and subchondral bone in an ovine model of osteoarthritis. **J Rheumatol.** v. 28, p. 825-834, 2001.
- HWANG, W.S.; LI, B.; JIN, L.H.; NGO, K.; et al. Collagen fibril structure of normal, aging, and osteoarthritic cartilage. **J Pathol.** v. 167, p. 425-433, 1992.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** v. 413, p. 203-210, 2001.
- KARSENTY, G. An aggrecanase and osteoarthritis. **N Engl J Méd.** v. 353, p. 522-523, 2005.
- KAUFMAN, K.R.; HUGHES, C.; MORREY, B.F.; MORREY, M.; et al. Gait characteristics of patients with knee osteoarthritis. **J Biomechanics.** v. 34, p. 907-915, 2001.
- KAY, A.G.; GRIFFITHS, L.G.; VOLANS, G.N.; GRAHANE, R. Preliminary experience with diacetylrhein in the treatment of osteoarthritis. **Curr Med Res Opin.** v. 6, p. 548-551, 1980.
- KEEBLE, J.; RUSSELL, F.; CURTIS, B.; STARR, A. Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 in the Vascular and Hyperalgesic Components of Joint Inflammation. **Er ARTHRITIS & RHEUMATISM.** v. 52, p. 3248-3256, 2005.
- KELLY, S.; DUNHAM, J. P.; DONALDSON, L. F. Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation. **European Journal of Neuroscience.** v. 26, p. 935-942, 2007.
- KEUTTNER, K.; GOLDBERG, V. M. **Osteoarthritic disorders.** In: ROSEMONT, I. L. American Academy of Orthopedic Surgeons, 1995.

KOBAYASHI, K.; MISHIMA, H.; HASHIMOTO, S.; GOOMER, R.S.; et al. Chondrocyte apoptosis and regional differential expression of nitric oxide in the medial meniscus following partial meniscectomy. **J Orthop Res.** v. 19, p. 802-808, 2001.

KOBAYASHI, K.; IMAIZUMI, R.; SUMICHIKA, H.; TANAKA, H.; et al. Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. **J Vet Med Sci.** v. 65, p. 1195-1199, 2003.

KRANE, S. M. Some molecular mechanisms of glucocorticoid action. **Br J Rheumatol.** v. 32, Suppl 2, p.3-5, 1993.

KRAUS, V.B. Pathogenesis and treatment of osteoarthritis. **Medical Clinics of North America.** v. 81, p. 85-112, 1997.

LASHINA, N.I.U.; SOLOV'EV, S.K.; BALABANOVA, R.M. Treatment with megadoses of dexaven (dexamethasone) versus methypred (6-methylprednisolone) of patients with rheumatoid arthritis. **Ter Arkh.** v. 72, p. 28-31, 2000.

LA VILLA, G.; MARRA, F.; LAFFI, G.; BELLI, B.; et al. Effects of rhein on renal arachidonic acid metabolism and renal function in patients with congestive heart failure. **Eur J Clin Pharmacol.** v. 37, p. 1-5, 1989.

LAWRENCE, R.C.; HELMICK, C.G.; ARNETT, F.C.; et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. **Arthritis Rheum.** v. 41, p. 778-799, 1998.

LEBLAN, D.; CHANTRE, P.; FOURNIE, B. Harpagophytum procumbens in the treatment of knee and hiposteoarthritis. Four-month results of a prospective, multicenter, double-blind trial versus diacerhein. **Joint Bone Spine.** v. 67, p. 462-467, 2000.

LEVY, A. SA.; SIMON, O.; SHELLY, J.; GARDENER, M. 6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete Freund's adjuvant. **BMC Pharmacol.** v. 1, p. 6-12, 2006.

LINGETTI, M.; D'AMBROSIO, P.L.; DI GREZIA; SORRENTINO, P. A controlled study in the treatment of osteoarthritis with diacetylrhein (arthrodar). **Curr Ther Res.** v. 31, p. 408-412, 1982.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet.** v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOESER, R. F. Jr. Aging and the etiopathogenesis and treatment of osteoarthritis. **Reum Dis Clin North Am.** v. 26, p. 547-587, 2000.

LOHMANDER, L.S. What can we do about osteoarthritis? **Arthritis Res.** v.2, p. 95-100, 2000.

LOUTHRENOO, W.; NILGANUWONG, S.; AKSARANUGRAHA, S.; ASAVATANABODEE, P.; et al. The efficacy and safety of diacerein in the treatment of painful osteoarthritis of the knee. A randomized, multicentre, doubleblind,

piroxicam-controlled, parallel-group, phase III study. In: **11° Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress**. v. 11, Jeju Island: Korea, 2004.

LU, Y.; MCNEARNEY, T. A.; WILSON, S. P.; YEOMANS, D. C.; WESTLUND, K. N. Joint capsule treatment with enkephalin-encoding hsv-1 recombinant vector reduces inflammatory damage and behavioural sequelae in rat cfa monoarthritis. **European Journal of Neuroscience**. v. 27, p. 1153–1165, 2008.

MAINI, R.N.; TAYLOR, P.C.; PALEOLOG, E.; CHARLES, P.; et al. Anti-tumour necrosis factor specific antibody (infliximab) treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v. 58, Suppl 1, p. 156-160, 1999.

MANKIN, H. J.; BRANDT, K. D.; SHULMAN, L. E. Workshop on etiopathogenesis of osteoarthritis: proceeding and recommendation. **J. Rheumatol**. v. 13, p. 1130-1160, 1986.

MAO, J. J. Stem-cell-driven regeneration of sinovial joints. **Biol. Cell**. v. 197, p. 289-301, 2005.

MARCOLONGO, R.; FIORAVANTI, A.; ADAMI, S.; TOZZI, E.; et al. Efficacy and tolerability of diacerhein in the treatment of osteoarthrosis. **Curr Ther Res**. v. 43, p. 878-87, 1988.

MARQUES, A. P.; KONDO, A. A fisioterapia na osteoartrose: uma revisão da literatura. **Rev. Bras. Reumatol**. v. 38, p. 83-90, 1998.

MARTEL-PELLETIER, J.; MINEAU, F.; JOLICOEUR, F.C.; CLOUTIER, J.M.; et al. In vitro effects of diacerhein and rhein on interleukin 1 and tumor necrosis factor- alpha systems in human osteoarthritic synovium and chondrocytes. **J Rheumatol**. v. 25, p. 753-62, 1998.

MAROUDAS, A.; BAYLISS, M. T.; UCHITEL-KAUSHANSKY, N.; SCHNEIDERMAN, R.; et al. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. **Arch Biochem Biophys**. v. 350, p. 61-71, 1998.

MAROUDAS, A.; PALLA, G.; GILAY, E. Racemization of aspartic acid in human cartilage. **Connect Tissue Res**. v. 28, p. 161-169; 1992.

MATSON, D. J.; BROOM, D. C.; CARSON, S. R.; BALDASSARI, J.; et al. Inflammation-Induced Reduction of Spontaneous Activity by Adjuvant: A Novel Model to Study the Effect of Analgesics in Rats. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 320, p. 194-201, 2007.

MAZIERES, B.; BERDAH, L.; THIECHART, M.; VIGUIER, G. Diacetylrhein on a postcontusion model of experimental osteoarthritis in the rabbit. **Rev Rhum Ed Fr**. v. 60, p. 77S-81S, 1993.

MAZZARO, C.; BOCCHIERI, E.; TESOLIN, G.F.; VENTRE, L.; et al. Clinical evaluation of diacerein in the treatment of osteoarthrosis. **Minerva Med**. v. 80, p. 1025-1027, 1989.

- MENDELL, J.R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med.** v. 348, p. 1243-1255, 2003.
- MENGSHOL, J.A.; MIX, K.S.; BRINCKERHOFF, C.E. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in arthritic diseases: bull's-eye or missing the mark? **Arthritis Rheum.** v. 46, p. 13-20, 2002.
- MESSIER, S. P. Osteoarthritis of the knee and associated factors of age and obesity: effects on gait. **Med. Sci Sports Exerc.** v. 26, p. 1446-1452, 1994.
- MIAN, M.; BRUNELLESCHI, S.; TARLI, S.; RUBINO, A.; et al. Rhein: an anthraquinone that modulates superoxide anion production from human neutrophils. **J Pharm Pharmacol.** v. 39, p. 845-7, 1987.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.** v. 57, p. 1-164, 1999.
- MIN, S.S.; HAN, J.S.; KIM, Y.I.; NA, H.S.; et al. A novel method for convenient assessment of arthritic pain in voluntarily walking rats. **Neurosci. Lett.** v. 308, p. 95-98, 2001.
- MOLDOVAN, F.; PELLETIER, J.P.; JOLICOEUR, F.C.; CLOUTIER, J.M.; et al. Diacerhein and rhein reduce the ICE-induced IL-1beta and IL-18 activation in human osteoarthritic cartilage. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 8, p. 186-196, 2000.
- MOORE, A.R.; GREENSLADE, K.J.; ALAM, C.A.; WILLOUGHBY, D.A. Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 6, p. 19-23, 1998.
- MORENKO, B.J.; BOVE, S.E.; CHEN, L.; GUZMAN, R.E.; et al. In vivo micro computed tomography of subchondral bone in the rat after intra-articular administration of monosodiumiodoacetate. **Contemp Top Lab Anim Sci.** v. 43, p. 39-43, 2004.
- MORITA, Y.; YAMAMURA, M.; KAWASHIMA, M.; AITA, T.; et al. Differential in vitro effects of IL-4, IL-10, and IL-13 on proinflammatory cytokine production and fibroblast proliferation in rheumatoid synovium. **Rheumatol Int.** v. 20, p. 49-54, 2001.
- NAKAGAWA, H.; ANDO, Y.; TAKANO, K.; SUNADA, Y. Differential production of chemokines and their role in neutrophil infiltration in rat allergic inflammation. **Int Arch Allergy Immunol.** v. 115, p. 137-143, 1998.
- NGUYEN, M.; DOUGADOS, M.; BERDAH, L.; AMOR, B. Diacerhein in the treatment of osteoarthritis of the hip. **Arthritis Rheum.** v. 37, p. 529-536, 1994.
- NGUYEN, M.; DOUGADOS, M.; BERDAH, L.; AMOR, B. Diacerhein in the treatment of osteoarthritis of the hip. **Arthritis Rheum.** v. 37, p. 359-371, 2000.
- O'REILLY, S.C.; JONES, A.; MUIR, K.R.; DOHERTY, M. Quadriceps weakness in knee osteoarthritis: the effect on pain and disability. **Ann Rheum Dis.** v. 57, p. 588-594, 1998.

PALAZZI, C.; OLIVIERI, I.; D'AMICO, E.; PENNESE, E.; et al. Management of reactive arthritis. *Expert Opin Pharmacother*. v. 5, p. 61-70, 2004.

PASERO, C.; PAICE, J.; McCAFFERY, M. Basic mechanisms underlying the causes and effects of pain. In: McCAFFERY & PASERO, C. (eds). **Pain Clinical Manual**. St. Louis, MO: Mosby, p. 15-34, 1999.

PELLETIER, J.P.; MINEAU, F.; FERNANDES, J.C.; DUVAL, N.; et al. Diacerein and rhein reduce the interleukin 1beta stimulated inducible nitric oxide synthesis level and activity while stimulating cyclooxygenase-2 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *J Rheumatol*. v. 25, p. 2417-24, 1998.

PELLETIER, J.P.; YARON, M.; HARAOU, B.; COHEN, P.; et al. Efficacy and safety of diacerein in osteoarthritis of the knee: a double-blind, placebo-controlled trial. The Diacerein Study Group. *Arthritis Rheum*. v. 43, p. 2339-2348, 2000.

PELLETIER, J.P.; LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P.; MINEAU, F.; et al. Diacerein reduces the excess synthesis of bone remodeling factors by human osteoblast cells from osteoarthritic subchondral bone. *J Rheumatol*. v. 28, p. 814-824, 2001.

PELLETIER, J. M. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthr Cart*. v. 12, Suppl A, p. S31-S33, 2003.

PETERSSON, I. F.; JACOBSSON, L. T. H. Osteoarthritis of the peripheral joints. **Best Practice and Research Clinical Rheumatology**. v. 16, p. 741-760, 2002.

PETRILLO, M.; MONTRONE, F.; ARDIZZONE, S.; CARUSO, I.; et al. Endoscopic evaluation of diacetyl-rhein-induced gastric mucosal lesion. *Curr Ther Res*. v. 49, p. 10-15, 1991.

PLEUVRY, B.J.; LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacol Ther*. v. 71, p. 313-324, 1996.

PRITZKER, K.P.H. Pathology of osteoarthritis. In: BRANDT, K.D.; DOHERTY, M.; LOHMANDER, L.S.; editors. *Osteoarthritis*. 2. ed. New York: Oxford, 2003.

PROVEDINI, D.; COHEN, P. Efficacy of diacerein on the symptoms and radiographic progression of osteoarthritis. *Presse Med*. v. 31, p.13-5, 2002.

PUJOL, J. P.; FELISAZ, N.; BOUMEDIENE, K.; GHAYOR, C.; et al. Effects of diacerein on biosynthesis activities of chondrocytes in culture. *Biorheology*. v. 37, p. 177-184, 2000.

PULITI, M.; VON HUNOLSTEIN, C.; VERWAERDE, C.; BISTONI, F.; et al. Regulatory role of interleukin-10 in experimental group B streptococcal arthritis. *Infect Immun*. v. 70, p. 2862-2868, 2002.

QUINTÃO, N. L. M. **Ação antinociceptiva da diacereína em modelos de dor inflamatória e neuropática persistentes em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pósgraduação em Farmacologia Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.



- RADOMINSKI, S.C. Obesidade e doenças músculo-esqueléticas. **Ver Bras Reumatol.** v. 38, p. 5-10, 1998.
- RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of pain.** Churchill Livingstone: Londres. p. 1-8, 1999.
- RINGSBERG, K.; GERDHEM, J. J.; OBRANT, K. J. Is there a relationship between balance, gait performance and muscular strength in 75-year-old women? **Age and Aging,** v. 28, p. 289-93, 1999.
- ROMAS, E.; SIMS, N.A.; HARDS, D.K.; LINDSAY, M.; et al. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. **Am J Pathol.** v. 161, p. 1419-1427, 2002.
- SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides.** v. 20, p. 949-956, 1999.
- SCHAIBLE, H.G.; EBERSBERGER, A.; VON BANCHET, G.S. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann N Y Acad Sci.** v. 966, p. 343-354, 2002.
- SHAN, S.; QI-LIANG, M. Y.; HONG, C.; TINGTING, L.; et al. Is functional state of spinal microglia involved in the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of electroacupuncture in rat model of monoarthritis? **Neurobiology of Disease.** v. 26, p. 558–568, 2007.
- SHARMA, P.K.; HOTA, D.; PANDHI, P. Biologics in rheumatoid arthritis. **J Assoc Physicians India.** v. 52, p. 231-236, 2004.
- SHELLEY, A.; CROSS, M.D. Pathophysiology of pain. **Mayo Clin Proc.** v. 69, p. 375-383, 1994.
- SMITH, M.D.; TRIANTAFILLOU, S.; PARKER, A.; YOUSSEF, P.P.; et al. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. **J Rheumatol.** v. 24, p. 365-371, 1997.
- SPECTOR, T.D.; CICUTTINI, F.; BAKER, J. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. **BMJ.** v. 312, p. 940-943, 1996.
- SPENCER, C.M.; WILDE, M.I. Diacerein . **Drugs.** v. 53, p. 98-106, 1997.
- STATON, P. C.; WILSON, A. W.; BOUNTRA, C.; CHESSELL, I. P.; et al. Changes in dorsal root ganglion CGRP expression in a chronic inflammatory model of the rat knee joint: Differential modulation by rofecoxib and paracetamol. **Eur J Pain.** v. 11, p. 283–289, 2007.
- STEIN, A.; YASSOURIDIS, A.; SZOPKO, C.; HELMKE, K.; et al. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. **Pain.** v. 83, p. 525-532, 1999.

STEIN, C.; MILLAN, M.J.; HERZ, A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 31, p. 455-51, 1988.

TAMURA, T.; OHMORI, K.; NAKAMURA, K. Effect of diacerein on spontaneous polyarthritis in male New Zealand black/KN mice. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 7, p. 533-538, 1999.

TAMURA, T.; OHMORI, K. Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. **Eur J Pharmacol.** v. 419, p. 269-274, 2001.

TAMURA, T.; SHIRAI, T.; KOSAKA, N.; OHMORI, K.; et al. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. **Eur J Pharmacol.** v. 448, p. 81-87, 2002.

TAN, J.; BALCI, N.; SEPICI, V.; GENER, F. A. Isokinetic and isometric strenght in osteoarthrosis of the knee: a comparative study with healthy women. **Am J Phys Med Rehabil.** v. 74, p. 364-369, 1995.

TANG, F. L.; WU, D.H.; LU, Z.G.; HUANG, F.; et al. The efficacy and safety of diacerein in treatment of painful osteoarthritis of the knee. In: 11° **Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress.** v. 11. Jeju Island: Korea, 2004.

TEIXEIRA, L. F.; OLNEY, S. J. Avaliação clínica, radiológica e estudo isocinético da força muscular em pacientes idosos portadores de osteoartrite do joelho. **Rev Fisioter Univ São Paulo.** v. 2, p. 56-64, 1995.

TJØLSEN A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. (eds). **The Pharmacology of pain.** v.130/I, Springer: Verlag, Berlin. p. 1-20, 1997.

TILL, S. H.; SNAITH, M. L. Assessment, investigation, and management of acute monoarthritis. **J Accid Emerg Med.** v. 16, p. 355-361, 1999.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **Eur J Pharmacol.** v. 326, p. 61-65, 1997.

TRB pharma. **Artrodar® - diacereína.** Monografia. 2008.

VAN DE LOO, A.A.; VAN DEN BERG, W.B. Effects of murine recombinant interleukin 1 on synovial joints in mice: measurement of patellar cartilage metabolism and joint inflammation. **Ann Rheum Dis.** v. 49, p. 238-45, 1990.

WALL, P.D. Introduction to the fourth edition. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain.** Churchill Livingstone: Londres. p. 1-8, 1999.

WEINBLATT, M.E.; KEYSTONE, E.C.; FURST, D.E.; MORELAND, L.W.; et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. **Arthritis Rheum.** v. 48, p. 35-45, 2003.

WILSON, A.W.; MEDHURST, S.J.; DIXON, C.I.; BONTOFT, N.C.; et al. An animal model of chronic inflammatory pain: pharmacological and temporal differentiation from acute models. **Eur J Pain**. v. 10, p. 537-549, 2006.

WOLF, G.; YIRMIYA, R.; GOSHEN, I.; IVERFELDT, K.; et al. Impairment of interleukin-1 (IL-1) signaling reduces basal pain sensitivity in mice: genetic, pharmacological and developmental aspects. **Pain**. v. 104, p. 471-480, 2003.

WOLHEIM, F. A. Pathogenesis of osteoarthritis. In: HOCHBERG, M. C.; SMOLEN, J. S.; WEINBLATT, M.E.; WEINSMAN, M. H. **Reumatology**. 3. ed. v. 2. London: Mosby, 2003.

WONG, M.; CARTE, D. R. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. **Bone**. v. 33, p. 1-13, 2003.

WOOLF, C.J. Pain. **Neurobiol Dis**. v. 7, p. 504-510, 2000.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. **Pain**. v. 353, p. 1959-1964, 1999.

WRIGHT, A. Recent concepts in the neurophysiology of pain. **Manual Therapy**. v. 4, p. 196-202, 1999.

WYNGAARDEN, J. B.; SMITH, L. L. H.; BENNETT, J. C. **CECIL - Tratamento de medicina interna**. 19. ed. v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.

YARON, M.; SHIRAZI, I.; YARON, I. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rhein in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 7, p. 272-280, 1999.

YIN, Z.; BRAUN, J.; NEURE, L.; WU, P.; LIU, L.; et al. Crucial role of interleukin-10/interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis. **Arthritis Rheum**. v. 40, p. 1788-1797, 1997.

YU, Y. C.; KOO, S. T.; KIM, C. H.; LYU, Y.; et al. Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis. **J Neurosci Methods**. v. 30, p. 107-113, 2002.

ZACARON, K. M. A. **Estudo da co-contracção muscular em joelhos de idosos com e sem osteoartrite de joelho**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Curso de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, p. 109-110, 1983.

ZYSSET, R. K.; GUO, X. E.; HOFFLER, C. E.; MOORE, K. E.; et al. Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur. **J. Biomech**. v. 32, p. 1005-1012, 1999.

