

Lucas Zanon Mascarin

Padronização do modelo de incapacitação  
articular induzida por monoiodoacetado de  
sódio para estudo pré-clínico da  
osteoartrite

Dissertação apresentada ao programa de  
Pós Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Mestre em Farmacologia.  
Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Março de 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Mascarin, Lucas Zanon

Padronização do modelo de incapacitação articular  
induzida por monoiodoacetado de sódio para estudo pré-  
clínico da osteoartrite / Lucas Zanon Mascarin ;  
orientador, Carlos Rogério Tonussi - Florianópolis, SC,  
2015.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Dor. 3. Monoiodoacetado de sódio. 4.  
Osteoartrite. I. , Carlos Rogério Tonussi. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia. III. Título.

**"Padronização do modelo de incapacitação articular induzida por monoiodoacetato de sódio para estudo pré-clínico da osteoartrite"**

Por

**Lucas Zanon Mascarin**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (007/FMC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC, composta pelos doutores:

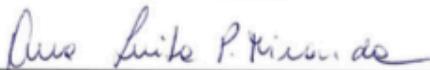
Orientador:



---

Dr(a) Carlos Rogério Tonussi (FMC/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



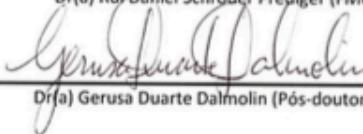
---

Dr(a) Ana Luísa Palhares de Miranda (DEFAR/Faculdade de Farmácia/UFRJ)



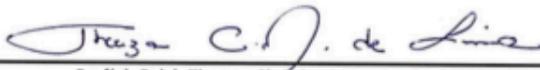
---

Dr(a) Rui Daniel Schröder Prediger (FMC/CCB/UFSC)



---

Dr(a) Gerusa Duarte Dalmolin (Pós-doutoranda PPGFMC)



---

Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima  
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 06 de março de 2015.



## **AGRADECIMENTOS**

Em especial aos meus pais Paulo R. Mascarin e Rosimeire Z. Mascarin. Pessoas sempre muito presentes em minha vida. O meu muito obrigado pelo apoio, carinho e por sempre acreditarem nos meus sonhos.

Ao professor Carlos Rogério Tonussi, por abrir as portas do laboratório e promover esse longo período de convívio e aprendizado.

Aos membros da banca pelo auxílio, experiência e os aprendizados proporcionados.

Aos meus colegas de laboratório que passaram e que contribuíram em muito com meu crescimento pessoal e profissional nesse período me proporcionando ótimas amizades. Em especial a Flora Lucena e Felipe Vanz que mais que colegas, foram grandes amigos / irmãos e companheiros, me auxiliando a cada dificuldade pessoal e profissional.

A todos meus bons e novos amigos de departamento, por toda parceria pessoal proporcionadas.

Aos professores e funcionários do departamento.

A Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

O meu muito obrigado.



*A mudança é a lei da vida. E aqueles que apenas olham para o passado ou para o presente irão com certeza perder o futuro.*  
*(John Kennedy)*



## RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma doença crônica e gradativa que acomete as articulações, resultando em sensação dolorosa e perda gradativa das funções articulares. Muitas linhas de pesquisa procuram avaliar experimentalmente as alterações nociceptivas decorrentes desta patologia. Porém, não abordam a principal complicação que é a incapacitação articular. No presente estudo a OA foi induzida por duas injeções de Monossódio Iodoacetato (MIA; 3 mg) no joelho direito de ratos separadas por um intervalo de 3 dias e a incapacitação articular foi mensurada através do tempo de elevação de pata (TEP; s) durante o período de 1 minuto de caminhada estimulada, em seções diárias. Paralelamente, a sensibilidade plantar ao teste de von Frey, bem como análise comportamental visual de sessões registradas em vídeo, foram também realizadas. O MIA evocou incapacitação por 5 dias ( $P < 0,05$ ), acompanhado de aumento do diâmetro articular (DA), enquanto o limiar de reação ao teste de von Frey persistiu baixo por 15 dias ( $P < 0,05$ ). A análise do TEP demonstrou-se válida também na avaliação de drogas clássicas para o tratamento da OA. A administração sistêmica única de Morfina (3 mg/kg) reverteu a incapacitação, porém a aplicação intratecal (37 nmol) teve um efeito mais duradouro ( $P < 0,05$ ). Administração sistêmica de Diclofenaco, reverteu a incapacitação por 24 horas aproximadamente (10 e 30 mg/kg). Nenhum dos tratamentos foram efetivos em diminuir o DA. Esses resultados sugerem que o teste de incapacitação articular é eficaz na mensuração da ação de medicamentos neste aspecto da lesão articular evocada pelo MIA.

Palavra-chave: Osteoartrite, monoiodoacetato de sódio, Dor



## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a chronic and gradual disease that affects the joints, resulting in soreness and gradual loss of joint function. Many lines of research aimed to experimentally evaluate the nociceptive alterations in such condition, however, they usually do not address the main complication that is the articular incapacitation. In the present study OA was induced by two injections, 3 days apart, of monosodium iodoacetate (MIA; 3 mg) in the right knee-joint of rats, and the incapacitation was measured by the paw elevation time (TEP; s) in daily sessions of 1-min periods of stimulated walk. In parallel, the ipsilateral plantar sensitivity to Von Frey test, and a visual behavioral analysis of recorded sessions, were also held. MIA evoked incapacitation over 5 days ( $P < 0.05$ ), accompanied by increase in the joint diameter (DA) while a low threshold response to Von Frey testing persisted for 15 days ( $P < 0.05$ ). The analysis of PET showed to be sensitive for evaluating classic drugs for the treatment of OA. A single systemic administration of morphine (3 mg / kg) reversed the incapacitation, but intrathecal injection (37 nmoles) had a longer lasting effect ( $P < 0.05$ ). Furthermore, systemic administration of diclofenac was able to reverse the incapacitation for approximately 24 hours (10 and 30 mg / kg). None of the treatments were effective in reducing the DA. These results suggest that the incapacitation test can be an effective way to evaluate the effects of drugs in this aspect of joint damage evoked by the MIA.

Keyword: Osteoarthritis, monoiodoacetato de sódio, pain,



## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 1.1</b> Radiografia representativa da articulação de joelho humano com OA .....	7
<b>Fig. 1.2</b> Esquema farmacoterapêutico para o tratamento da OA baseado na diretriz da ORSI .....	9
<b>Fig. 1.3</b> Mecanismo de ação do monossódio iodoacetato .....	15
<b>Fig. 3.1</b> Imagem ilustrativa do teste de incapacitação articular...	21
<b>Fig. 3.2</b> Imagem ilustrativa da mensuração do edema articular..	22
<b>Fig. 3.3</b> Imagem ilustrativa do equipamento de Von Frey .....	24
<b>Fig. 3.4</b> Imagem ilustrativa da caixa de observação comportamental .....	25
<b>Fig. 3.5</b> Esquema ilustrativo do protocolo experimental.....	26
<b>Fig. 4.1</b> Efeito nociceptivo, dose e tempo dependente induzido pela administração de MIA intra-articular (3 e 4.8 mg/i.a.) .....	28
<b>Fig. 4.2</b> Efeito nociceptivo, dose e tempo dependente induzido pela administração de MIA intra-articular em doses altas (8 e 10 mg/i.a.) .....	30
<b>Fig. 4.3</b> Efeito nociceptivo de múltiplas administrações de MIA na incapacitação e no edema articular .....	32
<b>Fig. 4.4</b> Variabilidade do tempo de elevação de pata mediante uma e duas administrações de MIA 3 mg/ i.a.....	35
<b>Fig. 4.5</b> Efeito da administração de morfina sobre efeitos nociceptivos induzidos por uma ou duas administrações de MIA 3 mg/i.a.....	36
<b>Fig. 4.6</b> Efeito da administração de diclofenaco intraperitoneal sobre efeitos nociceptivos induzidos por uma ou duas administrações de MIA 3 mg/i.a.....	38
<b>Fig. 4.7</b> Efeito da administração de morfina intratecal sobre efeitos nociceptivos induzidos por uma ou duas administrações de MIA 3 mg/i.a.....	40



## LISTA DE ABREVIATURAS

TEP	– Tempo de Elevação de Pata
OA	– Osteoartrite
DA	– Diâmetro articular
I.A.	– injeção intra-articular
I.T.	– Injeção Intratecal
AINEs	– Anti-inflamatório não Esteroidal
COX	– Enzima Ciclooxigenase
MIA	– Monossódio iodoacetato
Morf	– Morfina
Diclof	– Diclofenaco
Snc	– Sistema- Sistema Nervoso Central
Man	– Nervo Articular Medial
Pan	– Nervo Articular Posterior



# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Dor e nociceção</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Articulação do joelho</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Disfunções articulares</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4 Osteoartrite</b> .....	<b>5</b>
<b>1.5 Farmacoterapia para Osteoartrite</b> .....	<b>8</b>
1.5.1 Anti-inflamatório não-esteroidal.....	10
1.5.2 Opioides.....	11
<b>1.6 Estudo da dor na Osteoartrite</b> .....	<b>12</b>
<b>1.7 Monossódio Iodoacetato</b> .....	<b>13</b>
<b>2. Objetivos:</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Material e Métodos</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Animais</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 Drogas:</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3 Modelo experimental de OA induzido pelo Iodoacetato de sódio</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 Testes comportamentais</b> .....	<b>20</b>
3.4.1 Teste de Incapacitação Articular.....	20
3.4.2 Mensuração do edema articular.....	21
3.4.3 Teste de Von Frey.....	22
3.4.4 Teste comportamental de dor espontânea.....	24
3.4.6 Análise Estatística.....	25
<b>3.5 Protocolo experimental</b> .....	<b>26</b>
<b>4. Resultados</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 Efeito nociceptivo induzido pelo MIA intra-articular em doses baixas na incapacitação articular e em demais parâmetros de nociceção</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2 Efeito nociceptivo induzido pelo MIA intra-articular em doses altas na incapacitação articular e em demais parâmetros de nociceção</b> .....	<b>29</b>

4.3 Efeito nociceptivo de múltiplas administrações intra-articulares de MIA em diferentes doses e tempos.....	31
4.4 Resumo experimental para escolha da dose efetiva de MIA nos estudos agudos e subcrônicos na incapacitação articular. ....	34
4.5 Análise da variabilidade do TEP com a utilização de duas administrações de MIA .....	35
4.6 Avaliação dos efeitos mediados pela administração sistêmica de Morfina sobre os comportamentos induzidos pelo MIA intra-articular.....	36
4.7 Avaliação dos efeitos mediados pela administração sistêmica de Diclofenaco sobre os comportamentos induzidos pelo MIA intra-articular .....	38
4.7 Avaliação dos efeitos mediados pela administração intratecal de Morfina sobre os comportamentos induzido pelo MIA intra-articular.....	40
5. Discussão .....	43
6. Conclusão.....	51
7. Referências Bibliográficas .....	53

## 1. Introdução

### 1.1 Dor e nociceção

Uma definição para o estado de dor pode ser consideravelmente subjetiva apesar deste ser um dos sintomas mais presentes na prática clínica, com a importante característica de atuar como um alerta contra ataques à integridade do organismo, através de mecanismos que envolvem vias reflexas espinhais e supra-espinhais (JULIUS; BASBAUM, 2001; DRAY; URBAN; DICKENSON, 1994)..

De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), o termo "dor" não consiste na definição mais adequada quando tratado em estudos com animais. Para tanto usa-se o termo nociceção, uma vez que dor é uma experiência subjetiva e de difícil determinação. A definição de dor consiste em "uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão real ou potencial" (IASP, 2012). Essa afirmação implica que a dor possui um aspecto multidimensional tendo em vista a existência de componentes sensoriais, motivacionais, autonômicos e motores (CRAIG, 2003).

A percepção de estímulos sensoriais periféricos, nocivos ou não, é transmitida por fibras nervosas sensoriais primárias, as quais foram primeiramente identificadas e nomeadas como nociceptores, por Sherrington em 1906. Essas fibras possuem a capacidade de serem ativadas por diversas modalidades de estímulos, como pressão, distensão ou traumas, substâncias químicas, pH ácido, ou calor e frio (JULIUS; BASBAUM, 2001). A ativação de nociceptores, transformam esse estímulo em impulso nervoso, sendo então transmitidos ao Sistema Nervoso Central ("IASP," 2012; LOESER; MELZACK, 1999).

O fator subjetivo da dor se revela no momento em que a transmissão de estímulos nociceptivos passa a ser modulada positiva ou negativamente, por fatores emocionais, sociais, ambientais e cognitivos (CRAIG, 2003). Disso resulta que nem todo estímulo periférico com intensidade capaz de ativar um nociceptores, venha evocar um episódio doloroso. A nociceção,

por outro lado, se refere apenas à percepção objetiva da atividade evocada em nociceptores presentes na região estimulada (LOESER; TREEDE, 2008). Essas definições não podem ser confundidas, uma vez que elas podem ocorrer de maneira independente, inclusive.

O nociceptores, caracterizados por fibras sensoriais do tipo A $\delta$  e C, quando estimulados desencadeiam um potencial de ação gerando uma despolarização do terminal nervoso. A informação nociceptiva segue da periferia até a medula espinhal, fazendo sinapse nas lâminas superficiais I e II do corno dorsal e, também, a lâmina V, mais profunda. A ativação das fibras A $\delta$  e C ativam neurônios de segunda ordem por meio da liberação de neurotransmissores excitatórios no corno dorsal da medula espinhal como o glutamato, substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (WILLIS, 1999). Por sua vez ativando neurônios de segunda ordem, a informação nociceptiva é enviada para núcleos supraespinhais.

Em condições não patológicas, um nociceptor necessita de um estímulo de alta intensidade para promover uma resposta. Quando o estímulo necessário para promover ativação dos nociceptores é menor do que em condições normais para causar a mesma percepção nociceptiva, caracteriza-se o fenômeno de hiperalgesia. Esta pode ainda, ser classificada em primária e secundária. A hiperalgesia primária se refere ao aumento da sensibilidade nociceptiva que ocorre em uma área de lesão. Já a hiperalgesia secundária ocorre em tecidos íntegros adjacentes ou distantes do ponto da lesão, porém como evento associado à lesão. A hiperalgesia secundária ocorre devido a sensibilização central, com o aumento do campo receptivo de neurônios espinhais, ou pela sensibilização periférica, devido a liberação antidrômica de neuropeptídeos, serotonina, bradicinina, entre outros (JULIUS; BASBAUM, 2001; WILLIS, 1999).

## **1.2 Articulação do joelho**

A articulação de joelho de roedores e humanos apresentam muitas semelhanças entre si. Ambas apresentam anatomia caracterizada por uma porção fêmuro-tibial, com a presença de uma porção fêmuro-patelar, formando uma

articulação sinovial (HILDEBRAND et al., 1991). Essa é parcialmente dividida pelo menisco entre as estruturas articulares, que possuem sua sustentação determinada por ligamentos e músculos e não pela porção óssea (FITZGERALD, 1987).

Semelhante a outras espécies de mamíferos como cachorro, gato e macaco, o rato apresenta estruturas ligamentares fibrocartilaginosas, que consistem no menisco medial e lateral, além de bolsas sinoviais que, juntas, possuem a funcionalidade de absorção de impacto. Juntamente a essas estruturas, estão presentes os ligamentos intracapsulares, discriminados como ligamentos cruzados e ligamentos laterais, presentes no interior da cápsula articular (HILDEBRAND et al., 1991; LANGFORD; SCHMIDT, 1983).

A articulação sinovial forma um compartimento fechado por um tecido fibroso denominado como cápsula articular. Esta tem como maior finalidade o isolamento e proteção dos ligamentos articulares, quando presentes, bem como a contenção do líquido sinovial de lubrificação (WIELAND et al., 2005).

Internamente, a cápsula articular é revestida por uma camada de tecido conjuntivo constituído basicamente por células do tipo fibroblastos, os sinoviócitos B, entremeado por macrófagos, os sinoviócitos A. O líquido sinovial produzido por essa camada celular é translúcido e viscoso, com elevado teor de ácido hialurônico e glicoproteínas (HILDEBRAND et al., 1991). A lubrificação gerada pelo ácido hialurônico melhora o desempenho das estruturas articulares. Além disso, o líquido possui um importante papel nutritivo, realizando o transporte de nutrientes entre a cartilagem articular avascular e o sangue dos capilares presentes na membrana sinovial (HILDEBRAND et al., 1991; SOUZA-SILVA, 2009; VONSY, 2008).

A cartilagem articular não possui inervação e vascularização, sendo composta por células de condroblastos, condrócitos e condroclastos, além de fibras colágenas tipo II, presente em substância fundamentalmente amorfa, onde ocorre o armazenamento e a excreção do ácido hialurônico (VONSY, 2008).

A inervação articular de joelhos de ratos é composta basicamente por dois nervos principais, o nervo articular medial e

o nervo articular posterior, MAN e PAN respectivamente. O nervo posterior apresenta a maior concentração de nociceptores. Em média, o nervo posterior de ratos apresenta 400 fibras nociceptoras, com aproximadamente 80% dessas constituídas de fibras não mielinizadas, em proporções similares ao nervo medial (HILDEBRAND et al., 1991). Em comparação a outras espécies, como o gato, observa-se em média 1200 fibras aferentes primárias com proporção entre mielinizadas e não-mielinizadas similares àquelas do rato. No entanto, avaliando a distribuição peso/volume corpóreo do animal, nota-se que os roedores apresentam uma densidade de aferentes primários muito superior (HILDEBRAND et al., 1991; LANGFORD; SCHMIDT, 1983; LAURSEN et al., 1997).

### **1.3 Disfunções articulares**

As disfunções musculoesquelética enquadram-se dentre os acometimentos mais problemáticos para os indivíduos, sistema de saúde e assistência social. Sendo a causa mais frequente de incapacitação no último século e, com previsão de crescimento para as próximas décadas (WHO, 2003).

Essas disfunções estão entre as mais comuns causas de dor a longo prazo acometendo centenas de milhares de pessoas pelo mundo. Isso tem como agravante o efeito psicossocial, que afeta não apenas o paciente, como também sua família e sua carreira profissional (OMS). Tais disfunções possuem como característica a prevalência pela população adulta, a qual sofre em reflexo das limitações funcionais acometidas e na qualidade de vida. Estudos em cooperação com a organização mundial de saúde na última década demonstraram que nas populações norte americana, canadense e europeia, exista uma prevalência em deficiência física decorrente de disfunções musculoesqueléticas estimada em 5% de toda população adulta (REZENDE; CAMPOS; PAILO, 2013; ROSIS; MASSABKI; KAIRALLA, 2010).

O constante surgimento de novos casos se resume basicamente por dois motivos bem caracterizados. O primeiro é fisiológico e o segundo relacionado à expansão populacional. O fator fisiológico é uma resposta mal adaptada a esforços físicos inadequados, sobrepeso e sedentarismo. O segundo fator

refere-se ao aumento da expectativa média de vida, o que vem aumentando a população de indivíduos idosos.

Dentre as diversas patologias associadas, as disfunções musculoesqueléticas correspondentes às articulações ocupam a maior parcela. Estima-se que a osteoartrite (OA), distúrbio articular degenerativo mais comum dentre as afecções articulares, acometerá ao menos uma articulação em mais de 90% da população acima dos sessenta anos (ROSIS; MASSABKI; KAIRALLA, 2010; SHANE ANDERSON; LOESER, 2010), tornando-se a principal causa de incapacitação dentre os idosos. A OA assintomática ocorre em aproximadamente 37% das pessoas com mais de sessenta anos (ROSIS; MASSABKI; KAIRALLA, 2010; IASP, 2009). O rápido aumento dessa patologia nos últimos anos sugere que a OA causará um forte impacto sobre o sistema público de saúde em um futuro próximo (WHO, 2003).

## 1.4 Osteoartrite

A patologia da OA envolve mudanças estruturais complexas, influenciando em todos os constituintes da cartilagem articular e as funções ósseas adjacentes, resultando em dor, rigidez e incapacidade articular (RADIN; ROSE, 1986). De maneira geral, a patologia provoca uma degradação e a perda de substâncias, tanto do conjunto cartilaginoso como ósseo, produzindo um crescimento desorganizado e de baixa funcionalidade de ambos os tecidos. Ela também mostra uma considerável dependência desses acontecimentos diante a variabilidade de cada indivíduo (BIRCHFIELD, 2001).

O maior responsável por essa perda está no processo necrótico dos condrócitos. Essas são células responsáveis pela construção e manutenção das características normais da matriz cartilaginosa da articulação, presentes na camada hialina. Na OA, a necrose dos condrócitos demonstram uma característica proliferativa transitória deste tipo celular, resultando em aumento da síntese de matriz cartilaginosa. No entanto, esse mesmo processo culmina na produção de citocinas que induzem o catabolismo celular e a inflamação. Dentre essas citocinas

observa-se a presença do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a IL-1 $\beta$  (GOLDRING, 2000).

É de conhecimento que ambas as citocinas desempenham papel na degradação da matriz cartilaginosa, através da diminuição da síntese de colágeno e de proteoglicanas específicas (AREND; DAYER, 1995; GOLDRING et al., 1996). Além da estimulação da proliferação articular desordenada, produção de prostaglandinas e pela expressão de enzimas metaloproteinases derivadas de condrócitos (LEE; WEINBLATT, 2001). As metaloproteinases são enzimas que remodelam e destroem a matriz cartilaginosa atuando primordialmente na degradação de colágeno do tipo II. Além dessa matriz, níveis elevados dessa enzima demonstram uma contribuição importante na degradação de tecido ósseo (GOLDRING, 2000; MARTEL-PELLETIER et al., 1994).

Os achados radiológicos da OA demonstram um estreitamento do espaço articular devido à perda da sua cartilagem e à remodelação do osso abaixo da superfície articular, que resulta na esclerose subcondral, na formação de cistos e de osteófitos na periferia da articulação (WIELAND et al., 2005).

A OA pode receber a classificação entre primária (ou idiopática) e secundária, sendo que a forma primária não possui uma causa conhecida para seu aparecimento, mas em diversos casos pode estar associada a fatores de riscos clássicos como envelhecimento, hereditariedade, obesidade e esforços físicos repetitivos. Já a patologia secundária está vinculada a diversos motivos como traumas, doenças reumatológicas inflamatórias, necrose óssea e até associado a doenças metabólicas e endócrinas.



**Figura 1.1 Radiografia representativa da articulação de Joelho humanos com OA.** Articulação a esquerda íntegra com a cavidade articular bem preservada e com espaçamento sinovial íntegro, sem apresentação de osteófitos. Articulação a direita com evidente instalação da OA, com a perda do espaço sinovial, contato entre as estruturas ósseas e o aparecimento de osteófitos.

Os clínicos identificam a OA como dor nas articulações, com a presença de crepitação (ruído presente no movimento articular) e movimento reduzido, mas não há bons marcadores ou critérios para a condição patológica em si. Alguns distúrbios articulares como a redução da cavidade sinovial presente no espectro da OA podem ser dolorosos, ou causar incapacidade, enquanto outros não. Assim, há problemas com os métodos diagnósticos disponíveis utilizados para determinar a existência da doença. As duas abordagens mais comuns na identificação da OA de joelho são os critérios radiográficos e os critérios sintomáticos da patologia, como citado anteriormente. De acordo com a *Sociedade Brasileira de Reumatologia*, “os achados clínicos, e não apenas os de imagem, são os que definem a melhor conduta para o tratamento da osteoartrite”.

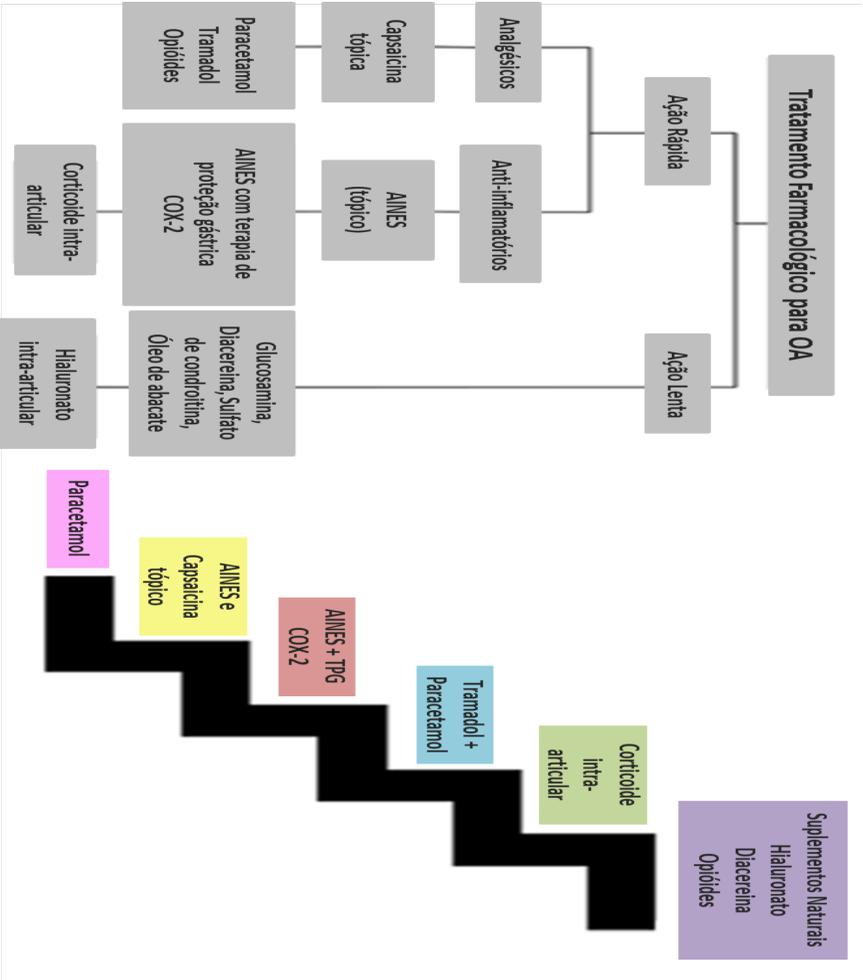
Conforme a *European League Against Rheumatism*, a melhor abordagem terapêutica para tratamento da artrite consiste em uma mescla de ações não farmacológicas, como a mudança

do estilo de vida, com a prática de exercício físico junto a tratamentos farmacológicos que englobam analgésicos, anti-inflamatórios não-esteroidais e suas associações.

## 1.5 Farmacoterapia para Osteoartrite

Diferente de outras patologias articulares, a OA não conta com os fármacos modificadores de doença, que consiste em medicamentos com enfoque de evitar a progressão e/ou o desenvolvimento da patologia. Os principais fármacos utilizados no tratamento para o combate dos sintomas apresentados, estão classificados em duas categorias: os fármacos de ação rápida contra a sintomatologia, nos quais se enquadram os analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs); e os fármacos de ação lenta, como a administração de ácido hialurônico local e o sulfato de condroitina (Figura 1.2) (BOBACZ, 2013).

De acordo com a *Osteoarthritis Research Society International* (ORSI), o fármaco de primeira escolha é paracetamol, podendo ter como suplemento a utilização tópica de capsaicina ou a utilização de AINEs orais com fatores de proteção gastrointestinal, ou utilização de agentes seletivos COX-2, com ou sem a utilização paralela de AINEs tópicos.



**Figura 1.2** Esquema farmacotêrapiutico para o tratamento da osteoartrite baseado na diretriz da ORSI. Figura adaptada de Bobacz, 2013.

No caso de ineficácia dos AINEs, recomenda-se a utilização de analgésicos orais de maior potência como Tramadol, ou associação de AINEs com opioides. Por fim, opta-se pela utilização intra-articular de corticosteroides, opioides ou ácido hialurônico.

### 1.5.1 Anti-inflamatório não-esteroidal

Os AINEs têm como mecanismo de ação terapêutica a inibição da classe de enzimas ciclooxigenase (COX), de maneira não seletiva ou atuando seletivamente na isoforma dois (COX-2), apresentando como resultado final a inibição da transformação do ácido araquidônico em prostanoídes (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

A enzima COX-1 está presente no organismo de maneira constitutiva na maioria das células, tendo como função a produção de prostanoídes, atuando como regulador homeostático. Sua inibição corresponde a efeitos específicos no organismo, a exemplo da inibição de prostaglandina presente no trato gastrointestinal, que detém a finalidade de proteção gástrica com a produção de muco e inibição da secreção de prótons, ou a inibição de tromboxano A2 presente nas plaquetas, diminuindo a capacidade de agregação plaquetária e dessa forma inibindo a formação de trombos. A isoforma COX-2, que é codificada por genes diferentes da isoforma 1, é induzida em resposta a estímulos inflamatórios sendo, portanto, responsável pela produção de prostanoídes relacionados à inflamação. Sua inibição corresponde aos efeitos anti-inflamatórios, com menor incidência de efeitos adversos (AMAGASE et al., 2014; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

Fármacos como ácido acetil salicílico, diclofenaco e ibuprofeno atuam de maneira não seletiva entre as isoformas, agindo assim sobre os sintomas da osteoartrite como bons analgésicos, e influenciando sobre efeitos pontuais na inflamação, sendo bem eficazes por via oral e atuando como auxiliar por vias tópicas. No entanto, são bem caracterizados por induzirem efeitos adversos como ulcerações gástricas pela inviabilização da produção de muco, inibição plaquetária e efeitos renais e hepáticos (AMAGASE et al., 2014).

A inibição seletiva da enzima COX-2, ocorre por fármacos conhecidos como Coxibes, como a exemplo do rofecoxibe, sulfonamidas e o mais conhecido celecoxibe. Quando comparado ao efeito analgésico e anti-inflamatório, tanto os inibidores seletivos quanto os não seletivos demonstram a mesma eficiência sobre a dor presente na osteoartrite. No entanto eles diferem consideravelmente nos efeitos adversos

demonstrados, visto que os coxibes não demonstram os efeitos gástricos dos inibidores não seletivos. Porém, estudos demonstram efeitos negativos a médio prazo sobre sistema cardiovascular visto que a inibição da prostaciclina, mas não do tromboxano A2 presente nas plaquetas, acarretam em um elevado índice tromboembólico representando maiores casos de infartos agudo do miocárdio (COCEANI et al., 2001; WEIR et al., 2003).

### 1.5.2 Opioides

O sistema opioide está presente em todo o organismo, sendo que seus receptores encontram-se expressos desde a periferia, em axônios de aferentes primários, até no Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo medula espinal e estruturas supra-espinhais, sendo caracterizado como sistema analgésico endógeno (STEIN; LANG, 2009). Os receptores opioides são denominados como  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ - opioide. Dentre os receptores, observam-se subtipos com funções diferenciadas. Os receptores  $\mu$  se diferenciam em subtipos 1 e 2, sendo relacionados com analgesia, depressão respiratória, euforia, bradicardia e dependência física ao opiáceo. A classe de receptores  $\delta$ - opioide tem a característica de modular a atividade do receptor  $\mu$ , constituindo complexos integrados. Os receptores  $\kappa$  também se diferenciam em subtipos 1 e 2, e esses atuam promovendo a analgesia, sedação, na inibição da liberação de vasopressina aumentando a diurese e efeitos psicomiméticos (MILLAN, 2002; WANG; WESSENDORF, 2001).

A nível periférico, todos os receptores opioides estão expressos em terminações nervosas sensoriais e quando ativados provocam a diminuição da excitabilidade neuronal. Substâncias endógenas atuam na ativação desses receptores e, dentre essas observa-se a presença de endorfinas, encefalinas e dinorfina, presente em células imunológicas como linfócitos, monócitos e macrófagos (STEIN; LANG, 2009). A nível central, os receptores opioides estão presentes em diferente número e funções, conforme sua localidade nas diferentes estruturas cerebrais.

Todos os três tipos de receptores opioides estão acoplados a uma proteína G inibitória. Sendo assim, em consequência da ativação e/ou da estabilização na sua forma ativa, esses receptores acarretam na abertura de canais de potássio, culminando em uma hiperpolarização, tornando-as, portanto, mais resistentes a despolarização celular, inviabilizando a abertura de canais de cálcio. Fator esse que resulta em um decréscimo da liberação de outros neurotransmissores excitatórios, diminuindo assim a ascendência do sinal nociceptivo (MILLAN, 1999).

A morfina é um opioide exógeno inespecífico. Porém com grande afinidade pelos receptores  $\mu$ , dentre seus subtipos 1 e 2, sendo um analgésico forte utilizado individualmente, ou como auxiliar a outros analgésicos, ou anti-inflamatórios. Sua administração como fármaco pode variar conforme a necessidade de ação. Eles podem ser orais, administrações subcutânea ou venosa, ou até diretamente no SNC através de administrações intratecais (MILLAN, 1999).

Apesar da boa eficácia, muitos efeitos adversos são observados como depressão respiratória, cardíaca, e a dependência, as quais podem ocorrer de maneira rápida, e os efeitos de uma abrupta interrupção do uso promovem fortes efeitos devido à abstinência. Outro fator negativo, está na presença da tolerância, que um paciente desenvolve com o uso contínuo.

## 1.6 Estudo da dor na Osteoartrite

Na OA em humanos, diversos métodos de diagnósticos que correspondem à índices de dor, imagens radiográficas e testes bioquímicos já são práticas comuns na avaliação clínica dessa patologia. No entanto, para a pesquisa em animais, tendo em vista a melhor compreensão da patologia e o desenvolvimento de novos métodos de tratamento, muitos parâmetros de estudo ainda precisam ser desenvolvidos (GUERMAZI et al., 2012). Em conhecimento que essa patologia decorre de agravantes a longo prazo, como desgaste articular natural e a utilização incorreta das articulações, (KARVONEN-

GUTIERREZ et al., 2012; MCDOUGALL, 2006), torna-se complicado reproduzir estas condições em um animal.

Algumas metodologias presentes na literatura possibilitam mimetizar características vistas em humanos, na articulação dos animais de diferentes espécies. Os estudos da OA em animais podem ser divididos entre aquela de ocorrência espontânea e as induzidas. Entre as de ocorrência espontânea, obtêm-se muitos resultados com a utilização de camundongos C57Bl/6, STR/ORT e STR/IN, que demonstram susceptibilidade para o desenvolvimento da patologia (MASON et al., 2001).

Dentre os estudos que induzem a OA, utiliza-se a desestabilização ligamentar por meio cirúrgico, com a transecção do ligamento cruzado anterior, ou a meniscectomia parcial medial ou lateral, em que parte do menisco é retirado sem decorrer de ruptura ligamentar e da deservação. Modelos de desestruturação articular resultam em uma redistribuição anormal das forças atuantes na articulação durante a ambulação e no estado de repouso do animal (HASHIMOTO et al., 2002; STOOP et al., 2000).

Outros métodos utilizam-se da administração intra-articular (i.a.) de papaína ou colagenase bacteriana, em virtude de causarem degradação da matriz cartilaginosa através de ações enzimáticas (KOPP; MEJERSJÖ; CLEMENSSON, 1983).

Mais recentemente, diversos trabalhos têm apontado o monossódio iodoacetato (MIA) como um modelo de indução de osteoartrite mais próximo à clínica, por interferir no metabolismo dos condrócitos (MCDOUGALL, 2006; MORE et al., 2013). Assim, optamos por este modelo para a realização desse trabalho.

## **1.7 Monossódio Iodoacetato**

O modelo de OA induzido pelo MIA foi descrito pela primeira vez por Kalbhen e Blum em 1977, e padronizado como modelo de OA articular em ratos por Kalbhen em 1987.

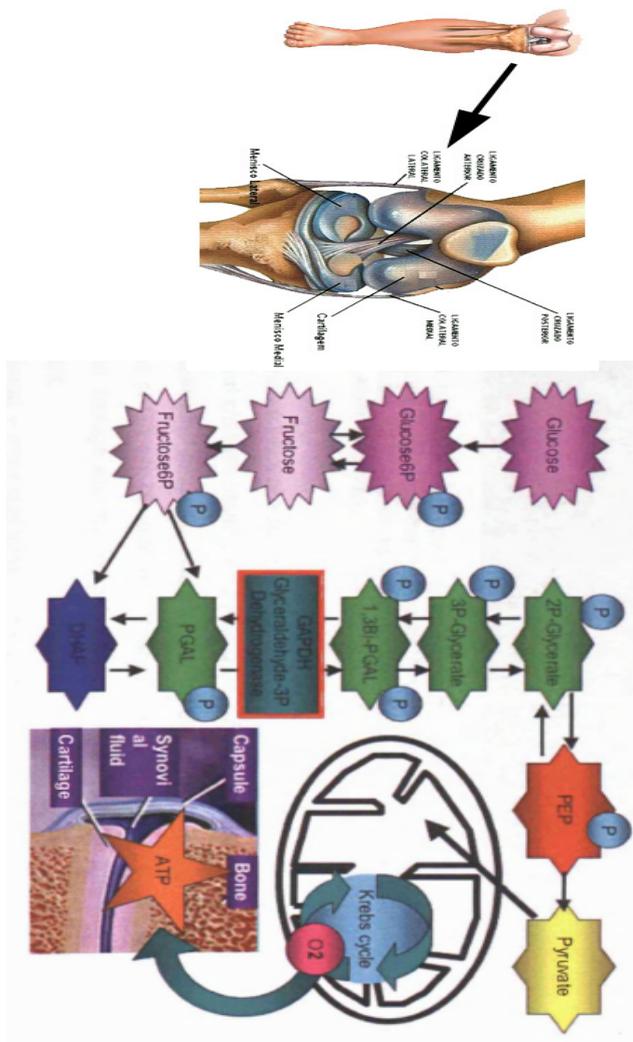
O MIA é um reagente modificante de resíduos de cisteína das proteínas, que quando administrado na articulação de animais, ocasiona a modificação nas concentrações de proteoglicanas da cartilagem articular, por levar a uma

interrupção na glicólise e assim uma quebra no metabolismo dos condrócitos, tendo como consequência a degradação da articulação.

Após administrado por via intra-articular e presente no líquido sinovial do joelho, o MIA é absorvido pelos condrócitos juntamente com nutrientes presentes no meio e dentro da célula atua inibindo a gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) presente na cascata da glicólise, culminando na inibição da produção de ATP pelo ciclo de Krebs. O ATP é a principal molécula energética para a célula, e sua falta resulta na morte celular. Os condrócitos são células responsáveis pela formação da cartilagem articular e, com a morte dessa célula, ocorre uma retração na cartilagem gerando sua degradação, levando, por fim, às características histopatológicas semelhantes a OA de humanos (GOLDRING, 2000).

A aplicação intra-articular de MIA causa uma degradação crônica da articulação, com sinais de nocicepção, sendo aparentemente mais preditivo para o estudo da OA. No entanto, no que diz respeito a dor na OA, os modelos experimentais têm privilegiado a observação do fenômeno de hiperalgesia secundária, em detrimento da nocicepção no sítio primário de lesão, que seria o sintoma de real morbidez na clínica.

Assim, objetivamos neste trabalho mostrar que o teste de Incapacitação Articular, pode ser útil para demonstrar e quantificar a nocicepção primária induzida pelo MIA e, com isso propor uma nova ferramenta de estudo da doença e possíveis novos tratamentos.



**Figura 1.3 Mecanismo de ação do Monossódio iodoacetato.** Inibição do GAPDH, culminando na diminuição do ciclo de Krebs e sequencialmente na produção de ATP, resultando na morte de condrócitos e conseqüentemente na degradação da cartilagem articular. (figura adaptada de Vonsy, 2008).



## **2. Objetivos:**

### **2.1 Objetivo Geral**

Padronização do teste de incapacitação e edema articular no modelo de Osteoartrite induzido pela administração intra-articular de MIA.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar o padrão de resposta e decurso temporal da incapacitação articular induzida por diferentes doses e regimes de administração de MIA;
- Comparar a manifestação de incapacitação articular com a manifestação de hiperalgésica secundária;
- Validar o teste de incapacitação articular com drogas clássicas para o tratamento da osteoartrite.



## 3 Material e Métodos

### 3.1 Animais

Foram utilizadas ratas *Wistar* adultas (160 – 210g), fornecidas pelo biotério central da UFSC. Os animais foram acondicionados em ambiente com ciclo claro-escuro de 12h, em temperatura de  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$  e com livre acesso à água e ração. Previamente a toda metodologia experimental, os animais foram ambientados por 1h no local experimental. Todos os processos experimentais foram conduzidos de acordo com o regimento ético da IASP (*International Association for Study of Pain*) (LOESER; TREEDE, 2008). O número de animais empregados e seus respectivos estímulos foram o mínimo necessário para demonstrar um efeito consistente dos procedimentos e tratamentos empregados. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o protocolo PP00723.

### 3.2 Drogas:

- Ácido Iodoacético sal sódico (Iodoacetato de sódio), (MIA; Sigma-Aldrich.<sup>®</sup>) Veículo: Solução Fisiológica 0,9%;
- Sulfato de Morfina (Dimorf<sup>®</sup>, Cristalia); Veículo: Solução Fisiológica 0,9%;
- Diclofenaco Sal Sódico (Sigma-aldrich<sup>®</sup>.) Veículo: Solução Fisiológica 0,9%;
- Isoflurano (Isoforine<sup>®</sup>, Cristalia).

### 3.3 Modelo experimental de OA induzido pelo Iodoacetato de sódio

O modelo de OA induzida por MIA em ratos foi inicialmente proposto por Kalbhen em 1987. Para a indução da OA, foi feita a injeção intra-articular (i.a.) do MIA no animal, cuidadosamente imobilizado com uma flanela, deixando livre o

terço inferior do abdômen. Após a imobilização, o sitio de injeção (joelho direito) foi tricotomizado e a assepsia feita com álcool iodado. A visualização do tendão patelar foi usada como referência para a injeção na cavidade sinovial. Doses de 0,5, 3, 4,8, 8 e 10 mg/ 50 µl, foram testadas. As injeções intra-articulares foram feitas utilizando agulha de 8mm/ 29 gauge, em posição perpendicular à cavidade articular. As avaliações foram realizadas no mínimo 24h após esse procedimento.

### **3.4 Testes comportamentais**

#### **3.4.1 Teste de Incapacitação Articular**

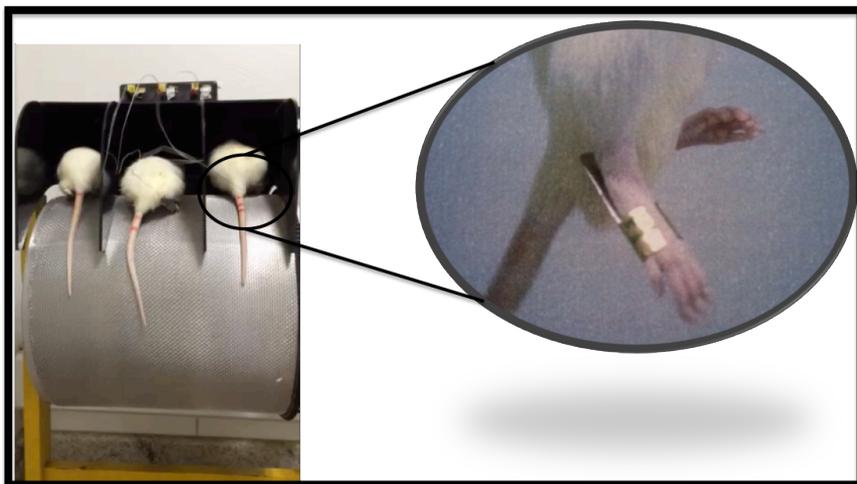
O Modelo de incapacitação articular foi descrito por Tonussi e Ferreira em 1992 e tem como objetivo a inferir a nocicepção articular a partir da avaliação da capacidade de apoio espontâneo do membro afetado, durante deambulação estimulada. O equipamento consiste em um cilindro metálico giratório de 30 cm de diâmetro, revestido por uma malha fina trançada em aço inox. O sistema de registro utiliza-se de sapatilhas metálicas confeccionadas em folhas de flandres, as quais são adaptadas cuidadosamente às patas traseiras dos animais. A sapatilha da pata direita era ligada por um fio de aço revestido à porta paralela de um microcomputador (Figura 3.2).

O animal é estimulado a deambular com o cilindro em uma rotação de 3 RPM, por seu comportamento natural de permanecer no topo. Através da análise pelo software, é possível avaliar a perda da função de apoio do membro. A avaliação é realizada através do tempo total em que a sapatilha adaptada ao membro posterior do animal deixa de fazer contato com a superfície metálica, durante um período de 60 segundos, ao que se denominou Tempo de Elevação de Pata (TEP).

O TEP de animais naïve, devidamente ambientados e treinados a deambular de maneira correta na parte superior do cilindro, varia em torno de 10 segundos, enquanto outros animais que tenham sido submetidos a administrações i.a. de substâncias algésicas apresentam uma elevação desse valor demonstrando uma incapacitação articular.

Essa ambientação e treino foram realizadas no dia anterior aos procedimentos experimentais. Os valores de TEP registrados após o treino e antes dos experimentos constitui o tempo controle dos animais e foi identificado nas figuras como dia 0.

Conforme o procedimento empregado, as avaliações foram realizadas em intervalos de horas ou dias.



**Figura 3.1** Imagem ilustrativa do teste de incapacitação articular. Aparelho para avaliação da incapacitação articular através do tempo de elevação de pata (a esquerda). Com as divisórias determinando 3 trilhas para análises simultâneas, tendo cada animal sua sapatilha da pata posterior direita ligada ao microcomputador. A direita, uma visão demonstrativa da acomodação das sapatilhas nas patas posteriores dos animais.

### 3.4.2 Mensuração do edema articular

A avaliação do edema articular induzido pelo MIA, foi realizada através do registro da variação do diâmetro articular mensurado diariamente e comparado com o valor basal antes da indução da OA. Para tal, o animal foi imobilizado gentilmente com uma flanela tendo apenas o membro posterior direito livre.

Com o auxílio de um paquímetro foram realizadas três medidas do comprimento médio-lateral do joelho, no sentido próximo-distal. Das três, a maior medida foi registrada (Figura 3.3). Todas as medidas foram feitas após cada avaliação do TEP, conforme o procedimento experimental, e a análise basal foi feita imediatamente antes da administração i.a. do MIA. Os dados são apresentados como a diferença entre cada medida registrada e o valor basal.



**Figura 3.2 Imagem ilustrativa da mensuração do edema articular.** Com a utilização de um paquímetro não digital, a articulação Fêmuro-tibial é mensurada em três posições diferentes e o maior valor determina o edema articular.

### 3.4.3 Teste de Von Frey

A hiperalgesia mecânica foi avaliada através do limiar de resposta aos filamentos de Von Frey (6-60g). O limiar de 50% de resposta foi avaliado através do método de DIXON (1980) e CHAPLAN et al. (1984).

Para uma resposta completa, o animal era submetido a seis aplicações sequenciais de filamentos de Von Frey, método conhecido como *Up and Down* (DIXON, 1980). A primeira aplicação correspondia ao filamento mediano, e os demais eram aplicados conforme a resposta do filamento anterior. Dessa

forma, em caso de resposta positiva um filamento de menor calibre era aplicado, e em caso de resposta negativa utilizava-se um calibre maior, sendo que todas as aplicações tinham um período de intervalo mínimo de 30 segundos entre elas. No caso de quatro respostas positivas ou negativas sequenciais, o teste era finalizado.

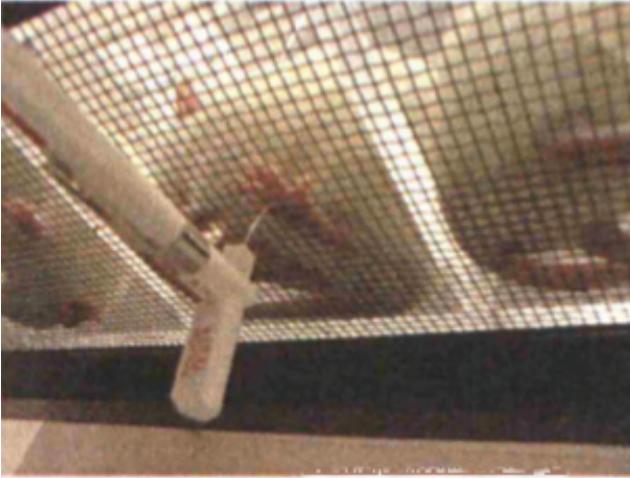
Para a realização do teste, a pata direita posterior do animal era estimulada com uma série de filamentos de Von Frey de maneira ordinal. O primeiro filamento utilizado era aquele demonstrado ser eficaz para evocar uma resposta de retirada em 50% dos animais analisados (filamento de 15g). A aplicação do filamento na face plantar da pata do animal ocorria em um período de 5 segundos. Foi considerado como um comportamento de resposta positiva a retirada de pata nesse período, ou o ato de lamber e morder da pata imediatamente após a aplicação. Havendo a deambulação do animal o teste era interrompido até a sua paralização, posicionando assim as quatro patas sobre a grade do suporte. No caso de ausência do comportamento de retirada da pata, era registrado uma resposta negativa.

O conjunto de resultados positivos/negativos sequenciados foram utilizados para obtenção do padrão de resposta (padrão numérico) (CHAPLAN et al., 1994; DIXON, 1980), o qual é utilizado para obtenção do limiar 50% de retirada de pata através da seguinte fórmula:

$$\text{Limiar } 50\%_{(g)} = 10^{(X+k\delta)}$$

Onde “X” corresponde ao valor logarítmico do último filamento de von frey (em gramas) utilizado na sequência correspondente; “k” sendo o padrão de resposta tabelado por DIXON em 1980, e “ $\delta$ ” a diferença média logarítmica entre os estímulos.

Previamente a todos os procedimentos, os animais passavam por um período de ambientação de no mínimo 30 minutos no local onde eram acomodados para a realização do teste, ou até que todos se mantivessem parados com as quatro patas.



**Figura 3.3 Imagem ilustrativa do equipamento de Von Frey.** Visto pela porção inferior do equipamento, animais com as patas estabilizadas sobre a grade recebem a estimulação por filamentos de von Frey na porção plantar da pata. O tempo máximo de aplicação foi de cinco segundos.

### **3.4.4 Teste comportamental de dor espontânea**

Para avaliação de comportamentos espontâneos de nocicepção após a estimulação com o MIA i.a., os animais foram acomodados em caixas de acrílico transparente (29x29x35 cm) com divisórias opacas para não existir contato visual entre eles e com espelhos posicionados a 45° da base da caixa para melhor visualização da porção inferior do animal. Após acomodados os animais eram vídeo-gravados durante 10 minutos em dias alternados, durante 21 dias. Os dias de registro corresponderam ao 2°, 4°, 6°, 8°, 15° e 21° dia.

A análise posterior dos vídeos avaliou dois conjuntos de parâmetros em índices temporais. O lambe e morder da pata ipsilateral ao joelho estimulado e o tempo de guarda (proteção) do membro afetado (recolhimento junto ao corpo).

Todos os animais foram ambientados e familiarizados previamente na caixa de observação durante os 30 min imediatamente anteriores a administração do MIA.



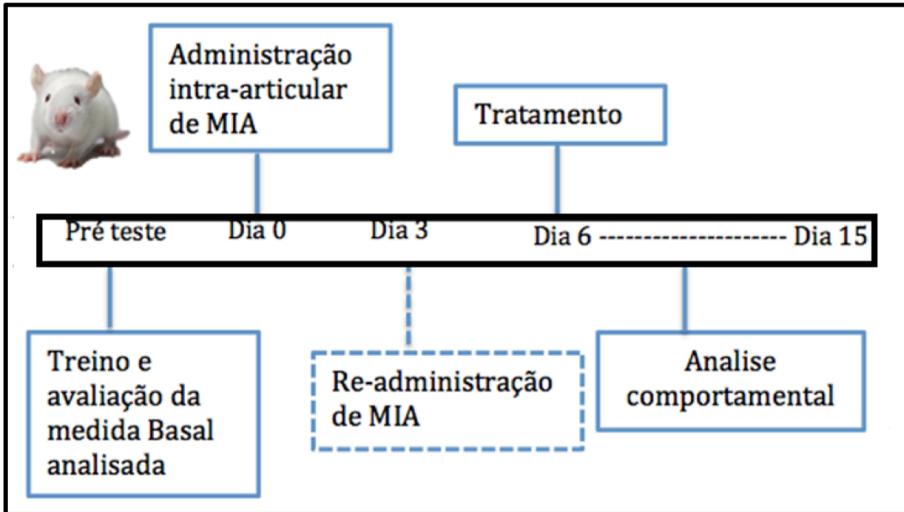
**Figura 3.4 Imagem ilustrativa da caixa de observação comportamental.** Caixa de observação utilizada para gravação de comportamentos espontâneos para dois animais simultaneamente, possuindo um espelho a 45° sob cada caixa para melhor visualização. Divisória preta opaco para separação física e visual entre os animais foi instalado entre as duas caixas.

### 3.4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do programa estatístico Statistica 7<sup>®</sup> e GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>. Para a avaliação da incapacitação articular e análise hiperalgésica por von Frey foi utilizado ANOVA de duas vias com medidas repetidas, com teste de Post-hoc Bonferroni sempre que a diferença fosse de  $p < 0,05$ . Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão, com número (n) mínimo de 8 animais.

Uma normalização foi realizada pela retirada de *outliers* (baseado do calculo em Graphpad.com). Assim, foram excluídos os animais apresentando respostas extremas, com mais de dois desvios padrão em relação à mediana.

### 3.5 Protocolo experimental



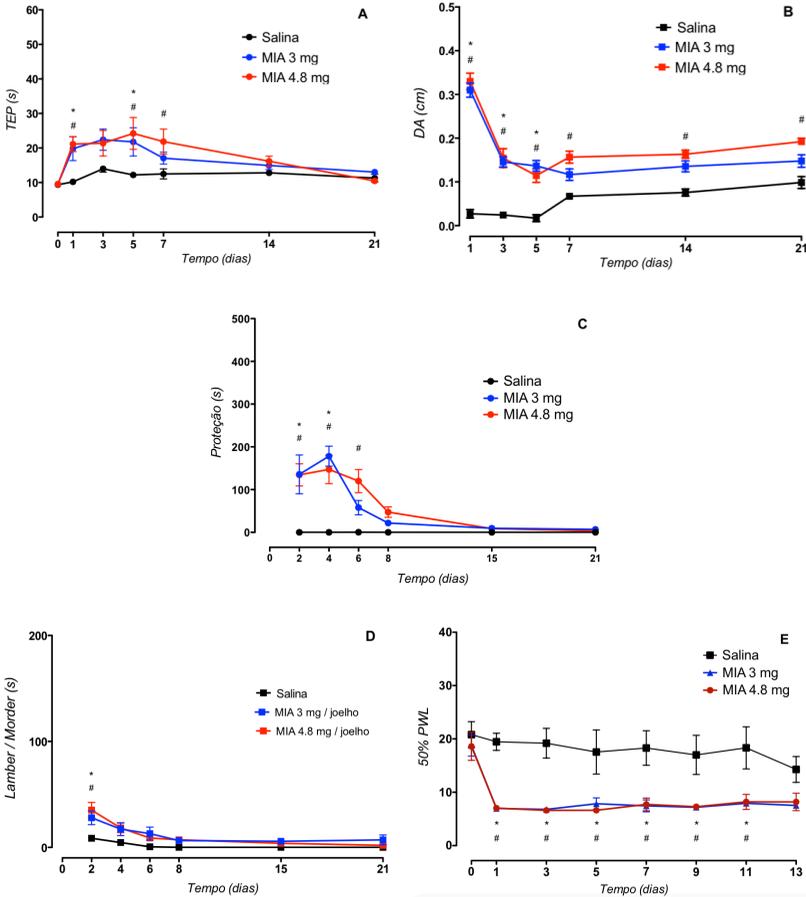
**Figura 3.5 Esquema ilustrativo do protocolo experimental.** Animais naive passaram por um período de ambientação, adaptação e treinamento, o que foi determinado como Pré-teste. Após isso, os animais receberam uma administração local (i.a.) de MIA. Conforme protocolo, o animal pode ser reexposto a uma nova administração ou não de MIA (demonstrado com caixas tracejadas). A partir do sexto dia os tratamentos farmacológicos subsequentes foram averiguados, ocorrendo em período de horas ou dias conforme protocolo.

## 4. Resultados

### 4.1 Efeito nociceptivo induzido pelo MIA intra-articular em doses baixas na incapacitação articular e em demais parâmetros de nocicepção

A primeira etapa deste estudo foi avaliar o efeito de doses de MIA usualmente reportadas na literatura, sobre a incapacitação articular em paralelo com os comportamentos espontâneos na caixa de observação e ao teste de Von Frey. Tanto a incapacitação articular quanto o edema e os comportamentos espontâneos foram analisados em dias alternados, uma vez ao dia para cada teste e, de maneira semelhante, para o teste de von Frey. As doses de MIA (3 e 4,8 mg/) ou salina (50 µl) foram administrados diretamente no joelho dos animais, 24 horas antes do início de cada teste.

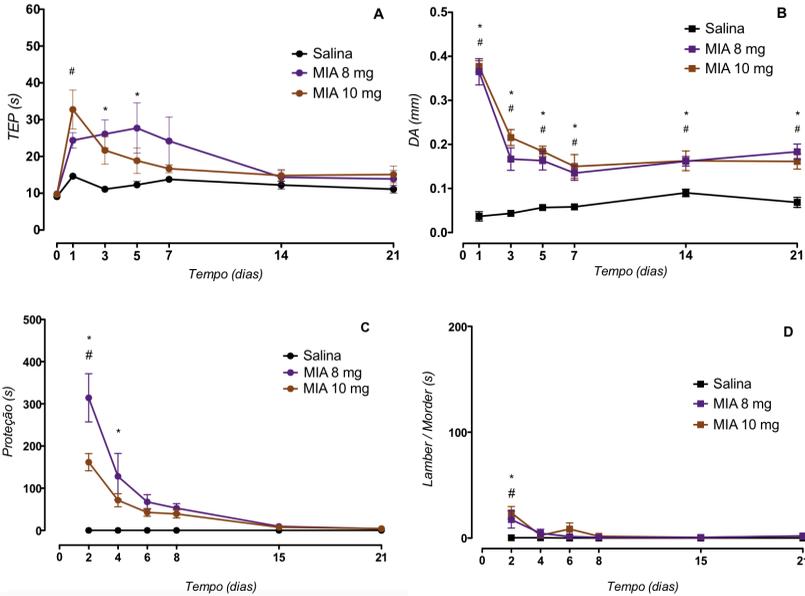
No que diz respeito a incapacitação articular, o MIA apresentou efeito hipernociceptivo inicial em ambas as doses comparado aos animais salina, dentre os dias 1 e 5 para a menor dose (3 mg/ i.a.) ( $P < 0,05$ ) e dias 1, 5 e 7 para a maior dose (4,8 mg/i.a.) ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.1 A). Em relação ao edema, observamos que ambas as doses demonstram um efeito edematogênico nos primeiros cinco dias ( $P < 0,05$ ), sendo nos demais dias observado apenas com a maior dose (4,8mg) ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.1 B). Em relação aos comportamentos espontâneos (Figura 4.1 C e D), observou-se aumento no ato de proteger o membro afetado induzido por ambas as doses nos dias 2 e 4 e até o 6<sup>o</sup> dia pela maior dose ( $P < 0,05$ ). Porém, o comportamento de morder e lamber foi induzido por ambas as doses apenas no primeiro dia. Já no teste de von Frey, ambas as doses demonstraram um efeito nociceptivo evidenciado pelo decréscimo do limiar mecânico do primeiro ao décimo primeiro dia de análise ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.1 E).



**Figura 4.1 Efeito nociceptivo, dose e tempo dependente induzido pela administração de MIA intra-articular (3 e 4.8 mg).** (A) análise da incapacitação articular expressa através do TEP em segundos, em um tempo total de 60 seg/dia. (B) Avaliação do edema articular discriminado pela diferença do diâmetro articular em centímetros. (C) e (D) representam a expressão de diferentes comportamentos espontâneos em segundos, dentre um tempo total de 10 min/dia de avaliação. (E) Discrimina a latência em % de retirada de pata no teste de von Frey. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ); (\*) significa  $P < 0,05$  para dose de 3 mg e (#)  $P < 0,05$  para 4,8 mg/joelho quando comparado ao grupo salina (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste *Post-hoc* de Bonferroni).

## **4.2 Efeito nociceptivo induzido pelo MIA intra-articular em doses altas na incapacitação articular e em demais parâmetros de nocicepção**

Em uma segunda etapa, foi analisada uma possível intensificação e a prolongação do efeito nociceptivo do MIA em doses de 8 e 10 mg/i.a. frente a doses já utilizadas. A incapacitação articular e os testes comportamentais foram avaliados em dias alternados uma única vez em cada dia. De maneira semelhante ao descrito com doses baixas, o MIA foi administrado 24 horas da primeira análise da incapacitação articular. O TEP dos animais MIA foi diferente comparados ao grupo controle ( $P < 0,05$ ) com a maior dose (10 mg). Um efeito de maior amplitude foi observado do terceiro ao quinto dia em dose inferior (8mg) ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.2 A). Em relação ao edema articular, observou-se um efeito edematogênico elevado ( $P < 0,01$ ) no primeiro dia, o qual decaiu, porém, mantendo-se diferente do controle ( $P < 0,05$ ) nos demais dias experimentais (Figura 4.2 B). A análise dos comportamentos espontâneos (Figura 4.2 C e D), mostrou um efeito nociceptivo das duas doses no primeiro dia de avaliação ( $P < 0,05$ ), com a perda de efeito de ambas as doses nos dias subsequentes.



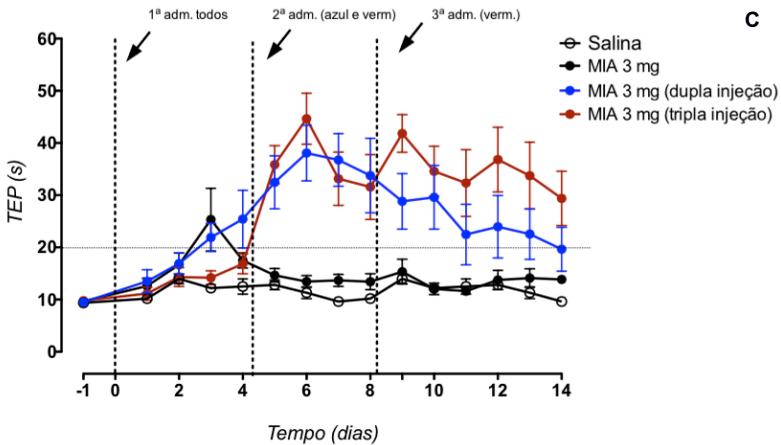
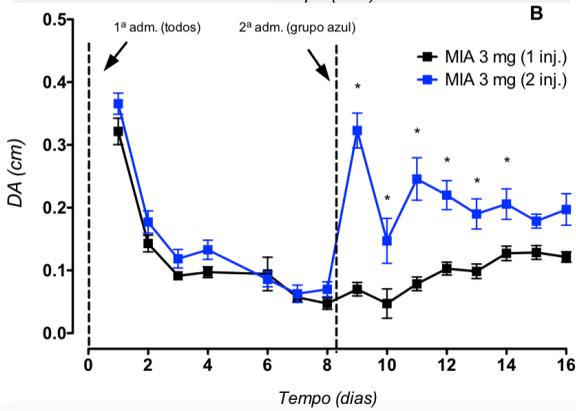
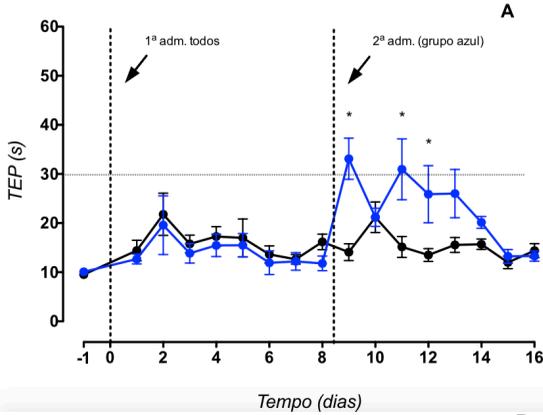
**Figura 4.2 Efeito nociceptivo, dose e tempo dependente induzido pela administração de MIA intra-articular em altas doses (8 e 10 mg).** (A) Análise da incapacitação articular expressa pelo TEP em segundos, dentre um tempo total de 60 seg/dia. (B) Avaliação do edema articular discriminado pela diferença do diâmetro articular em centímetros. (C) e (D) representam a expressão de diferentes comportamentos espontâneos em segundos, dentre um tempo total de 10 min/dia de avaliação. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ) com (\*) significando  $P < 0,05$  para dose de 8 mg e (#)  $P < 0,05$  para 10 mg/i.a. quando comparado ao grupo salina (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste *Post-hoc* de Bonferroni).

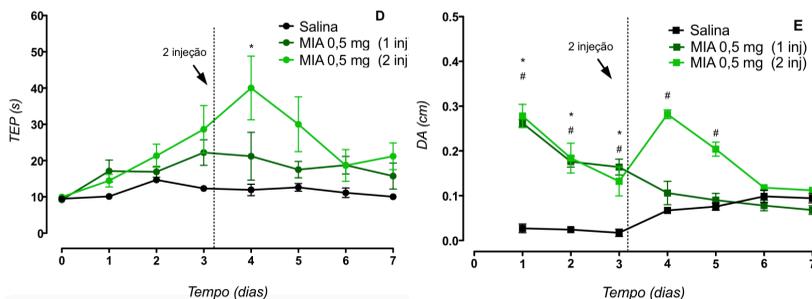
### **4.3 Efeito nociceptivo de múltiplas administrações intra-articulares de MIA em diferentes doses e tempos.**

Uma vez avaliado o efeito agudo em doses altas e baixas já utilizadas, procurou-se avaliar o efeito de múltiplas administrações de MIA na incapacitação articular.

O MIA foi administrado por via i.a. e após 8 dias a mesma dose foi re-administrada. A segunda administração induziu um novo aumento no TEP, o qual se manteve até o décimo segundo dia ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao grupo de uma única estimulação (Figura 4.3 A). Ao analisar o edema articular (Figura 4.3 B), observou-se um efeito semelhante, com uma elevação consistente no volume articular 24 horas após nova administração, persistente por 6 dias ( $P < 0,05$ ). Na presença de múltiplas injeções, onde a segunda administração de MIA passa a ser realizada no terceiro dia, e a terceira administração ocorrida no oitavo dia, observa-se um prolongamento de efeito no TEP em ambos os grupos comparado a um grupo controle (salina) ( $P < 0,05$ ). Uma terceira administração é responsável por prolongar em um dia o efeito nociceptivo demonstrado após as duas administrações anteriores (Figura 4.3 C).

Tendo-se observado efeito consistente após duas administrações de 3 mg/i.a. de MIA, procuramos avaliar as administrações duplicadas de doses sub-efetivas. A dose de 0,5 mg, administrada uma única vez não promoveu o aumento do TEP comparado ao grupo salina. Duas administrações passaram a promover incapacitação 24 horas após a segunda administração ( $P < 0,05$ ), não havendo diferença significativa nos demais dias (Figura 4.3D). Quando avaliado o edema articular, observou-se que tanto a primeira quanto a segunda administração de uma subdose de MIA causaram um efeito edematogênico nos 3 primeiros dias de avaliação, com prolongamento em dois dias após nova administração de MIA ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.3 E).





**Figura 4.3 Efeito nociceptivo de múltiplas administrações de MIA na incapacitação e no edema articular.** (A) Análise da incapacitação articular expressa pelo TEP em segundos, demonstrado com animais com 1 e 2 administrações de MIA 3 mg/i.a.. (B) Avaliação do edema articular discriminado pela diferença do diâmetro articular em centímetros. (C) Análise da incapacitação articular expressa pelo TEP em segundos, demonstrado com animais com uma, duas e três administrações MIA 3 mg/i.a. comparado ao grupo controle (salina). (D) Análise da incapacitação articular expressa pelo TEP em segundos, demonstrado com animais com uma e duas injeções de MIA 0,5 mg/i.a. comparado ao grupo controle (salina). (E) Avaliação do edema articular discriminado pela diferença do diâmetro articular em centímetros. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ) com (\*) significa  $P < 0,05$  para 2<sup>a</sup> administração e (#)  $P < 0,05$  para 3<sup>a</sup> administração (A, B, C e D), quando comparado ao grupo salina e (\*) significa  $P < 0,05$  para 1 administração e (#)  $P < 0,05$  para 2 administrações (E). A análise estatística empregada foi a ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste *Post-hoc* de Bonferroni.

#### **4.4 Resumo experimental para escolha da dose efetiva de MIA nos estudos agudos e subcrônicos na incapacitação articular.**

Uma das finalidades desse trabalho foi determinar a melhor faixa de tempo e dose de MIA, para que o modelo de OA empregado demonstre viabilidade para teste de fármacos no tratamento da OA.

Em vista dos resultados acima, optamos pela utilização de duas administrações de MIA em dose de 3 mg/i.a. nos dias zero e três. A escolha dessas doses deveu-se a estabilidade do efeito nociceptivo durante 6 dias, quando comparado ao controle (entre os dias 5 e 10). Além disso, os efeitos adicionais resultantes de uma terceira injeção não foram significantes (Figura 4.3 C).

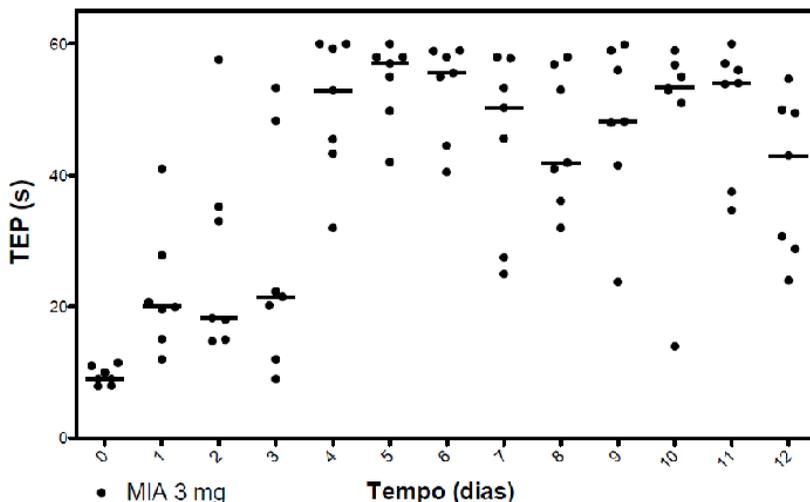
Para o teste de von Frey, no entanto, utilizamos um único estímulo intra-articular de MIA 3 mg no dia zero, tendo em vista que este já produziu um efeito máximo de hiperalgesia secundária, sobrepujando em tempo mesmo a incapacitação induzida por duas injeções de MIA.

## 4.5 Análise da variabilidade do TEP com a utilização de duas administrações de MIA

Apesar da eficiência nociceptiva obtida com duas administrações de MIA na incapacitação articular, a variabilidade de resposta observada é grande.

Plotando-se os valores individuais de TEP e a mediana, observa-se a grande variabilidade na distribuição dos dados (Figura 4.4). Tanto em animais que receberam uma única injeção (do primeiro ao terceiro dia), como em animais com duas administrações (a partir do 4 dia), observou-se valores que se situam dois desvios padrões abaixo ou acima da média. Isto nos levou a estabelecer o critério de exclusão determinado nesse estudo. Que foi o de considerar apenas os animais que apresentassem valores de TEP dentro da faixa de 2 desvios padrão da média. Além disso, convencionamos realizar os tratamentos farmacológicos a partir do 6º dia, quando o efeito máximo nociceptivo se demonstra presente.

Disparidade entre animais MIA controle 3 mg/joelho



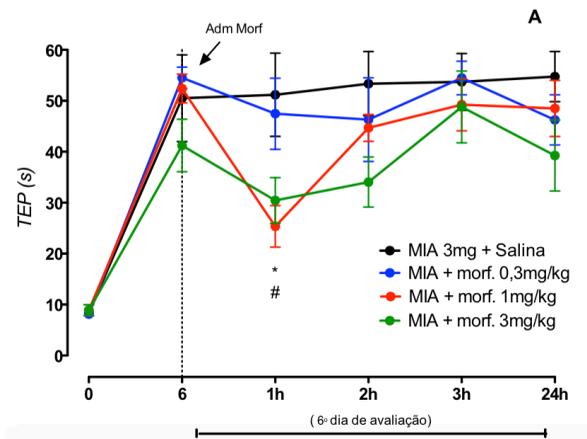
**Figura 4.4** Variabilidade do TEP após uma e duas administrações de MIA. Análise da incapacitação articular expressa através do TEP, sobre efeito de doses de MIA em 12 dias de avaliações. Avaliação expressa pela mediana dos registros diários individuais.

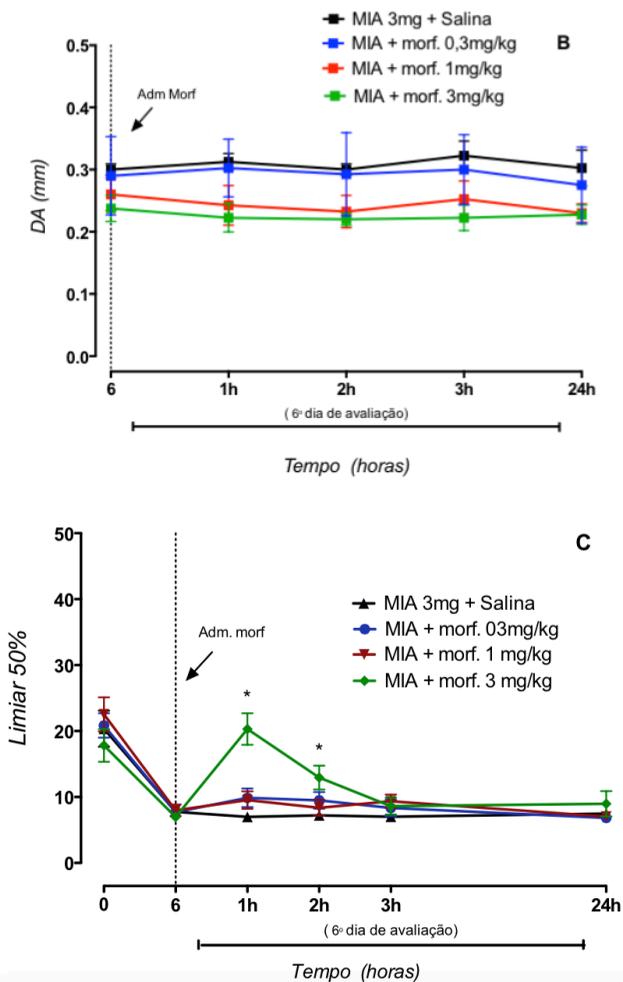
## 4.6 Avaliação dos efeitos mediados pela administração sistêmica de Morfina sobre os comportamentos induzidos pelo MIA intra-articular

A morfina é uma droga de ação opioide clássica, amplamente utilizada na clínica devido ao seu potente efeito analgésico e, por esse motivo, foi uma valiosa ferramenta farmacológica para o refinamento do modelo experimental.

Primeiramente, foi avaliado o efeito da administração sistêmica de morfina sobre a incapacitação articular induzida pela MIA (3 mg). O opioide foi administrado por via subcutânea, imediatamente após o registro de incapacitação no 3º dia após a segunda injeção intra-articular de MIA (ou 6º dia após a primeira).

Observou-se um efeito hiponociceptivo uma hora após sua administração ( $P < 0,05$ ) nas doses de 1 e 3 mg/kg (Figura 4.5 A), perdendo significância estatística na hora seguinte. Essas doses mostraram tendência a manter o diâmetro articular menores que o grupo controle em todos os pontos de aferição (Figura 4.5 B). De forma parecida, o efeito antinociceptivo da morfina foi de curta duração também no teste de von Frey, observando-se um aumento no limiar nociceptivo na primeira e segunda horas de registro ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.5 C).





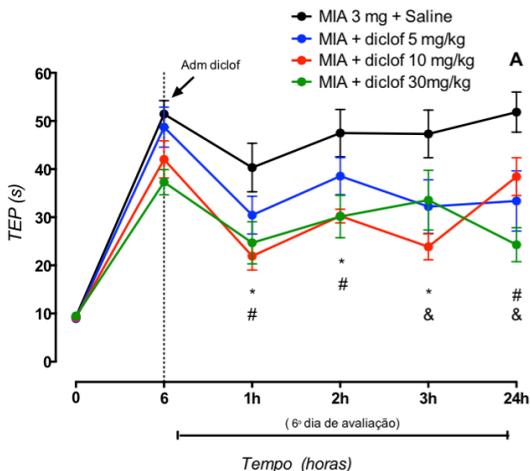
**Figura 4.5** Efeito da administração de morfina sobre a nocicepção induzida por MIA 3 mg/i.a.. (A) Análise da incapacitação articular expressa pelo TEP (B) Avaliação do edema articular discriminado pela diferença do diâmetro articular em centímetros, e em (C) a latência em % de retirada de pata no teste de von Frey no sexto dia de análise após única administração no dia zero. Morfina foi administrada nas doses de 0,3; 1 e 3 mg/kg, no sexto dia após indução da artrite (seta preta). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 9$ ); # e \* indicam  $P < 0,05$ , para as doses de 1 e 3 mg/kg, respectivamente, quando comparado ao grupo controle tratado com salina (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste *Post-hoc* de Bonferroni).

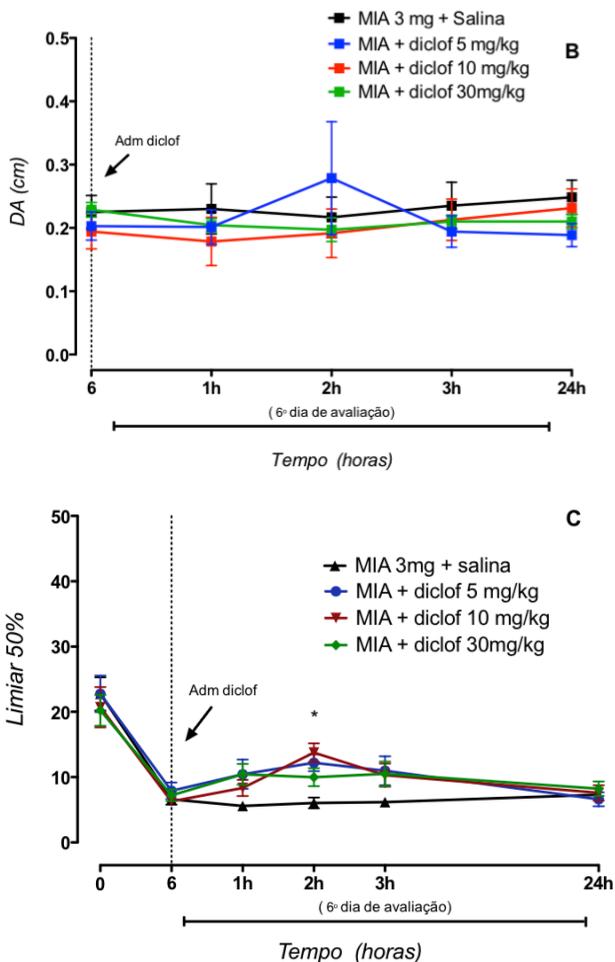
## 4.7 Avaliação dos efeitos mediados pela administração sistêmica de Diclofenaco sobre os comportamentos induzidos pelo MIA intra-articular

O diclofenaco é um anti-inflamatório não esteroidal, com ampla utilização clínica na osteoartrite devido a sua ação analgésica, possibilitando assim uma avaliação diferenciada para um melhor refinamento do modelo sobre os efeitos induzidos pela MIA intra-articular.

No teste de incapacitação articular, o diclofenaco nas doses de 5, 10 e 30 mg/kg, apresentou efeito antinociceptivo mais longo do que o apresentado pelo opioide nas mesmas condições. Sendo possível observar efeito significativo até 24 horas após sua administração ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.6 A).

Curiosamente, porém, não observamos efeito anti-edematogênico neste modelo (Figura 4.6 B) e, no teste de von Frey, apenas a dose de 10 mg/kg causou aumento do limiar nociceptivo na 2ª hora após o tratamento ( $P < 0,05$ ) (Figura 4.6 C).





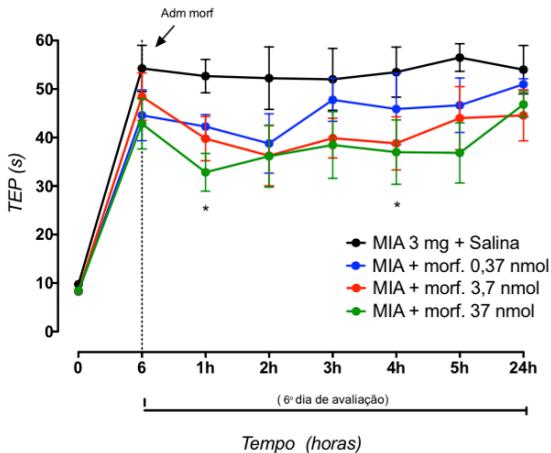
**Figura 4.6** Efeitos da administração de diclofenaco intraperitoneal sobre os efeitos nociceptivos induzidos por uma ou duas administrações de MIA 3 mg/i.a.. (A) Análise da incapacitação articular foi expressa pelo TEP, (B) Avaliação do edema articular discriminado pela diferença do diâmetro articular em centímetros, e em (C) a latência em % de retirada de pata no teste de von Frey. O diclofenaco foi administrado nas doses de 5, 10 e 30 mg/kg, no sexto dia após indução da artrite (seta preta). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 7$ ). &, \* e # indicam  $P < 0,05$  para as doses de 5, 10 e 30 mg/kg, respectivamente, quando comparado ao grupo salina (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste *Post-hoc* de Bonferroni).

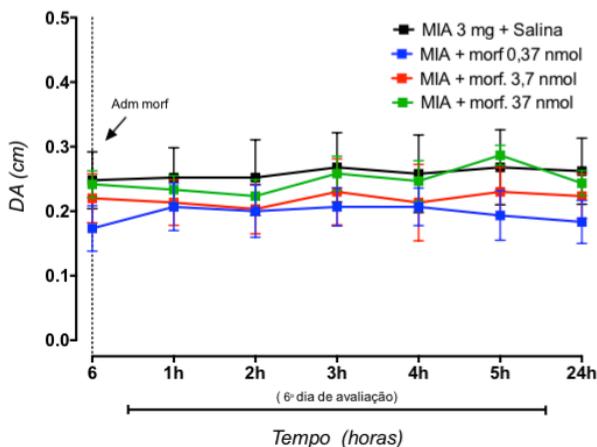
## 4.7 Avaliação dos efeitos mediados pela administração intratecal de Morfina sobre os comportamentos induzido pelo MIA intra-articular

Para avaliar a viabilidade terapêutica da aplicação de opioide diretamente no canal medular espinal, a morfina foi administrada na porção lombar da medula, entre as vértebras L5 e L6.

Todas as doses testadas do opioide (0,37; 3,7 e 37 nmoles) produziram valores de TEP uniformemente menores do que os do grupo controle (PBS) ao longo de 5 horas consecutivas após sua administração intratecal. Porém, apenas a dose de 37 nmoles (aprox. 24,7  $\mu\text{g}$ ) produziu significância estatística na primeira e na quarta hora de análise ( $P < 0,05$ ), ainda assim essa dose foi cerca de 30 vezes menor que a dose mais efetiva por via sistêmica (Figura 4.6 A).

O edema articular, de forma similar ao tratamento sistêmico, também não sofreu modificação diante das doses de morfina intratecal nos tempos observados, embora os valores de diâmetro articular tenham ficado uniformemente abaixo dos respectivos valores registrados para o grupo controle (Figura 4.6 B).





**Figura 4.7** Efeito da administração de morfina intratecal sobre efeito nociceptivo induzido por uma ou duas administrações de MIA (3 mg/i.a.). (A) Análise da incapacitação articular expressa pelo TEP, (B) Avaliação do edema articular discriminado pela diferença do diâmetro articular em centímetros. A morfina foi injetada por via intratecal nas doses de 0,37; 3,7 e 37 nmoles, no sexto dia após a indução da artrite (seta preta). Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 7$ ). \*indica  $P < 0,05$  para a dose 37 nmoles, quando comparado ao grupo salina (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste *Post-hoc* de Bonferroni).



## 5. Discussão

Apresentado pela primeira vez em 1977 por Kalbhen e Blum, o iodoacetato de sódio (MIA) possui a capacidade de bloquear a gliceril-3-fosfato desidrogenase, enzima presente na cascata da glicólise de condrócitos, culminando na morte celular do mesmo. Quando administrado em joelho de cobaias, produziu efeitos degenerativos na cartilagem em períodos de 6-8 semanas, com semelhanças histopatológicas, macroscópicas e bioquímicas observados no processo osteoartrítico em humanos. Os animais que foram expostos à administração intra-articular de MIA demonstraram efeitos analgésicos na utilização de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e glicocorticóides, no entanto esses fármacos não foram eficazes frente à degeneração cartilaginosa (KALBHEN, 1987).

Devido à degradação articular, ocorre um processo inflamatório inicial e local, resultando em um processo degenerativo e doloroso. Os mecanismos responsáveis pela dor na osteoartrite (OA) não se apresentam bem elucidados (BOVE et al., 2003). Diferente do tecido cartilaginoso, o qual não apresenta inervação, o osso subcondral, a cápsula articular, ligamentos, a sinóvia e outros componentes da articulação são ricos em inervação sensorial nociceptiva (BLACKBURN-MUNRO, 2004). Diferentes mecanismos já foram sugeridos à serem responsáveis pela dor, como a ativação de mecanorreceptores presentes na cápsula articular (devido a uma hipertensão capsular), a estimulação de fibras no osso subcondral na hipertensão intraóssea, micro fraturas subcondrais, pela inflamação sinovial, além de outros fatores (BLACKBURN-MUNRO, 2004; WIELAND et al., 2005).

Em virtude das características decorrentes da administração de MIA se assemelharem àquelas descritas na OA em humanos, sua utilização foi proposta como modelo da doença em animais (KISS, 2011). Gerando um processo degenerativo longo, o modelo tem sido sugerido útil para induzir processos nociceptivos crônicos, decorrente da ativação de fibras sensoriais periféricas tipo C e A $\delta$  (KELLY et al., 2012).

No teste de incapacitação articular (TONUSSI; FERREIRA, 1992) utilizado no presente estudo, a administração intra-articular de MIA demonstrou induzir o aumento do tempo de

elevação de pata, durante a deambulação do animal. Diferentemente, dos métodos comumente reportados na literatura, esse teste permite a avaliação da nocicepção espontânea, mais do que meramente de hiperalgesia, evocada no sítio primário da lesão articular. Representando ainda uma avaliação direta e objetiva da funcionalidade articular. Assim, o tempo de elevação da pata (ou guarda do membro), representa um indicativo da incapacitação articular, que na clínica se caracteriza como a principal característica de morbidade (a dor evocada pelo movimento). Associado, também, a aferição do edema articular que, de forma semelhante, se eleva dos valores basais, é possível então inferir a presença de dor e inflamação, em comparação aos animais normais.

A avaliação concomitante da sensibilidade plantar ao teste de von Frey mostrou que a redução do limiar mecânico em um sítio distal ao foco primário de lesão, permanece por tempo acentuadamente mais longo que o próprio quadro de incapacitação e edema articular induzido nas mesmas condições. Sugerindo assim que esta hiperalgesia não está diretamente ligada à nocicepção primária. Trabalhos que utilizam testes hiperalgésicos secundários para avaliação de dor, como o teste de von Frey, demonstram uma resposta decorrente do MIA em duas fases ou picos, tendo sido esse achado relacionado à uma transição de uma fase aguda para uma crônica (POMONIS et al., 2005). No entanto, não foi possível confirmar essa característica em nosso estudo, pois mesmo com múltiplas aplicações do MIA, não ocorreu cronificação da resposta de incapacitação.

Como dito acima, testes como o de von Frey, avaliam a hiperalgesia à estímulos mecânicos geralmente em sítios afastados da lesão primária, portanto, se referem ao que chamamos de hiperalgesia secundária. A presença de hiperalgesia secundária no sítio plantar, mesmo que ipsilateral ao joelho artrítico, não tem correspondência na osteoartrite humana, sendo este tipo de fenômeno tipicamente encontrado em roedores, sugerindo um processo de sensibilização central mais difuso do que o que ocorre em humanos (LAURSEN et al., 1997; WILLIS, 1999). Na verdade, a hiperalgesia secundária é muito mais circunscrita a tecidos não lesados próximos a área lesada, em humanos. A nossa intenção no presente trabalho foi padronizar um método mais objetivo para a avaliação algésica

pré-clínica da OA em ratas, uma vez que o problema real em humanos é a dor primária na articulação e não parestesias ou disestesias decorrentes de um fenômeno hiperalgésico secundário, pois estes últimos não parecem ter grande relevância clínica.

Alem disso, Okun em 2012, avaliando o efeito do MIA intra-articular no teste de von Frey e no de distribuição de peso (*Weight Bearing*), relatou efeito de até 28 dias. Considerando que o teste de distribuição de peso é um tipo de avaliação de incapacitação mediante a redistribuição do apoio entre as patas anteriores (COMBE; BRAMWELL; FIELD, 2004; OKUN et al., 2012), novamente temos uma discrepância entre a duração do sugerido efeito nociceptivo induzido pelo MIA, entre esses achados e o que nós observamos no presente estudo.

Uma possível explicação para esta diferença pode estar no fato de que no teste de distribuição de peso, o animal é imobilizado para que se realize o registro. Enquanto no teste de incapacitação articular, o animal deve realizar a tarefa de andar sobre o cilindro de registro. Assim, no primeiro teste a atenção do animal não é dividida, além do que o estresse de imobilização pode aumentar essa atenção ao foco de nocicepção (MARTINS et al, 2010). Por outro lado, no teste de incapacitação articular, o deambular do animal pode representar uma situação mais semelhante à incapacitação devido a OA em humanos, sendo o quadro clínico muito dependente do movimento. No registro de comportamental em vídeo, com o animal livre na caixa de observação, o comportamento de guarda do membro afetado reproduziu essencialmente o decurso temporal observado no teste de incapacitação articular. Sendo que neste tipo de registro o animal não é obrigado a deambular, porém está livre para deambular pelo ambiente da caixa de observação em que é colocado, reforça a noção de que as condições do teste de distribuição de peso, podem induzir uma percepção errônea do grau de nocicepção induzida pelo MIA a longo prazo.

Nesse trabalho utilizou-se ratas para todos os protocolos experimentais, pois ocorre maior predominância da OA em pacientes do sexo feminino (SRIKANTH et al., 2005). Diversos estudos demonstram as influências negativas e positivas relacionadas com a variação da sensibilidade algésica resultante da modulação hormonal do animal conforme o ciclo estral que o

mesmo se encontra (HOOPER; BRYAN; EATON, 2011; MORAES et al., 2012). O ciclo estral completo de uma rata ocorre em um período de quatro à cinco dias, resultando que no período transcorrido nos testes aqui realizados os animais passaram por todos os estágios deste ciclo, logo, contudo a variação do ciclo estral não pareceu ser um fator de variabilidade para os resultados observados.

A nocicepção na OA parece estar diretamente relacionada ao contato dos ossos, devido ao desgaste articular e, conseqüentemente, a ativação mecânica de nociceptores, e também sua sensibilização por citocinas derivadas do processo necrótico presente (LEE et al., 2011; SCHUELERT; MCDOUGALL, 2009). O MIA, é um inibidor irreversível da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e é absorvido junto a nutrientes presente no líquido sinovial articular após sua administração. No entanto, uma única administração de MIA não deve ser responsável pela morte celular de toda camada de condrócitos presentes na cartilagem articular. Isto deve decorrer da cronificação do processo degenerativo, que é dependente da liberação de citocinas e, sequencialmente, da produção de metaproteinasas, dando continuidade ao processo apoptótico do sistema (GOLDRING, 2000). De forma semelhante, na OA observa-se um estágio inflamatório inicial decorrente da degradação cartilaginosa, com infiltrado celular e liberação de citocinas pró-inflamatórias, culminando na expressão da COX-2. Essa age primordialmente na produção de prostaglandinas pró-inflamatórias, sendo essas últimas responsáveis pela sensibilização de aferentes primários (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

Esta talvez seja a explicação do por quê uma única administração de MIA se demonstrou limitada em seu efeito nociceptivo. Com duas aplicações de MIA, como no modelo utilizado aqui, é possível que, juntamente com o atrito e desgaste articular, a segunda injeção de MIA estaria provocando a degradação de camadas mais externas de condrócitos, conseqüentemente liberando mais mediadores inflamatórios capazes de ativar os nociceptores, intensificando o processo necrótico e, assim, a nocicepção (GOLDRING, 2000; LEE et al., 2011; SCHUELERT; MCDOUGALL, 2009).

As múltiplas aplicações de MIA acarretam em uma deformação macroscópica gradativa na articulação, resultando em um inchaço pontual com remodelação cartilaginosa e sua intensificação decorre do número de administrações feitas. No entanto mais de duas aplicações não resultou em uma influência nociceptiva considerável, como mostrado em nossos resultados. Mesmo não apresentando um efeito crônico de 28 dias como reportado por outros autores (POMONIS et al., 2005), observou-se nessa circunstância uma janela temporal que possibilita estudos prolongados com mais de seis dias.

A evolução da OA possui uma influência direta da qualidade de vida além de outros fatores de risco (GRIFFIN; GUILAK, 2009; VISSER et al., 2015). Em sua evolução, a patologia pode ser classificada conforme a degradação decorrente (AL-ZAHRANI; BAKHEIT, 2002), possuindo estágios patológicos. Semelhante a outras patologias, sua evolução temporal mostra-se variável de indivíduo a outro, onde além de razões sociais, também recebe influência imunológica individual (P.M., 2011). De maneira similar, os animais utilizados nesse estudo apresentam variabilidades naturais que resultam em diferentes sensibilidades para o desenvolvimento mais brando ou severo de uma patologia. Nessa circunstância, observamos uma diferença dentre os grupos avaliados, no desenvolvimento e na sensibilidade do teste entre animais que passaram pelo mesmo protocolo experimental, resultando em respostas temporais diferentes, ou variância na intensidade da patologia instalada.

A OA é caracterizada por um tratamento com enfoque nas condições patológicas, como a diminuição da dor. Diversos medicamentos são utilizados para esse fim, tendo sua escolha determinada principalmente pelo estágio de evolução do quadro clínico e a resposta terapêutica. Dentre estes fármacos encontram-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os opioides (BOBACZ, 2013; GIMENEZ et al., 2014).

O teste de incapacitação articular (BRESSAN; CUNHA; TONUSSI, 2006; SOUZA-SILVA et al., 2013; TONUSSI; FERREIRA, 1992), demonstrou ser sensível para a maioria das classes de analgésicos e AINEs (TONUSSI; FERREIRA, 1992). Corroborando nossos achados com incapacitação induzida por outros estímulos, o diclofenaco mostrou-se eficiente também no presente caso, porém aparentemente muito menos eficiente em

reverter o limiar nociceptivo para a estimulação plantar com as cerdas de von Frey. Se por um lado esse achado reforça a importância já notada anteriormente das prostaglandinas na manutenção da incapacitação articular, por outro sugere que a sensibilização central evidenciada pela reação às cerdas de von Frey pode já se encontrar dissociada do foco de nocicepção primária. Nesse caso, testes de hiperalgesia secundária como o de von Frey, não seriam bons preditores do efeito analgésico de fármacos neste modelo de osteoartrite.

Contudo, a ausência de efeito antiedematogênico do diclofenaco contrasta fortemente com o obtido com inibidores de ciclooxigenase em outros modelos de inflamação articular. O que sugere que o aumento do diâmetro articular induzido pelo MIA, após seis dias, não tem correlação com a produção de prostaglandinas no foco de lesão. Resultados esses que concordam Kalbhen, que demonstrou a ineficácia desses fármacos na interrupção da degradação cartilaginosa.

A administração sistêmica de morfina também demonstrou-se eficiente e de similar efeito analgésico como quando observado em estudos anteriores de incapacitação inflamatória (TONUSSI; FERREIRA, 1992) ou por formalina (MARTINS, 2006). No entanto, de curto efeito temporal. O que sugere a necessidade de um regime posológico de múltiplas aplicações diárias para se obter conforto analgésico.

Aplicações repetidas de morfina podem demonstrar efeitos supressores além do nociceptivo, por exemplo a redução da capacidade locomotora do animal com administrações superiores a 2,5 mg/kg (KÖKS et al., 1999). Em doses maiores de morfina, observa-se a interação dessa droga com demais estruturas supraespinais, o que resulta muitas vezes no surgimento de efeitos adversos como a sonolência e sedação. Ambos podendo ser evidenciados através da avaliação da atividade locomotora espontânea do animal (VANZ, 2013). No entanto, em uma situação na qual o animal é estimulado a deambular (como no teste da incapacitação articular), percebe-se que esse efeito é relativo. De qualquer forma, alternativas ao tratamento sistêmico teria benefícios óbvios para pacientes que precisam fazer uso crônico do medicamento analgésico, pois isso significaria uma melhor qualidade de vida ao indivíduo. Por isso o achado de que a administração intratecal de morfina foi cerca de

30 vezes mais potente em produzir analgesia e ainda com maior tempo de duração, é muito relevante para a clínica da dor na osteoartrite.

Assim como em outros casos de dor crônica em humanos, a implantação de bombas de infusão contínua de morfina na medula espinhal pode ser uma alternativa vantajosa para o controle a longo prazo também da dor na osteoartrite.

A morfina quando administrada por via intratecal diante de inflamação articular gerada pela carragenina, se mostrou capaz de reduzir o edema gerado (STEIN, 2012). No entanto, quando avaliado esse parâmetro na presença do MIA intra-articular, observou-se que o edema não sofreu alteração estatisticamente significativa, embora tenha claramente apresentado tendência em reduzir o diâmetro articular. Resultado esse que pode ser devido ao fato do tratamento com a morfina ter sido realizado em uma única administração, dias após a instalação da patologia. Além disso, essa articulação também pode apresentar alterações no tamanho articular devido a fatores não inflamatórios ou vasculares, como na remodelação da cartilagem, que não são modulados pelo estado funcional dos nociceptores.



## 6. Conclusão

Nossos resultados mostraram que o teste de incapacitação articular divergiu em sensibilidade nociceptiva diante de outros testes hiperalgésicos secundários e primários. No entanto, possibilitou avaliar uma resposta consistente do efeito mais representativo da OA de joelho que é a incapacitação articular.

O modelo foi eficiente em mostrar o efeito antinociceptivo de fármacos clássicos utilizados na clínica para o tratamento da dor da OA.

Este estudo também mostrou que a administração intratecal de opioide pode ser uma alternativa vantajosa para o controle crônico da dor na OA.



## 7. Referências Bibliográficas

AL-ZHRANI, K. S.; BAKHEIT, A. M. O. A study of the gait characteristics of patients with chronic osteoarthritis of the knee. **Disability and rehabilitation**, v. 24, n. 5, p. 275–280, 2002.

AMAGASE, K. et al. Importance of cyclooxygenase-1 / prostacyclin in modulating gastric mucosal integrity under stress conditions. **Gastroenterology and Hepatology**, v. 29, n. 4, p. 3–10, 2014.

AREND, W. P.; DAYER, J. M. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 38, n. 2, p. 151–60, fev. 1995.

BIRCHFIELD, P. C. Osteoarthritis overview. **Geriatric nursing (New York, N.Y.)**, v. 22, n. 3, p. 124–30; quiz 130–1, jan. 2001 .

BLACKBURN-MUNRO, G. Pain-like behaviours in animals - How human are they? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 6, p. 299–305, 2004.

BOBACZ, K. Pharmacologic treatment of hand-, knee- and hip-osteoarthritis. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 163, p. 236–242, 2013.

BOVE, S. E. et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 11, p. 821–830, nov. 2003.

BRESSAN, E.; CUNHA, F. D. Q.; TONUSSI, C. R. Contribution 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, n. 1-2, p. 83–9, out. 2006.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of neuroscience methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, jul. 1994.

COCEANI, F. et al. Function of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 in the ductus arteriosus from foetal lamb: differential development and change by oxygen and endotoxin. **British journal of pharmacology**, v. 132, p. 241–251, 2001.

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, n. 2-3, p. 236–40, 11 nov. 2004.

CRAIG, A. D. A new view of pain as a homeostatic emotion. **Trends in neurosciences**, v. 26, n. 6, p. 303–7, jun. 2003.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 20, p. 441–62, jan. 1980.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends in pharmacological sciences**, v. 15, n. 6, p. 190–7, jun. 1994.

FITZGERALD, M. J. T. **Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat** *Journal of Anatomy* Wiley-Blackwell, , 1 ago. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1261816/>>. Acesso em: 3 fev. 2015

GIMENEZ, S. et al. Clinical management of patients with hip and knee osteoarthritis: patient satisfaction with treatment switch. **Rheumatol Int**, v. 34, n. 6, p. 823–855, 2014.

GOLDRING, M. B. et al. Regulation of Collagen Gene Expression by Prostaglandins and Interleukin-1beta in Cultured Chondrocytes and Fibroblasts. **American journal of therapeutics**, v. 3, n. 1, p. 9–16, jan. 1996.

GOLDRING, M. B. The Role of the Chondrocyte in Osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 9, p. 1916–1926, 2000.

GRIFFIN, T. M.; GUILAK, F. Why is obesity associated with osteoarthritis? Insights from mouse models of obesity. **Biorheology**, v. 45, n. 919, p. 387–398, 2009.

GUERMAZI, A. et al. Prevalence of abnormalities in knees detected by MRI in adults without knee osteoarthritis: population based observational study (Framingham Osteoarthritis Study). **Bmj**, v. 345, n. August, p. e5339–e5339, 2012.

HASHIMOTO, S. et al. Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**, v. 10, n. 3, p. 180–7, mar. 2002.

HAYASHI, D.; ROEMER, F. W.; GUERMAZI, A. Osteoarthritis year 2011 in review: Imaging in OA - a radiologists' perspective. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, p. 207–214, 2012.

HILDEBRAND, C. et al. Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. **The Anatomical record**, v. 229, p. 545–555, 1991.

HOOPER, A. E. C.; BRYAN, A. D.; EATON, M. Menstrual cycle effects on perceived exertion and pain during exercise among sedentary women. **Journal of women's health**, v. 20, n. 3, p. 439–446, 2011.

**IASP**. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Taxonomy?navItemNumber=576#Pain>>. Acesso em: 3 fev. 2015.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203–10, 13 set. 2001.

KALBHEN, D. A.; BLUM, U. [Hypothesis and experimental confirmation of a new pharmacological model of osteoarthrosis

(author's transl)]. **Arzneimittel-Forschung**, v. 27, n. 3, p. 527–31, jan. 1977.

KARVONEN-GUTIERREZ, C. A. et al. **Knee Osteoarthritis : Intersections of Obesity , Inflammation , and Metabolic Dysfunction**. [s.l: s.n.].

KELLY, S. et al. Spontaneous firing in C-fibers and increased mechanical sensitivity in A-fibers of knee joint-associated mechanoreceptive primary afferent neurones during MIA-induced osteoarthritis in the rat. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 4, p. 305–313, 2012.

KISS, R. M. Effect of severity of knee osteoarthritis on the variability of gait parameters. **Journal of Electromyography and Kinesiology**, v. 21, n. 5, p. 695–703, 2011.

KÖKS, S. et al. BOC-CCK-4, CCK(B)receptor agonist, antagonizes anxiolytic-like action of morphine in elevated plus-maze. **Neuropeptides**, v. 33, n. 1, p. 63–9, fev. 1999.

KOPP, S.; MEJERSJÖ, C.; CLEMENSSON, E. Induction of osteoarthrosis in the guinea pig knee by papain. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, v. 55, p. 259–266, 1983.

LANGFORD, L. A; SCHMIDT, R. F. Afferent and efferent axons in the medial and posterior articular nerves of the cat. **The Anatomical record**, v. 206, p. 71–78, 1983.

LAURSEN, R. J. et al. Referred pain is dependent on sensory input from the periphery: a psychophysical study. **European journal of pain (London, England)**, v. 1, n. 4, p. 261–9, jan. 1997.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 903–11, 15 out. 2001.

LEE, Y. et al. Monosodium iodoacetate-induced joint pain is associated with increased phosphorylation of mitogen activated

protein kinases in the rat spinal cord. **Molecular pain**, v. 7, n. 1, p. 39, jan. 2011.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607–9, 8 maio 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473–477, 2008.

MARTEL-PELLETIER, J. et al. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 70, n. 6, p. 807–15, jun. 1994.

MARTINS, M. A. et al., [Dependency of nociception facilitation or inhibition after periaqueductal gray matter stimulation on the context](#). **Behavioral Brain Research**, v.214, p.260-267, 2010.

MASON, R. M. et al. The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, p. 85–91, 2001.

MCDOUGALL, J. J. Pain and OA. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 6, n. 4, p. 385–386, 2006.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, jan. 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. February, p. 355–474, 2002.

MORAES, E. D. DE et al. Effect of pain related of sex and estrous cycle on blood plasma glucose, free fatty acids and corticosterone in rats. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, p. 451–456, 2012.

MORE, A. S. et al. Effect of iNOS inhibitor S-methylisothiourea in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain: implication for osteoarthritis therapy. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 103, n. 4, p. 764–72, fev. 2013.

OKUN, A. et al. Afferent drive elicits ongoing pain in a model of advanced osteoarthritis. **Pain**, v. 153, n. 4, p. 924–33, abr. 2012.

P.M., N. Heterogeneity in the response to rheumatoid arthritis (RA): The challenge of accounting for individual variability in the face of chronic disease. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 71, p. 288–289, 2011.

POMONIS, J. D. et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. **Pain**, v. 114, p. 339–346, 2005.

RADIN, E. L.; ROSE, R. M. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 213, p. 34–40, dez. 1986.

REZENDE, M. U. DE; CAMPOS, G. C. DE; PAILO, A. F. Conceitos atuais em osteoartrite. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 120–122, 2013.

ROSIS, R. G. DE; MASSABKI, P. S.; KAIRALLA, M. Osteoartrite : avaliação clínica e epidemiológica de pacientes idosos em instituição de longa permanência \*. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 8, n. 2, p. 101–108, 2010.

SCHUELERT, N.; MCDUGALL, J. J. Grading of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis reveals a concentration-dependent sensitization of nociceptors in the knee joint of the rat. **Neuroscience letters**, v. 465, n. 2, p. 184–8, 13 nov. 2009.

SHANE ANDERSON, A.; LOESER, R. F. Why is osteoarthritis an age-related disease? **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 24, p. 15–26, 2010.

SOUZA-SILVA, E. **Efeito hiponociceptivo da histamina intra-articular**. [Dissertação] Florianópolis; 2009.

SOUZA-SILVA, E. et al. Histamine Produces Opposing Effects to Serotonin in the Knee Joint of Rats. v. 14, n. 8, p. 808–817, 2013.

SRIKANTH, V. K. et al. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, p. 769–781, 2005.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473–477, 2008.

STEIN, T. Papel dos receptores histaminérgicos da medula espinhal na inflamação articular de ratos e sua possível contribuição como adjuvante para os efeitos analgésicos da morfina. [Dissertação] Florianópolis; 2012

STEIN,C.; LANG, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. Figure 1, p. 3–8, 2009.

STOOP, R. et al. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. **Arthritis and rheumatism**, v. 43, n. 9, p. 2121–31, set. 2000.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, p. 421–427, 1992.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 38, p. 97–120, 1998.

VANZ, F. **Análise comportamental e farmacológica da nocicepção cutânea e articular induzida por formalina**. [dissertação], Florianópolis; 2013

VISSER, A. W. et al. Knee osteoarthritis and fat free mass interact in their impact on health-related quality of life in men: the Netherlands Epidemiology of Obesity study. **European Journal of Dermatology**, v. 11, p. 475–476, 2015.

VONSY, J.-L. **The monosodium iodoacetate- induce model of osteoarthritis pain: behavioural, pharmacological, immunohistochemical and electrophysiological studies.** [tese], Londres; 2008

WANG, H.; WESSENDORF, M. W. Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. **Journal of Comparative Neurology**, v. 429, n. September 2000, p. 590–600, 2001.

WEIR, M. R. et al. Selective COX-2 inhibition and cardiovascular effects : A review of the rofecoxib development program. **American Heart Journal**, v. 146, n. 4, p. 591–604, 2003.

WHO. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. **World Health Organization technical report series**, v. 919, p. i–x, 1–218, back cover, jan. 2003.

WIELAND, H. A et al. Osteoarthritis - an untreatable disease? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. APRIL, p. 331–344, 2005.

WILLIS, W. D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: A double-edged sword. **Experimental Brain Research**, v. 124, p. 395–421, 1999.