



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Leopoldina Milanez da Silva Leite

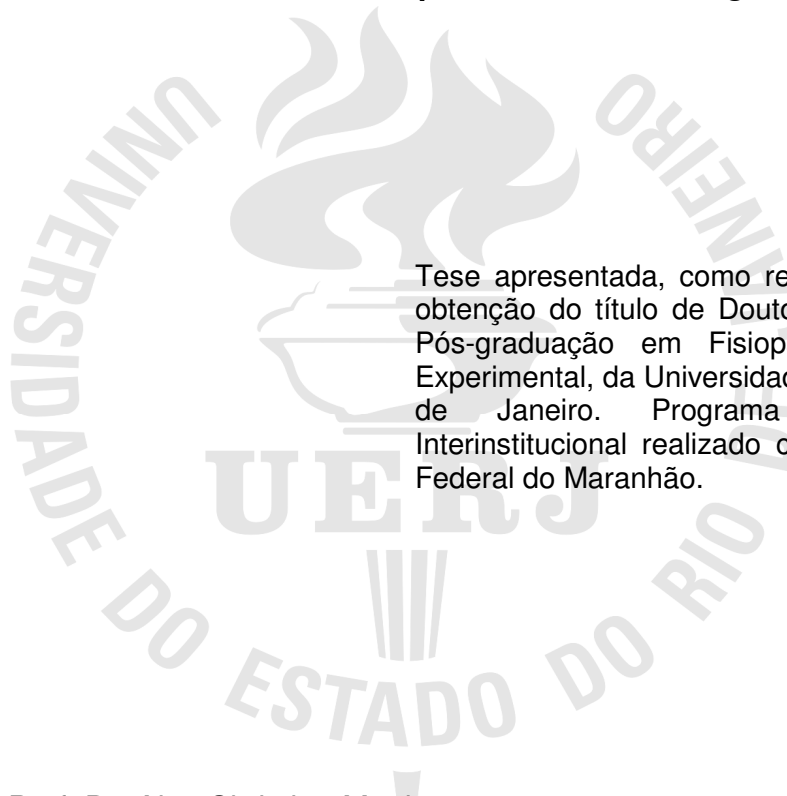
**Uso da S(+)  
cetamina por via intra-articular em modelo de  
osteoartrite em ratos: análise da imunoexpressão da ciclo-  
oxigenase 2**

Rio de Janeiro

2013

Leopoldina Milanez da Silva Leite

**Uso da S(+) cetamina por via intra-articular em modelo de osteoartrite em ratos: análise da imunexpressão da ciclo-oxigenase 2**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Orientador: Prof. Dr. Alex Christian Manhães

Coorientador: Prof. Dr. João Batista Santos Garcia

Rio de Janeiro

2013

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L533 Leite, Leopoldina Milanez da Silva.  
Uso da S(+) cetamina por via intra-articular em modelo de osteoartrite em ratos: análise da imunexpressão da ciclo-oxigenase 2 / Leopoldina Milanez da Silva Leite. – 2013.  
48 f.

Orientador: Alex Christian Manhães.

Coorientador: João Batista Santos Garcia.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão

1. Osteoartrite – Teses. 2. Dor – Teses. 3. Cetamina – Uso Terapêutico. 4. Ciclo-Oxigenase 2 I. Manhães, Alex Christian. II. Garcia, João Batista Santos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV Título.

CDU 616.72-002

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

---

Assinatura

Data

Leopoldina Milanez da Silva Leite

**Uso da S(+) cetamina por via intra-articular em modelo de osteoartrite em ratos: análise da imunexpressão da ciclo-oxigenase 2.**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Programa de Doutorado Interinstitucional realizado com a Universidade Federal do Maranhão.

Aprovada em 27 de março de 2013.

Coorientador: Prof. Dr. João Batista Santos Garcia  
Universidade Federal do Maranhão

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Alex Christian Manhães (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Elaine de Oliveira  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Rosário Ramos Costa  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento  
Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro

2013

## DEDICATÓRIA

Aos professores das escolas públicas brasileiras, que mesmo explorados ainda mantêm a Educação nesse país.

A minha mãe, Profa. Auredulce Milanez, que desde cedo me ensinou o valor da Educação.

A meu pai, José Ferreira da Silva (in memorian)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus

Ao Prof.Dr. João Batista Santos Garcia, Coorientador deste trabalho, pela generosidade e competência. A possibilidade dessa pesquisa somente foi possível graças a sua sabedoria, sua paciência, sua solidariedade, sua amizade, suas dedicadas leituras dos rascunhos e sua interlocução teórica. Agradeço pela forma como acolheu minhas dispersões, minhas dúvidas e agradeço pelo tempo.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Alex Christian Manhães, pela confiança, disponibilidade e atenção. Embora distante, me ofereceu segurança e apoio incondicional durante toda a realização desse estudo.

À Prof. Dra. Maria do Rosário Ramos Costa, Coordenadora, na UFMA, do Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental, pela confiança, amizade e paciência com todos nós, alunos desse curso.

Ao Prof. Dr. José Wanderley Vasconcelos, pelo apoio sempre presente, pela amizade, parceria, palavras de incentivo durante todas as fases desse doutorado, pelas sugestões e contribuições oferecidas na redação da tese.

Ao Prof. Dr. Ubirajara Martins Figueiredo, pelos ensinamentos a mim transmitidos e por acreditar firmemente na minha capacidade profissional.

À Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Maranhão, pela amizade, apoio e sugestões oferecidos.

À UFMA, Universidade Federal do Maranhão, por ter-me proporcionado duas graduações, residência médica, mestrado e doutorado, pelo compartilhamento de conhecimentos, o convívio com pessoas que ajudaram e possibilitaram a minha formação profissional. Em especial, e com muito carinho, aos inúmeros professores dos cursos de Farmácia e Medicina, que me doaram parte de sua sabedoria.

Ao Médico e Mrs. Eugênio Neto por sua disponibilidade e ajuda em todas as etapas da execução desse trabalho, pelo esclarecimento de muitas das minhas dúvidas, pelo compartilhamento de artigos e de materiais para realização dessa pesquisa.

Ao Médico Patologista Pablo Furtado pela leitura das lâminas da imuno-histoquímica e por sua atenção.

Ao Médico Anestesiologista Thiago Alves Rodrigues pelos esclarecimentos das dúvidas sobre a cetamina e a COX-2.

Aos colegas Antonio Gonçalves, Rosilda Dias, Raimunda Ribeiro e José Calixto, com os quais, muitas vezes, dividi as angústias durante esse trabalho.

Ao meu marido Kennedy Leite pelo apoio logístico, pelas diferentes e inumeráveis pequenas e grandes contribuições, pelo companheirismo e compreensão das horas que me fiz ausente.

Ao meu filho Kleber Neto que todos os dias ensina-me a ser mãe. Agradeço pelo amor, carinho, por toda ajuda com as minhas dificuldades em informática e pela preocupação com minhas poucas horas de sono.

Ao meu irmão Ramsés Milanez, minha cunhada Daysilene Pinto, meus sobrinhos Ramsés II e Catarina, pelo amor e carinho dedicados a mim todos os dias.

Existem muitas hipóteses em ciências, que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.

*Carl Sagan*



## RESUMO

LEITE, Leopoldina Milanez da Silva. *Uso da S(+)* cetamina por via intra-articular em modelo, de osteoartrite em ratos: análise da imunexpressão da ciclo-oxigenase 2. 2013. 48 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro e Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, 2013.

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa que afeta grande parte da população e resulta em significativa morbidade e incapacidade. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos periféricos da S(+) cetamina na expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Foram utilizados modelos experimentais de osteoartrite em ratos. Inicialmente setenta e dois ratos foram utilizados no estudo. Foram divididos em três grupos de 24 animais cada. Em dois grupos foi induzida a OA através de 2mg de MIA (monoiodo acetato de sódio) por via intra-articular (i.a), em um volume máximo de 50µL e em um dos grupos não foi realizada a indução da OA. No sétimo dia após a indução, dois grupos, incluindo o sem OA, receberam injeção i.a de salina 0,9% em volume máximo de 50µL e o terceiro grupo recebeu injeção de S(+) cetamina na dose de 0,5mg/kg. Nos dias 7, 14, 21 e 28 os animais foram anestesiados e sacrificados para coleta da membrana sinovial e análise imuno-histoquímica da ciclo-oxigenase-2. Durante o estudo ocorreram 29 perdas do material a ser analisado, totalizando um n = 43. O protocolo adotado para a interpretação imuno-histoquímica foi a imunomarcagem citoplasmática da COX-2 em células da membrana sinovial, tecido conjuntivo e adiposo, conforme a intensidade da coloração. A análise dos resultados foi realizada através do teste do qui-quadrado. A reatividade da COX-2 foi positiva em 53,8% dos animais do grupo sem OA, em 60% do grupo OA com salina e em 80% dos animais do grupo OA com cetamina, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p = 0,3069$ ). Esse estudo sugeriu que a S(+) cetamina por via intra-articular não inibiu a expressão da COX-2 em modelos de osteoartrite em ratos.

Palavras-chaves: Dor crônica. Osteoartrite. Cetamina. Ciclo-oxigenase 2.

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative disease that affects a large population and results in significant morbidity and disability. The objective of the present study was to investigate the peripheral effects of S(+) ketamine on the COX-2 expression. Experimental models of OA in rats were used. At first, 72 rats were used in the study. The animals were divided into three groups of 24 each. In two groups, OA was induced through intra-articular (i.a.) injection of 2mg of monoiodine acetate (MIA), at a maximum volume of 50 $\mu$ L, while one of the groups was not submitted to OA induction. On the seventh day following the induction, the animals of two groups, including those from the not-induced group, received an i.a. injection of saline at 0.9% at a maximum volume of 50 $\mu$ L, while the third group received an injection of S(+) ketamine at 0.5mg/kg. On days 7, 14, 21 and 28 the animals were anesthetized and sacrificed, and the synovial membrane was extracted and submitted to immunohistochemistry analysis of the cyclooxygenase-2. Throughout the study, there were 29 losses of materials that were to be analyzed, totaling an n = 43. The protocol used for the immunohistochemical interpretation was cytoplasmic immunostaining of COX-2 in cells of the synovial membrane, conjunctive and adipose tissue, according to the intensity of the stain. Results were analyzed by the chi-square test. COX-2 reactivity was positive in 53.8% of animals in the group without OA, in 60% of those of the OA group with saline, and in 80% of group OA with ketamine, with no statistically significant difference between the groups ( $p = 0.3069$ ). Thus, the study implies that intra-articular injections of S(+) ketamine did not inhibit the COX-2 expression in osteoarthritis models in rats.

Keywords: Chronic pain. Osteoarthritis. Ketamine. Cyclooxygenase-2.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema ilustrativo do protocolo experimental.....	33
Figura 2 –	Fotomicrografia da positividade citoplasmática para COX-2 no Grupo OA + salina.....	36
Tabela 1 –	Distribuição dos grupos de amostra de membrana sinovial.....	36
Tabela 2 –	Reatividade imuno-histoquímica da COX-2 nas amostras de membrana sinovial sem OA, com OA tratada com salina e com OA tratada com cetamina.....	36
Figura 3 –	Fotomicrografia da positividade citoplasmática para COX-2 no Grupo OA + cetamina.....	37
Figura 4 –	Fotomicrografia da positividade citoplasmática para COX-2 Grupo OA + cetamina.....	37
Figura 5	Fotomicrografia da positividade citoplasmática para COX-2 em adipócitos. (Grupo salina sem OA).....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	–	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPA	–	Alfa-amino-5-metil-4-isoxazolproprônio
μL	–	Microlitro (s)
μM	–	Micrômetro (s)
Cm	–	Centímetro (s)
CGRP	–	Peptídeo Geneticamente Relacionado a Calcitonina
COX-2	–	Ciclooxigenase dois
COX-1	–	Ciclooxigenase um
DAB	–	3, 3'-diaminobenzidina
EAA	–	Aminoácidos Excitatórios
FDA	–	<i>Food and Drug Administration</i>
g	–	Grama (s)
GABA	–	Ácido-aminobutírico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	–	Peróxido de Hidrogênio
HE	–	Hemotoxilina-eosina
IASP	–	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL	–	Interleucina
iNOS	–	Óxido nítrico sintetase induzível
i.a.	–	Intra-articular
L	–	Litro (s)
LPS	–	Lipopolissacarídeo
mg/kg	–	Miligrama (s) por quilograma
MIA	–	Monoiodoacetato de sódio
mL	–	Mililitro (s)
mL/kg	–	Mililitro (s) por quilograma
Mm	–	Milímetro
NF-κB	–	Fator Nuclear Kappa B
NGF	–	Fator de Crescimento Nervoso

NK-1 –	Neurocinina um
NK-2 –	Neurocinina dois
NMDA –	N-Metil-D-Aspartato
Nm –	Nanômetro
OA –	Osteoartrite
OARSI –	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
p –	Nível de significância
PBS –	Solução Tampão Salina
pH –	Potencial hidrogeniônico
PGE2 –	Prostaglandina E2
PGG –	Prostaglandina G
PGH –	Prostaglandina H
PKA –	Proteinacina A
PKC –	Proteinacina C
Rpm –	Rotações por minute
SF-36 –	<i>Medical Outcomes Study 36-item short form Health Survey</i>
SNC –	Sistema Nervoso Central
SNP –	Sistema Nervoso Periférico
TNF- $\alpha$ –	Fator de Necrose Tumoral alfa
WOMAC –	<i>Western Ontario McMascter Osteoarthritis Index</i>

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
1.1	<b>Osteoartrite</b> .....	16
1.1.1	<u>Definição</u> .....	16
1.1.2	<u>Epidemiologia</u> .....	17
1.1.3	<u>Características clínicas e fisiopatológicas</u> .....	18
1.2	<b>Dor</b> .....	19
1.2.1	<u>Definição</u> .....	19
1.2.2	<u>A dor na osteoartrite</u> .....	19
1.3	<b>Nociceção</b> .....	20
1.4	<b>Mecanismos periféricos da dor</b> .....	21
1.5	<b>Mecanismos centrais da dor</b> .....	22
1.6	<b>O papel do glutamato</b> .....	24
1.7	<b>O receptor NMDA</b> .....	25
1.8	<b>A cetamina</b> .....	26
1.8.1	<u>Características farmacológicas</u> .....	26
1.9	<b>A COX-2</b> .....	27
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
2.1	<b>Modelo da osteoartrite induzida por monoacetato de sódio</b> .....	30
2.2	<b>Desenho experimental do estudo</b> .....	31
2.3	<b>Imuno-histoquímica</b> .....	33
2.4	<b>Análise da imuno-histoquímica</b> .....	34
2.5	<b>Análise estatística</b> .....	34
3	<b>RESULTADOS</b> .....	35
4	<b>DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	38
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
	<b>ANEXO – Comitê de ética em pesquisa</b> .....	46

## INTRODUÇÃO

O controle da dor em pacientes com osteoartrite (OA) permanece um desafio, e aqueles com graus acentuados da doença, que não conseguem responder aos esquemas terapêuticos conservadores, recebem indicação de substituição protética, principalmente quando a doença acomete grandes articulações como ombros, joelhos e quadris.

Tradicionalmente, os anti-inflamatórios têm sido a medicação mais utilizada para o controle da dor da OA, mas preocupações em relação à gastropatia, disfunção renal e efeitos hemostáticos, tem limitado sua ação. Dessa forma, o manejo no controle da dor com base na compreensão de seus complexos mecanismos de geração, modulação, amplificação e perpetuação desempenham um importante papel na escolha da melhor terapêutica a ser utilizada nos pacientes com OA. Atualmente, o tratamento dessa afecção fundamenta-se não apenas no alívio sintomático, mas no seu controle baseado nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos (WOOLF, 2004).

Recentemente, tem-se progredido com um melhor entendimento dos conceitos de sensibilização periférica e central, e como estes se relacionam com a dor da OA (SCHADRACK et al., 1999). A inflamação causa sensibilização dos neurônios nociceptivos e a modulação farmacológica, em particular, dos inibidores do receptor do glutamato (NMDA) que têm sido amplamente utilizados (BOETTGER et al., 2010).

Na busca de uma nova alternativa terapêutica, o uso da S(+) cetamina, cujo principal mecanismo de ação é ser antagonista ao receptor NMDA (HOCKING; COUSINS, 2003), tem sido alvo de vários estudos que relatam os efeitos analgésicos prolongados de sua administração pelas vias oral, intranasal, intravenosa ou tópica (HOCKING; COUSINS, 2003) (BORSOOK, 2009) (LUFT; MENDES, 2005) (SILVA et al., 2010), mas pouco se sabe sobre sua administração pela via intra-articular. Existem relatos do seu uso no tratamento da dor da articulação temporomandibular (AYESH et al., 2008) e na analgesia pós-operatória de joelho (BATRA et al., 2008) (GUARÁ SOBRINHO et al., 2012) (DAL et al., 2004). Entretanto, os poucos estudos com o uso da cetamina intra-articular não conseguiram explicar seus efeitos analgésicos após artroplastia total e artroscopia,

quando comparados com anestésicos locais como a bupivacaína (AYESH et al., 2008). Vários estudos recentes *in vitro* demonstraram que, em adição a sua atividade anestésica, a cetamina tem efeito anti-inflamatório, sendo demonstrado em vários modelos animais que ela suprime a produção e a liberação de várias citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) pelos leucócitos, e também de óxido nítrico (MAZAR et al., 2005) (HELMER et al., 2003).

Além desses resultados, alguns trabalhos indicam claramente que a cetamina pode exercer atividade anti-inflamatória *in vivo* e também em contextos clínicos. Dale et al. (2012) realizaram uma revisão sistemática e examinaram o efeito da administração da cetamina no período per-operatório e na inflamação pós-operatória, mostrando a noção de que a cetamina possui um efeito anti-inflamatório, através da redução considerável da concentração da IL-6 pró-inflamatória nas primeiras seis horas após cirurgia. A maioria dos estudos analisados incluiu outras medidas de inflamação, entre as quais a proteína C reativa, a IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ . Os resultados mais consistentes foram relacionados com a IL-6 que é um biomarcador, útil e confiável da inflamação sistêmica, conferindo credibilidade de que a cetamina, essencialmente, atua como um fármaco anti-inflamatório (DALE et al., 2012).

Há relatos de que baixa dose de cetamina (0,25mg/Kg) suprimiu significativamente o aumento de IL-6 no intra e no pós-operatório em pacientes de cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea e diminuiu a produção de superóxido no pós cirúrgico (HIROTA; LAMBERT, 2011). Os efeitos anti-inflamatórios da cetamina diminuindo a expressão da IL-6 também foram observados na dor aguda de pacientes com queimadura, indicando que esse fármaco pode reduzir a resposta inflamatória mesmo após o trauma (DALE, 2012).

Ainda que a dor e a limitação de movimentos articulares sejam as principais manifestações clínicas da OA, esses aspectos têm sido pouco investigados em modelos experimentais e até o momento não foi encontrada nenhuma referência à administração de S(+) cetamina por via intra-articular nestes modelos.

A partir dos dados apresentados, hipotetizamos uma possível ação periférica anti-inflamatória da cetamina sobre a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), quando administrada por via intra-articular. O objetivo neste estudo foi avaliar a ação da S(+) cetamina na expressão da COX-2 em modelo experimental de OA em joelhos de ratos.



# 1 REVISÃO DA LITERATURA

## 1.1 Osteoartrite

### 1.1.1 Definição

A osteoartrite (OA) é a doença articular mais prevalente e a principal causa de dor e incapacidade funcional no idoso, sendo a quarta causa de problemas de saúde na mulher idosa (DOHERTY, 2002). Até o momento não há cura para OA e o tratamento tem como finalidade a melhora da dor, da função articular e da qualidade de vida, minimizando os efeitos colaterais de medicamentos e terapias (IMAMURA et al., 2008).

Até a década de 1980 o termo artrose foi largamente utilizado para definir a doença degenerativa articular (do grego “arthros” = articulação e do grego “ose” = degeneração). Nos últimos anos esse conceito vem sendo revisto, utilizando-se hoje o termo Osteoartrite, expresso na literatura científica justificado, principalmente, com o avanço nos estudos, sobretudo na área molecular. A partir desses novos conhecimentos surgiram evidências inequívocas de que no nível molecular ocorre um desequilíbrio entre a formação e a degradação dos componentes da matriz cartilaginosa, derivado do aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias que atuam sobre os condrócitos (COIMBRA; REZENDE; PLAPLER, 2012).

Com a finalidade de definir adequadamente a OA, houve em 2008 uma reunião entre pesquisadores do *Osteoarthritis Research Society International (OARSI)* e membros do *Food and Drug Administration (FDA)*, em que se discutiram os aspectos relacionados à prevenção, diagnóstico e tratamento da OA (ABRAMSON et al., 2011). Baseados nas evidências houve um consenso de que a OA é uma doença usualmente progressiva das articulações sinoviais, representando a insuficiência na reparação das lesões na articulação, sendo o tecido cartilaginoso o mais atingido (COIMBRA; REZENDE; PLAPLER, 2012).

Esta insuficiência de reparo é resultante de tensões que podem ser iniciados por uma anomalia em qualquer dos tecidos sinoviais, incluindo a cartilagem articular, osso subcondral, ligamentos, meniscos, músculos periarticulares, nervos periféricos ou sinóvia. (LANE et al., 2011). A tensão intra-articular anormal e a falha no reparo tecidual, podem surgir como resultado de fatores biomecânicos, bioquímicos (destacando-se aqui as citocinas inflamatórias) e/ou genéticos (SHARMA; KAPOOR; ISSA, 2006).

### 1.1.2 Epidemiologia

Nos países ocidentais, 10 e 50% da população idosa é afetado por OA, um quarto dos quais são gravemente afetados pelos sintomas articulares. No Japão, cerca de 10 milhões dos 120 milhões de habitantes estão sofrendo de OA, com um aumento de 900 mil a cada ano (KAMEKURA et al., 2005).

De acordo com pesquisa realizada por quatro sociedades médicas brasileiras (Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia, Sociedade Brasileira de Reumatologia, Associação Brasileira de Medicina Física e Reabilitação e Sociedade Brasileira de Cirurgia de Joelho) publicada em 2012, a doença já afeta 5,2% da população brasileira, o que corresponde a 9,9 milhões de brasileiros e deve crescer em 24% até 2015, passando a atingir 12,3 milhões de pessoas. Costuma aparecer em pacientes acima dos 40 anos de idade, sendo mais frequente na população acima dos 60 anos. Relacionando os dados da pesquisa com os do censo do IBGE de 2010, os autores concluíram que o Brasil tem 163 mil pessoas com osteoartrite com até 19 anos, 1,3 milhão na faixa de 20 a 39 anos, 4,2 milhões de pacientes entre 40 e 59 anos e 4,2 milhões com 60 anos ou mais, sendo 4,4 milhões de homens e 5,5 milhões de mulheres, porém, surgindo mais precoce nos homens, particularmente no joelho, antes dos 60 anos e após essa idade, no quadril (COIMBRA; REZENDE; PLAPLER, 2012).

### 1.1.3 Características Clínicas e Fisiopatológicas

Clinicamente a doença é caracterizada por dor, limitação do movimento articular, crepitação e graus variáveis de inflamação local que se manifesta algumas vezes com derrame articular.

A etiologia é multifatorial e pode incluir fatores sistêmicos e biomecânicos locais. Os fatores sistêmicos que têm sido associados à OA incluem idade, sexo, susceptibilidade genética e racial, densidade óssea, níveis de estrogênios e fatores nutricionais (BENITO et al., 2005).

Patologicamente ocorre destruição da cartilagem, mais frequente em área de sobrecarga mecânica, causando esclerose do osso subcondral, cistos subcondrais, osteófitos marginais, aumento do fluxo sanguíneo metafisário, e graus variáveis de inflamação sinovial. Histologicamente ocorre fragmentação da superfície cartilaginosa, apoptose de condrócitos, fissuras verticais na cartilagem, deposição de cristais, remodelação e invasão do limite entre cartilagem e osso por vasos sanguíneos. Também é evidente a tentativa de reparo, inicialmente com a formação de osteófitos, seguida da perda total da cartilagem, esclerose e osteonecrose focal do osso subcondral. Biomecanicamente, as propriedades compressivas e tênsil sofrem alterações, além de redução da permeabilidade hidráulica da cartilagem, com aumento de água e edema excessivos, acompanhados por aumento da rigidez óssea. Bioquimicamente, a doença é caracterizada por redução na concentração, alterações no tamanho e agregação de proteoglicanos, alteração no tamanho e configuração da fibra colágena e aumento da síntese e degradação de macromoléculas da matriz (BRANDT et al., 1986).

Apesar de afetar qualquer articulação, a osteoartrite ocorre com maior frequência, pela ordem, nos joelhos, quadris, coluna lombar e dedos das mãos, sendo geralmente poliarticular (CAMANHO, 2001).

A dor é a manifestação clínica central da OA, sendo a principal razão pela qual os indivíduos afetados procuram assistência médica, estando relacionada a fatores periféricos e a mecanismos centrais que influenciam a experiência individual com a dor e a incapacidade associada a essa doença (KIDD, 2006).

## 1.2 Dor

### 1.2.1 Definição

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor se caracteriza como “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tal dano. A dor sempre é subjetiva e cada indivíduo aprende a usar este termo por meio de suas experiências.” (MERSKEY; BOGDUK, 1994).

Apesar dessa definição, há evidências de que essa associação possa não ocorrer e a dor manifestar-se mesmo sem lesão tissular, baseadas na hipótese de alterações neurofuncionais de origem biomolecular, cuja interação entre neuromediadores, neurotransmissores e transdutores de sinais em uma rede intrincada de sinapses, ainda ser pouco discutida (LACERTE; SHAH, 2003).

### 1.2.2 A Dor na osteoartrite

Embora com os conhecimentos moleculares da fisiopatologia da OA, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos da patogênese da dor nessa doença, sendo este, objeto de muitos estudos. Alterações nas estruturas articulares, incluindo o líquido sinovial, podem desencadear uma resposta inflamatória acompanhada de dor. Classicamente sabe-se que as possíveis causas de dor relacionava-se apenas ao aumento da pressão intraóssea pela congestão vascular do osso subcondral, crescimento dos osteófitos, sinovite e inflamação, fibrose capsular, contratura e fraqueza muscular (CAMANHO; IMAMURA; ARENDT-NIELSEN, 2011).

A hiperalgesia de origem central foi responsável por 61% da dor relatada por pacientes com OA, submetidos a auto-avaliação com a escala visual analógica da dor, o WOMAC (*Western Ontario McMaster Osteoarthritis Index*) e SF-36 (*Medical Outcomes Study 36-item short form Health Survey*), em estudo realizado por Imamura et al. (2008) sugerindo a participação do sistema nervoso central e

periférico na manutenção do estado de dor crônica nestes doentes, independente do processo periférico original (IMAMURA et al., 2008).

### 1.3 Nocicepção

A nocicepção é uma forma especializada de sinalização sensorial, que converte informação sobre lesões teciduais (BARANAUSKAS; NISTRÌ, 1998). Enquanto a dor envolve a percepção do estímulo agressivo, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFİK, 2004).

Os longos axônios das fibras nociceptivas que se localizam em nervos periféricos, estendem-se do gânglio da raiz dorsal e quando são ativados por algum estímulo, enviam sinais através de suas longas fibras, para a coluna dorsal da medula espinal e de lá para o cérebro, a partir de onde se tem a sensação de dor (WOOLF, 2000).

A ativação dos nociceptores leva a despolarização e geração de um potencial de ação que se propaga ao longo de toda fibra (WOOLF; SALTER, 2002). Os nociceptores chegam de maneira altamente organizada ao corno dorsal da medula espinal. A partir dessa região, são acionados neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem na medula espinal. A conexão sináptica entre as fibras aferentes primárias e os neurônios do corno dorsal envolve transmissores como o glutamato e a substância P, que são responsáveis pela produção de potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos e lentos, respectivamente (MILLAN, 1999).

Constatou-se recentemente, que estímulos nociceptivos intensos e repetidos provenientes de tecidos periféricos podem desencadear alterações neuroplásticas no sistema nervoso central (SNC) (STAUD, 2006) (STAUD; SPAETH, 2008). Entre estas alterações destacam-se o aumento da excitabilidade dos neurônios do corno posterior da medula espinal, produzindo hiperalgesia, somação temporal da dor e regulação ascendente (CAMANHO; IMAMURA; ARENDT-NIELSEN, 2011).

A presença da sensibilização periférica e central em pacientes com dor crônica induz alterações neuroplásticas no corno posterior da medula espinal e em

áreas corticais que mantêm e intensificam a dor, formando um ciclo vicioso e sintomas refratários; dessa forma, mesmo a remoção do agente etiológico pode não ser mais suficiente para o alívio dos sintomas, considerando-se, portanto, que outros fatores, distantes da articulação acometida, podem ser os responsáveis pela dor e incapacidade nestes doentes (FISCHER; IMAMURA, 2000) (IMAMURA et al., 2008)

As fibras nervosas aferentes presentes na cápsula articular, na sinóvia, no periósteo, no osso subcondral, nos ligamentos e nos tendões, assim como a sensibilização dos nociceptores regionais, provavelmente contribuem para o início e manutenção da dor (IMAMURA et al., 2008).

#### 1.4 Mecanismos periféricos da dor

Inicialmente os estímulos agressivos são transformados em potencial de ação que através das fibras nervosas periféricas são enviados para o SNC. Os receptores específicos para a dor estão localizados nas terminações de fibras nervosas A $\delta$  e C, e quando são ativados sofrem alterações na sua membrana, deflagrando potenciais de ação. As terminações nervosas dessas fibras (nociceptores) traduzem um estímulo agressivo em estímulo elétrico que será transmitido até o SNC e interpretado no córtex cerebral como dor (ROCHA et al., 2007). Os estímulos dolorosos são transmitidos de forma rápida pelas fibras A $\delta$  que são mielinizadas, ou de forma lenta através das fibras C que são amielínicas (WOOLF; SALTER, 2000).

Os nociceptores são então, sensibilizados pela ação de substâncias denominadas algio gênicas, presentes no ambiente tissular: acetilcolina, histamina, bradicinina, substância P, serotonina, leucotrieno, fator de ativação plaquetário, radicais ácidos, íon potássio, prostaglandinas, tromboxana, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), fator de crescimento nervoso (NGF) e monosfotato cíclico de adenosina (AMPc). Quando ocorre a lesão tecidual, o processo inflamatório é desencadeado, seguindo-se de reparação. As células lesadas liberam enzimas de seu interior para o meio extracelular, onde degradam ácidos graxos de cadeia longa e agem sobre os cininogênios, formando as cininas que são polipeptídeos de A2-caliceína encontrada no plasma e nos tecidos orgânicos sendo ativada pela

inflamação. Ao ser ativada, atua na  $\alpha_2$ -globulina, liberando a calidina (cinina), convertida em bradicinina que irá provocar dilatação arteriolar e aumento da permeabilidade capilar, propagando a reação inflamatória (GUYTON; HALL, 2002).

Na cascata inflamatória o ácido araquidônico é liberado através da ação da fosfolipase na membrana celular e é metabolizado por duas vias enzimáticas sendo que a da ciclooxigenase origina as prostaglandinas, os tromboxanos e as prostaciclina. As prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) agem diminuindo o limiar de excitabilidade dos nociceptores (O'BANION, 1999) (STACK; DUBOIS, 2001). De forma igual, as células inflamatórias, macrófagos e leucócitos, liberam as citocinas que vão contribuir para a migração de novas células para o local da lesão (ROCHA et al., 2007).

Sendo assim, os neuromediadores periféricos facilitam a despolarização da membrana neuronal por tempo prolongado, exarcebando a hiperalgesia, sendo evidenciado pelo aumento da condutividade de canais de sódio ou cálcio ou pela redução do influxo de potássio ou cloro para o meio intracelular (ROCHA et al., 2007).

### 1.5 Mecanismos centrais da dor

Os mecanismos desencadeados pelos estímulos periféricos, provavelmente, não são os únicos fenômenos responsáveis por todas as modificações anatômicas e fisiológicas que ocorrem no SNC, com hiperatividade celular predominantemente nas lâminas I, II e IV do corno dorsal da medula espinal, no tálamo e no córtex cerebral (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006). Os circuitos intramedulares também alteram o estímulo e a resposta dolorosa (ROCHA, 2007).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o SNC sofre alterações provocadas por estímulos nocivos. Os nociceptores quando estão sob estimulação persistente, desencadeiam a dor espontânea, redução do limiar da sensibilidade dolorosa e hiperalgesia, podendo esta ser primária, quando há aumento da resposta ao estímulo doloroso no local da lesão, ou secundária, quando a resposta se estende para áreas adjacentes (ALAN, 1999) (DICKENSON; SULLIVAN, 1987).

Após a lesão tecidual há liberação de neurotransmissores, como somatostatina, substância P, peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina, neurocinina-A, glutamato e aspartato. Esses neuroreceptores ativam os potenciais pós-sinápticos excitatórios e os receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e não-NMDA. Estímulos aferentes frequentes geram a somação dos potenciais de ação e despolarização pós-sináptica cumulativa (ROCHA et al., 2007). Com a ativação dos receptores NMDA pelo glutamato, o íon magnésio é removido do interior do receptor e ocorre o influxo do cálcio para a célula, resultando na amplificação e o prolongamento da resposta do impulso doloroso (WOOLF, 1995) (DICKENSON, 1991).

A sensibilização do corno dorsal da medula espinal pode ser independente (*wind up*, sensibilização sináptica clássica e potenciação de longo termo) ou dependente da transcrição gênica (fase tardia da potenciação de longo termo e facilitação de longo termo).

A sensibilização sináptica clássica é causada por uma sequência sincronizada de estímulos periféricos nociceptivos repetidos, por uma única estimulação nociceptiva assincrônica, aumentando a resposta de fibras aferentes A $\delta$  e C (potenciação homosináptica) e de fibras A $\beta$  não estimuladas (potenciação heterosináptica), como consequência da liberação de aminoácidos excitatórios, peptídeos e de neurotrofinas, todos causando a sensibilização sináptica clássica do corno dorsal da medula espinal (WOOLF; SALTER, 2000).

O glutamato e o aspartato representam os aminoácidos excitatórios e se ligam a receptores específicos do tipo ionotrópico ou metabotrópico. Os ionotrópicos (os receptores alfa-amino-5-metil-4-isoxazolpropilônico - AMPA, o cianeto e o NMDA) são receptores rápidos e possuem o local de ligação do neurotransmissor como parte integrante de um canal iônico, enquanto os metabotrópicos são receptores lentos ligados à proteína G. Os peptídeos (a substância P e o peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina – CGRP) ligam-se as neurocininas do tipo NK-1 e NK-2, enquanto as neurotrofinas ligam-se as tirocinases tipo A e B (ROCHA et al., 2007) (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006).

Após a ativação do glutamato em seu receptor específico NMDA, ocorre a ativação dos segundos mensageiros adenosinamonofosfato cíclico (AMPc), proteinacinasas A (PKA) e C (PKC), fosfatidilinositol, fosfolipase C e fosfolipase A, que promovem a abertura dos canais de cálcio, e conseqüentemente, a produção de



prostaglandinas e óxido nítrico, que saem do meio intracelular em direção à fenda sináptica, causando mais liberação de glutamato, aspartato, substância P e CGRP (JI et al., 2003).

## 1.6 O papel do glutamato

O glutamato é o principal aminoácido excitatório do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). É um neurotransmissor com importante função na sensibilização central e na manutenção da dor crônica, sendo encontrado em níveis elevados no líquido sinovial de pacientes com OA (BORSOOK, 2009) (HOCKING; COUSINS, 2003) (PETRENKO et al., 2003).

O glutamato é sintetizado a partir da glutamina, por ação da enzima glutaminase. Pode ser sintetizado, também, a partir do  $\alpha$ -cetogluturato, um intermediário do ciclo de Krebs, por ação da enzima GABA transaminase, que o converte em glutamato. É amplamente distribuído no cérebro e demais regiões do SNC, e é armazenado em vesículas nas sinapses. Estudos farmacológicos, eletrofisiológicos e comportamentais (BONNET; WALSH, 2005) (LORENZ; RICHTER, 2006) (BLEAKMAN; NISENBAUM, 2006) sugerem que os receptores de glutamato exercem importante função nas vias de dor e que sua modulação pode ter um potencial terapêutico em várias modalidades de dor crônica, incluindo a dor inflamatória articular (MILLER et al., 2011).

Mc Nearney et al. (2004) avaliaram os níveis de neurotransmissores aminoácidos excitatórios (EAA), incluindo o glutamato, o aspartato, TNF-alfa, quimiocinas e citocinas no líquido sinovial de doentes portadores de artropatias ativas, incluindo a OA (GARCIA; ISSY; SAKATA, 2002). Os dados encontrados expandiram a relação dos níveis de neurotransmissores às citocinas e quimiocinas, e sugerem ainda, que o glutamato e o aspartato, contribuem para o processo inflamatório periférico evidenciando que células sinoviais expostas ao aumento patológico dos níveis de glutamato, podem desencadear uma resposta inflamatória ou contribuir para sua manutenção (MC NEARNEY et al., 2004).

## 1.7 Receptor N-Metil-D-aspartato

Existem evidências consideráveis que a dor associada ao tecido periférico ou lesão de nervo, envolve a ativação de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (WOOLF, 1995). Consistente com isso, o comportamento dos antagonistas dos receptores NMDA tem sido relacionados no alívio da dor de forma eficaz, mostrados em modelos animais, bem como em situações clínicas (HEWITT, 2000).

Embora os receptores NMDA centrais, especialmente os localizados na medula espinal, ainda recebam atenção, há evidências que sugerem que aqueles localizados em tecidos periféricos desempenham um importante papel na nocicepção e, em situações de dor crônica, devem ser considerados como alvo potencial para intervenção terapêutica (YATINDRA; RAJESH; SUSHIL, 2005).

Em estudos morfológicos em animais foram identificados receptores NMDA nos tecidos periféricos somáticos (CARLTON; HARGETT; COGGESHALL, 1995), encontrados nas articulações em modelos de rato e expressos em nervos e tendões humanos, em conjunto com o aumento de glutamato, sendo implicados na patogênese da dor crônica em tendões (YATINDRA; RAJESH; SUSHIL, 2005)

Os receptores NMDA são altamente permeáveis ao cálcio, ao sódio e ao potássio. Identificam-se três famílias de receptores, formadas por subunidades denominadas NR1, NR2 (A, B e C) e NR3 (A e B). A associação NR1-NR2B é a mais funcional e importante que tem sido alvo de pesquisas dos antagonistas terapêuticos por sua contribuição na nocicepção. O papel do receptor NMDA no processo de sensibilização central e cronificação dos processos dolorosos causou interesse clínico em compostos que exerçam ação antagonista de suas propriedades, tais como a cetamina, metadona, amantadina e dextrometorfano, que diferem quanto ao nível de atividade nesse receptor (JAMERO et al., 2011).

A cetamina tem sido objeto de estudos por ser uma dos poucos antagonistas de receptores NMDA disponível para uso clínico. Entretanto, pouco se sabe a respeito de sua administração por outras vias que não a endovenosa e a intramuscular (GARCIA et al., 2008).

## 1.8 A Cetamina

### 1.8.1 Características farmacológicas

A cetamina, 2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)-ciclohexanona, com fórmula molecular  $C_{13}H_{16}ClNO$  é uma fenciclidina lipossolúvel, possui peso molecular de 238 daltons, pKa de 7,5, e se apresenta em solução aquosa ligeiramente ácida sob a forma de cloridrato (GARCIA et al., 2008) (REICH; SILVAY, 1989).

A cetamina contém um carbono quiral, se apresentando como uma mistura racêmica de dois isômeros ópticos ativos (enantiômeros), com propriedades farmacológicas diferentes. O isômero levogiro, a S(+) cetamina é considerada três a quatro vezes mais potente para o alívio da dor, com um melhor índice terapêutico que o isômero dextrogiro R(-) cetamina. (GARCIA et al., 2008).

Sua biodisponibilidade é de 93% (GARCIA et al., 2008) e sua meia-vida plasmática é de 186 minutos (GRAHAM; COUSINS, 2003). O metabolismo da cetamina é feito pelas enzimas microssomais hepáticas através de N-desmetilação, formando a norcetamina que é hidroxilada a hidroxinorcetamina, esta sendo conjugada a derivados glucuronídeos hidrossolúveis e excretados pela urina. Além do fígado, o metabolismo também é realizado nos rins, intestino e pulmões (HIROTA; LAMBERT, 2011).

A cetamina pode ser administrada através das vias venosa, muscular, oral, retal e nasal, porém, na prática clínica, as vias venosa e muscular são as mais utilizadas por alcançarem a concentração plasmática com maior rapidez (SANDLER; SCHMID; KATZ, 1998). Após a administração venosa, o efeito máximo ocorre em 30 a 60 segundos e a meia-vida de distribuição é relativamente curta, de 11 a 16 minutos. Por via intramuscular é rapidamente absorvida, com meia-vida de absorção de dois a 17 minutos (OLIVEIRA et al., 2004).

A anestesia produzida pela cetamina é muito diferente daquela habitualmente observada com outros hipnóticos sendo qualificada como dissociativa, caracterizada por um estado cataléptico, em que o paciente fica com os olhos abertos, com nistagmo, conservando os reflexos corneano e fotomotor; além disso, há hipertonia muscular e uma analgesia profunda. Esses efeitos parecem resultar de

uma dissociação funcional e eletrofisiológica entre os sistemas tálamo-neocortical (inibido) e límbico (estimulado). Geralmente, estão associados fenômenos psicodislépticos, como perturbações visuais e auditivas, alterações do humor e da imagem corporal, sensação de flutuação, despersonalização, sonhos, pesadelos, alucinações e *flash-backs*, que podem aparecer por várias semanas após o uso, sendo mais comuns em pessoas de meia-idade, com personalidade patológica e no sexo feminino. Também estão associados a dosagens maiores (>2mg.kg, por via venosa), concentração plasmática e maior velocidade de administração (>40 mg.min), estando a S(+) cetamina relacionada a um menor percentual destes distúrbios que a mistura racêmica (WHITE; WAY; TREVOR, 1982).

A neurofarmacologia da cetamina é complexa, por sua molécula interagir com vários tipos de receptores como gabaérgicos, opióides, monoaminérgicos, colinérgicos, glutamatérgicos e com canais iônicos de cálcio, sódio e potássio, em diversos locais de ligação (GARCIA et al., 2008). Embora sendo contraditória entre alguns autores, a cetamina não tem mecanismo de ação central na interação com receptores do ácido-aminobutírico (GABA), como os outros hipnóticos, com sua ação discutível sobre esses receptores (FLOOD; KRANSOWSKI, 2000).

O mecanismo de ação mais importante da cetamina é sobre os receptores do glutamato, sendo esta sua ação farmacológica fundamental. (GARCIA et al., 2008).

## 1.9 COX-2

A ciclo-oxigenase (COX), ou Prostaglandina Sintetase ou Prostaglandina Endoperóxido Sintetase, trata-se de uma enzima essencial no processo de síntese das prostaglandinas e tromboxanos, a partir principalmente da cascata do ácido araquidônico e mais raramente do ácido eicosatrianóico e do ácido eicosapentaenóico. Sua constituição molecular é de uma glicoproteína dimérica e é encontrada preferencialmente no retículo endoplasmático das células, dentro do folheto interno da bicamada lipídica de fosfolipídios da membrana (SANO et al., 1992).

As prostaglandinas são conhecidas por participarem de diversos processos que ocorrem no homem, sejam eles fisiológicos ou patológicos. Participam, por exemplo, da vasodilatação ou vasoconstrição, da contração ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina, da regulação da pressão arterial, do processo de ovulação, do metabolismo ósseo, do aumento do fluxo sanguíneo renal (resultando em diurese, natriurese, caliurese e estimulação da secreção de renina), da proteção da mucosa gástrica e regulação do fluxo sanguíneo local, da inibição da secreção ácida gástrica, do crescimento e desenvolvimento nervoso, dentre outros (WILLOUGHBY; MOORE; COLVILLE-NASH, 2000). Dessa maneira temos as prostaglandinas que participam dos processos fisiológicos e são chamadas constitutivas, e as que se manifestam em resposta a estímulos inflamatórios e contribuem para o desenvolvimento do edema, hiperalgesia e febre, e são chamadas indutivas (RADI; KHAN, 2005).

A síntese das prostaglandinas inicia-se pela ação da COX que catalisa a adição do oxigênio molecular ao ácido araquidônico, para formar, inicialmente, o endoperóxido intermediário prostaglandina  $G_2$  (PGG). A mesma enzima, por sua atividade peroxidase, catalisa a redução desta prostaglandina para formar a prostaglandina  $H_2$  (PGH<sub>2</sub>). As prostaglandinas G e H (PGG e PGH) apresentam pouca atividade e servem como substrato para a formação de diferentes prostaglandinas e tromboxanos (KULKARNI; JAIN; SINGH, 2000). Existem duas isoformas distintas da COX: a ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e a ciclo-oxigenase-2 (COX-2). Uma terceira forma (ciclo-oxigenase-3) existe provavelmente e predomina no tecido neural (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). As duas isoformas COX-1 e COX-2 têm estrutura protéica primária similar e função catabólica semelhante (KULKARNI; JAIN; SINGH, 2000). O número de aminoácidos que compõe as duas isoenzimas é também bastante semelhante, variando de 599 aminoácidos para a COX-1 e de 604 aminoácidos para a COX-2 (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

A COX-1, entretanto, é encontrada constitutivamente na maioria dos tecidos no homem, participando das reações celulares fisiológicas, em especial nos vasos, plaquetas, estômago e rins. A COX-2 é a isoforma presente predominantemente durante o processo inflamatório, induzível nas células pela presença de citocinas (interleucina-1, interleucina-2 e do fator alfa de necrose tumoral), ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente por

células envolvidas na inflamação, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. (FITZGERALD; PATRONO, 2001).

John Vane (1971) descobriu que o processo inflamatório poderia ser suprimido pela inibição da COX, impedindo a síntese das prostaglandinas, esclarecendo assim o mecanismo de ação dos anti-inflamatórios semelhantes à aspirina, sendo laureado com o Prêmio Nobel de Medicina em 1982. Até então não se conhecia a isoforma COX-2, que só viria a ser conhecida em 1991.

Com a descoberta da COX-2, da sua ação específica no processo inflamatório e a determinação de sua estrutura, surgiu uma nova perspectiva terapêutica, onde foi possível desenvolver fármacos mais seletivos que reduzem a inflamação sem afetar a COX-1, protetora do estômago e rins, dando origem a uma nova geração de compostos anti-inflamatórios denominados de inibidores específicos da COX-2, ou Coxibes (FITZGERALD; PATRONO, 2001).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para execução dos experimentos foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultos, machos, com peso variando de 230g - 280g, cedidos pela central do Biotério da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Os procedimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Maranhão. Foi respeitada a legislação brasileira para o uso de animais em experimentação (Lei Arouca n° 11.794/2008) e as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão sob o protocolo de número 23115012030/2009-05 (ANEXO 1).

Os animais foram aclimatados e submetidos a condições controladas de umidade (45-65%), luz artificial em ciclos de 12 horas claro/escuro, em um ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e com livre consumo de ração e água. Uma semana antes de iniciar o protocolo experimental, os animais foram submetidos aos aparelhos e testes comportamentais diariamente para adaptação.

### 2.1 Modelo de osteoartrite induzida por monoiodoacetato de sódio

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40mg/kg) intraperitoneal (i.p). Foram considerados anestesiados na ausência de reflexos corneanos e interdigitais; em seguida foram imobilizados em prancha de madeira de 20 cm x 30 cm. Foram realizados tricotomia da pata posterior direita, antisepsia local com solução tópica de polivinil-pirrolidona-iodo 10% (Povidine Tópico®) e colocação de campo fenestrado. A lesão articular foi induzida por uma injeção única, intra-articular de 2mg de monoiodoacetato de sódio (MIA), em um volume máximo de 50µL de solução. Com o joelho flexionado em 90°, a solução de MIA foi injetada no joelho direito, através do ligamento patelar, utilizando-se uma agulha 26G, no espaço intra-articular fêmuro-tibial. O joelho contralateral recebeu igual volume de solução salina para controle do próprio animal (COMBE; BRAMWELL; FIELD, 2004)

(FERNIHOUGH et al., 2004) (POMONIS et al., 2005).

Neste estudo, foi utilizado um modelo experimental de osteoartrite induzida por MIA, pois essa substância provoca a indução com características específicas que se aproximam das alterações importantes que ocorrem na OA, tais como esclerose do osso subcondral, formação de osteófitos, lesão da cartilagem e alterações de biomarcadores como glicosaminoglicanos e metaloproteinase (COMBE; BRAMWELL; FIELD, 2004) (GUZMAN et al., 2003) (LEE et al., 2009).

## **2.2 Desenho experimental do estudo**

Os animais foram divididos em três grupos com vinte e quatro animais cada, totalizando 72 animais. Em dois grupos (Grupo OA-Salina e Grupo OA-Cetamina) foi induzido osteoartrite com monoiodoacetato de sódio (MIA) e no terceiro grupo (Grupo sem osteoartrite) não foi induzida a doença. As avaliações quanto à presença de sinais comportamentais de dor crônica foram realizadas antes da indução de OA e no 5º dia após a indução. No 7º dia seguido a indução, dois grupos receberam injeção intra-articular (ia) de salina 0,9% em volume máximo de 50µL e o terceiro grupo recebeu injeção de S(+) cetamina (Ketamin 50mg/ml - Cristália®) na dose 0,5mg/kg, respectivamente. Ainda no 7º dia após a indução de OA e seis horas após a injeção das substâncias, os animais foram avaliados quanto à presença de sinais comportamentais de dor crônica. Essa avaliação foi repetida nos dias 10,14, 18, 24, 28 pós-indução. Nos dias 7, 14, 21 e 28 os animais foram anestesiados e sacrificados (seis animais de cada grupo por dia) para coleta da membrana sinovial para análise imuno-histoquímica. (Figura 1)



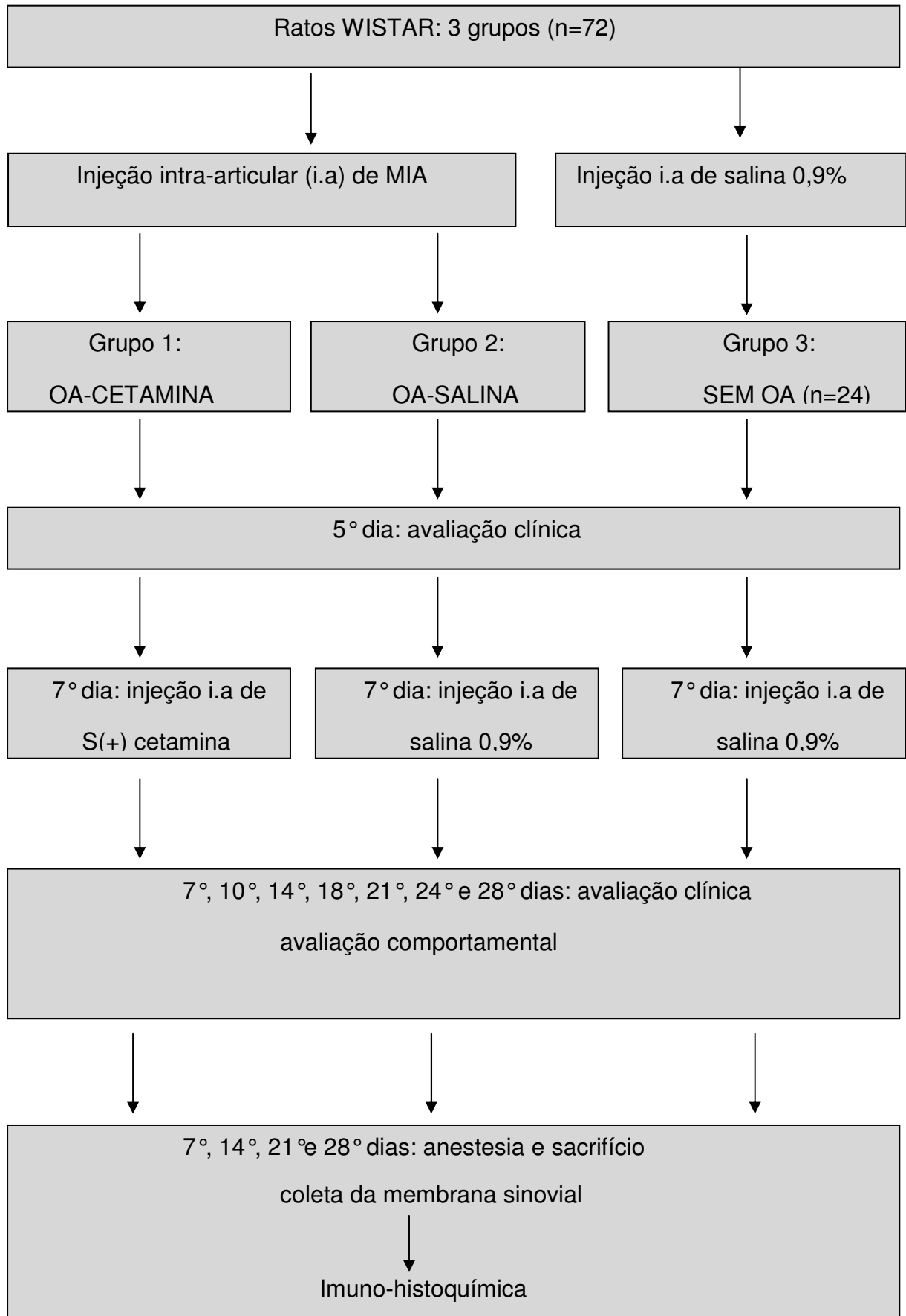


Figura 1: Esquema ilustrativo do protocolo experimental.

Nosso grupo também estudou a análise de sinais comportamentais analisados através da Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada (*RotaRod test*), Teste de Incapacitância/Distribuição do Peso nas patas traseiras (*Weight Bearing*), Alodínia Mecânica (*Von Frey Test*), Hiperálgia Mecânica (*Randall Sellito Test*) e Força de Preensão (*Grip Force Test*), que fez parte de uma dissertação de mestrado de Eugênio dos Santos Neto do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Maranhão, e que já foi concluída. A segunda parte do estudo foi dirigida para a análise da expressão da COX-2.

### 2.3 Imuno-histoquímica

Após anestesia com tiopental sódico (40 mg/kg) e a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, as membranas sinoviais foram extraídas e fixadas em formol tamponado a 10%. As amostras foram desidratadas em séries de etanol e embebidas em parafina, sendo realizados cortes de 4µm dispostas em lâminas silanizadas.

As peças contidas nos blocos de parafina receberam identificação e foram encaminhados ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, em São Paulo. Os blocos contendo tecido da membrana sinovial foram desparafinizados em xilol, hidratadas com álcool absoluto e tratadas com tampão citrato (pH 6,0) em panela de pressão por 25 minutos, resfriamento de 10 minutos e cinco minutos em água corrente. Após, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% por cinco minutos para bloqueio da peroxidase endógena, seguido de lavagem em água corrente por cinco minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com 100µl de *Protein Block*, com período de incubação de 20 minutos na câmara úmida/escuro. Seguiu-se com a incubação com anticorpo primário COX-2, realizada através da diluição 1:1000 (Novocastra), utilizando-se 100µl por duas horas.

O sistema de visualização utilizado foi o *Advance HRP (DAKO)*, com lavagem dos cortes três vezes com solução tampão salina (PBS) uma vez por cinco minutos cada amostra. Adicionou-se 100µl de *Advanced HRP Link* por 30 minutos,

em seguida as lâminas foram lavadas três vezes com PBS uma vez por cinco minutos. Seguiu-se com adição de 100µl de *Advanced HRP Enzyme* por 30 minutos e depois, nova lavagem das lâminas três vezes, cada vez por cinco minutos.

A coloração das lâminas foi realizada com diluição do DAB (3,3'-diaminobenzidina) 1:50, adição de 100 µl de DAB, lavagem em água corrente por cinco minutos, hematoxilina por 45 segundos, passagem rápida pelo diferenciador e água corrente por cinco minutos.

As lâminas foram passadas rapidamente por quatro banhos de álcool absoluto, em seguida, passadas rapidamente por álcool absoluto e xilol, deixadas em xilol absoluto para montagem das mesmas e visualizadas em microscopia óptica.

#### **2.4 Análise da imuno-histoquímica**

A avaliação de COX-2 deu-se por patologista que desconhecia os efeitos utilizados nos tecidos. O protocolo de interpretação adotado foi a imunomarcagem citoplasmática da COX-2 em células da membrana sinovial, tecido conjuntivo e adiposo, conforme a intensidade desta marcação. Foi considerada positiva, quando pelo menos 1% das células marcou o anticorpo em seu citoplasma.

#### **2.5 Análise estatística**

A análise dos resultados foi realizada através do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para tabelas de contingências. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado indicativo de significância e os dados obtidos foram analisados utilizando-se o software *Graph pad InStat®* (*GraphPad software*, San Diego, CA).

### 3 RESULTADOS

O estudo constava inicialmente com 72 ratos. Na etapa da extração da membrana sinovial ocorreram 12 perdas por dificuldade na coleta, totalizando 60 amostras para análise imuno-histoquímica. Durante esta etapa, ocorreram 17 perdas por não aderência do material à lâmina ou por ausência de coloração no tecido. Foram, portanto, utilizadas 43 lâminas para leitura dos resultados. O grupo sem OA tratado com salina foi representado por 12 (30,2%) casos, o grupo com OA tratado com salina por 15 (34,8%) casos e o grupo com OA tratado com S(+) cetamina também representado por 15 (34,8%) casos. (Tabela 1)

Tabela 1 – Distribuição dos grupos de amostras da membrana sinovial.

Grupo	N	( % )
Salina sem OA	13	(30,2)
OA com salina	15	(34,8)
OA com cetamina	15	(34,8)

Foi observada reatividade de COX-2 (positivo) em 28 (65,1%) amostras. Destas, 16 (57,8%) representavam os grupos tratados com salina e 12 (42,8%) o grupo tratado com S(+) cetamina. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. (Tabela 2).

Tabela 2 – Reatividade imuno-histoquímica da COX-2 nas amostras de membrana sinovial sem OA, com OA tratada com salina e com OA tratada com S(+) cetamina.

Grupo	n	COX-2 positivo		p*
		N	(%)	
Salina sem OA	13	7	(53,8)	0,3069
OA com salina	15	9	(60)	
OA com cetamina	15	12	(80)	

No Grupo OA + salina observamos a positividade citoplasmática para COX-2 em células da membrana sinovial, através do padrão granular acastanhado com forte intensidade na coloração.

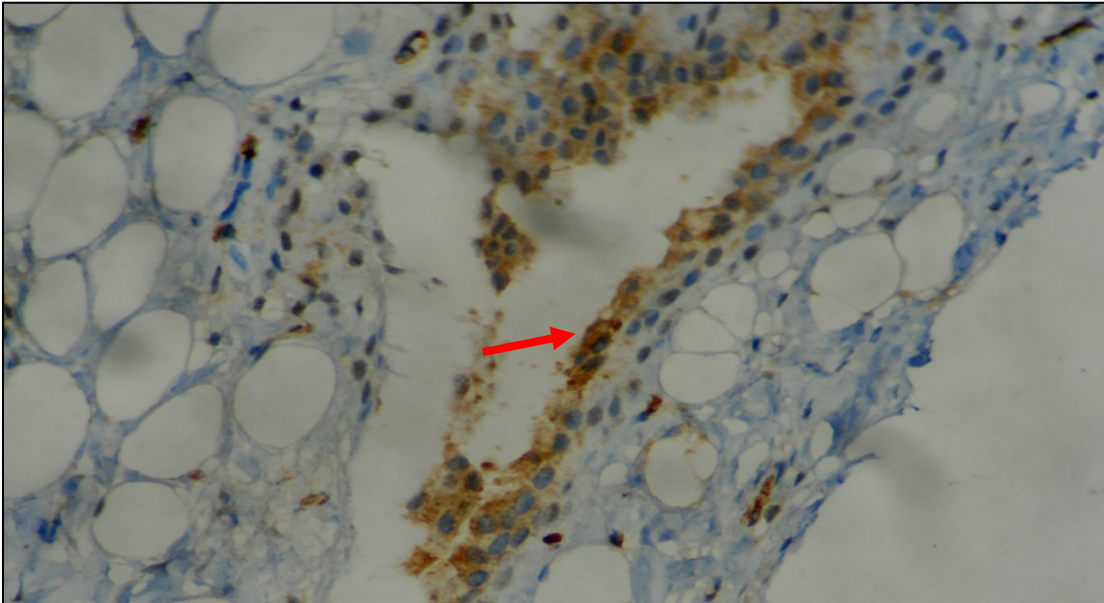


Figura 2 – Fotomicrografia da positividade citoplasmática para COX-2 no Grupo OA + salina.

No Grupo OA + cetamina a positividade da COX-2 foi observada nos fibroblastos e nos adipócitos, nesse caso, com forte intensidade na coloração. (Figura 3)

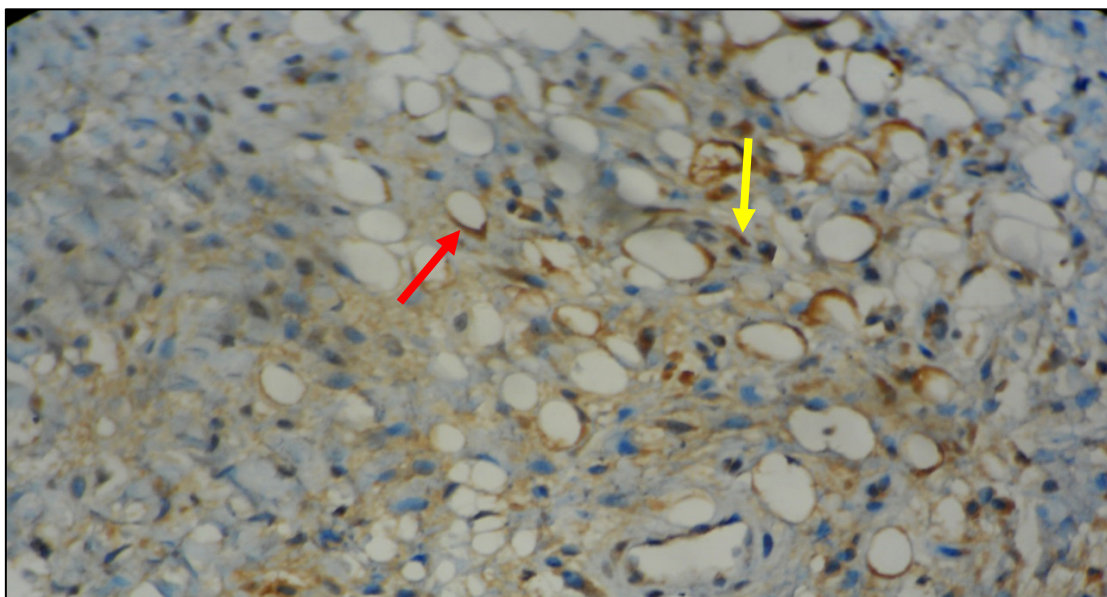


Figura 3 – Fotomicrografia da positividade citoplasmática para COX-2 no Grupo OA + cetamina.

No Grupo OA + cetamina também ocorreu positividade citoplasmática da COX-2 nas células da membrana sinovial.

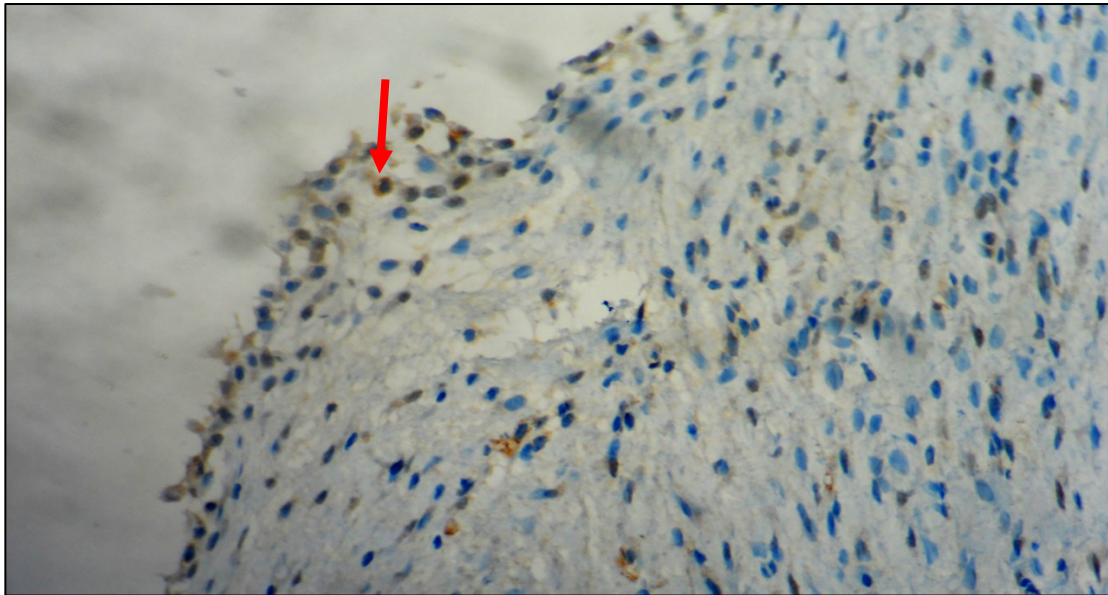


Figura 4 - Fotomicrografia da positividade citoplasmática para COX-2 Grupo OA + cetamina.

No Grupo sem OA também ocorreu positividade da COX-2 no citoplasma de adipócitos, embora com fraca intensidade. Observamos o controle interno que é o citoplasma do endotélio vascular.

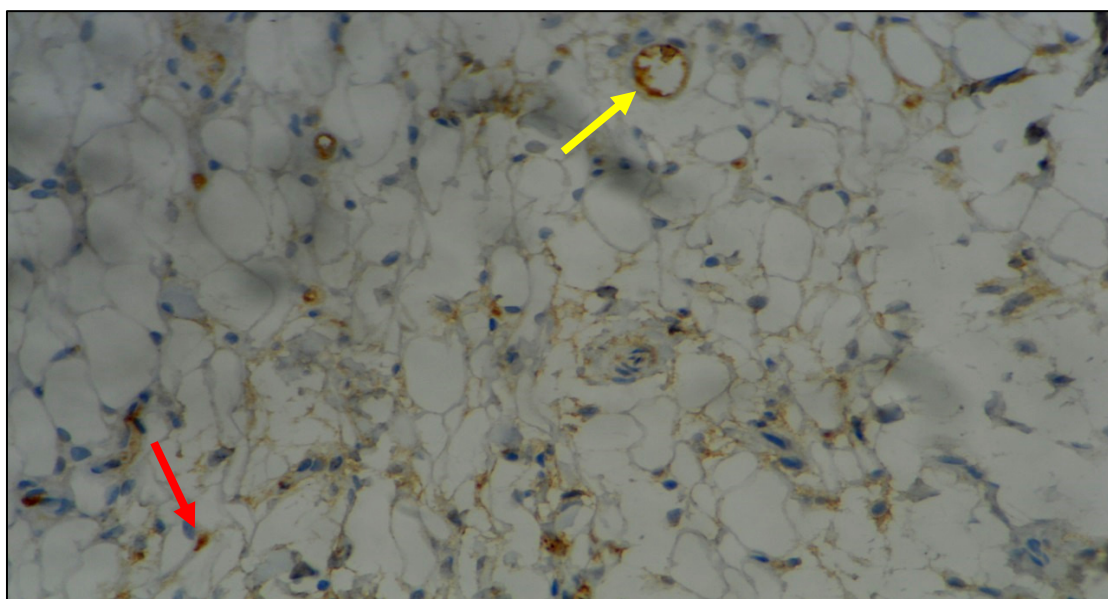


Figura 5 – Fotomicrografia da positividade citoplasmática para COX-2 em adipócitos. (Grupo salina sem OA).



#### 4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Durante a resposta inflamatória, mediadores protéicos como as citocinas e as prostaglandinas, juntamente com substâncias liberadas localmente como a histamina, bradicinina e substância P são responsáveis pela amplificação do processo inflamatório. As prostaglandinas possuem um papel de destaque na inflamação, quando observamos um aumento na sua produção, contribuindo para o aparecimento da dor, tanto periférica quanto centralmente. (NIEDJA et al., 2008)

A isoenzima ciclo-oxigenase-2 é expressa em resposta a estímulos inflamatórios e mitogênicos sendo, portanto, responsável pela formação das prostaglandinas associadas à resposta inflamatória. Tais evidências sugeriram que a inibição da COX-2 teria efeito terapêutico anti-inflamatório. A expressão de COX-2 é sabidamente elevada nos processos inflamatórios articulares, como na artrite reumatoide e na OA, como demonstrado por Sano et al. (1992).

O modelo de MIA de OA empregado neste estudo é um modelo bem estabelecido e útil para o estudo dos mecanismos de dor em ambos os sistemas nervosos, central e periférico, é também um modelo relevante para o ensaio de potenciais agentes terapêuticos. (AISHA et al., 2012). O MIA em ratos imita as características clínicas e histopatológicas de OA humana com inflamação local da articulação do joelho (FERNIHOUGH et al., 2004) como a liberação de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas.

Até o momento não há na literatura estudos empregando a S(+) cetamina por via intra-articular, como agente anti-inflamatório em modelos animais de osteoartrite de joelho semelhante ao do presente estudo. Esta situação pioneira teve como principal argumento a presença da enzima pró-inflamatória COX-2 (SANO et al., 1992) na articulação osteoartrítica e ao efeito anti-inflamatório da S(+) cetamina já demonstrado em outras situações.

Várias investigações *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que, além da sua ação anestésica, a cetamina possui um efeito anti-inflamatório. (DALE et al., 2012). Numerosos mecanismos têm sido mostrados para mediar esse efeito, incluindo a inibição das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- $\alpha$ ), inibição da função dos neutrófilos, regulação negativa das enzimas pró-inflamatórias induzível ciclo-oxigenase-2 e óxido nítrico sintetase (iNOS). (DALE et al., 2012).

Foi demonstrado que a cetamina atuou inibindo a expressão de genes pró-inflamatórios, como foi observado por Suliburk et al. (2005), através da redução de lipopolissacarídeo (LPS) e consequente diminuição da regulação de iNOS e COX-2, reduzindo lesões teciduais associadas a processos inflamatórios em tecidos hepáticos.

A cetamina também apresentou efeitos anti-inflamatórios durante a indução e manutenção da artrite, quando aplicada por via intratecal em um modelo de artrite crônica antígeno induzida em animais, reduzindo significativamente a gravidade de artrite, com regressão do inchaço articular através da diminuição da infiltração de células inflamatórias e da destruição articular tanto na fase aguda quanto na crônica. Este estudo claramente mostra uma ação central da cetamina sobre a inflamação. (SCHADRACK et al, 1999).

No presente estudo não ocorreu a supressão periférica da COX-2 após a injeção de S(+) cetamina por via intra-articular em modelo de osteoartrite em joelhos de ratos, em comparação aos grupos controles, de maneira estatisticamente significativa. Uma hipótese para este resultado é que talvez sua ação anti-inflamatória seja mediada apenas por citocinas ou por outra via ainda não conhecida. Ainda, foi utilizada uma dose única, que pode ter sido insuficiente para demonstrar uma ação anti-inflamatória.

Todos os grupos analisados mostraram positividade na expressão da COX-2, sendo que o grupo controle sem OA tratado com salina demonstrou presença da enzima em 58,3% dos casos. Possivelmente esse percentual seja atribuído a indução de inflamação, com consequente produção de COX-2, causadas por repetidas punções realizadas para obtenção do lavado articular do líquido sinovial, para coleta de amostras que foram utilizadas em outras análises. A própria punção para injeção das substâncias pode ter desencadeado um processo inflamatório local induzindo a presença de COX-2. Durante os procedimentos da execução do método ocorreram algumas perdas que podem ter interferido na análise estatística dos resultados, constituindo-se uma limitação desse estudo.

No modelo estudado não foi possível observar uma ação anti-inflamatória da S(+)-cetamina mediada pela redução da expressão da COX-2 em membrana sinovial. Futuros estudos devem ser realizados com o intuito de elucidar os mecanismos periféricos anti-inflamatórios deste fármaco.



## REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S.B et al. Introduction to the OARSI FDA OA initiative. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 19, p. 475 –477, Mar. 2011 [Epub ahead of print].
- AISHA, S.A. et al. Suppression of pain and joint destruction by inhibition of the proteasome system in experimental osteoarthritis. **Pain**, v. 153, Issue 1, p. 18-26, Jan. 2012.
- ALAN, N. S. Controle da dor no período perioperatório. **Clin Cirurg Am Norte**, v. 79, p.197-211, 1999.
- ALMEIDA, T. F; ROIZENBLATT, S; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.
- AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY SUBCOMMITTEE ON OSTEOARTHRITIS GUIDELINES. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 9, p. 1905-1915, 2000.
- AYESH et al. Effects of intra-articular ketamine on pain and somatosensory function in temporomandibular joint arthralgia patients. **Pain**, 137, p. 286-294, 2008.
- BARANAUSKAS, G.; NISTRÌ, A. Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 349-365, 1998.
- BATRA, Y.K et al. Bupivacaine/ketamine is superior to intra-articular ketamine analgesia following arthroscopic knee surgery. **Can J Anesth**, v. 52, n. 8, p. 832-836, 2005.
- BENITO, M.J et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 64, p. 1263-1267, 2005.
- BLEAKMAN, D; ALT, A; NISENBAUM, E.S. Glutamate receptors and pain. **Semin Cell Dev Biol**, v. 17, p. 592-604, 2006.
- BOETTGER, M.K et al. Spinally applied ketamine or morphine attenuate peripheral inflammation and hyperalgesia in acute and chronic phases of experimental arthritis. **Brain Behav Immun**, Mar; 24(3), p. 474-485, 2010.
- BONNET, C.S; WALSH, D.A. Osteoarthritis, angiogenesis e inflammation. **Rheumatology**, v. 44, p.7–16, 2005.
- BORSOO, K. D. Ketamine and chronic pain-going the distance. **Pain**, v. 145, p.271-272, 2009.
- BRANDT K. D; MANKIN H. J; SHULMAN L.E. Workshop on etiopathogenesis of osteoarthritis. **J Rheumatol**, v. 13 (6), p. 1126-1160, 1986.

CAMANHO, G.L. Tratamento da osteoartrose do joelho. **Rev Bras Ortop**, May. v.36, n. 5, p. 135-140, 2001.

CAMANHO, Gilberto Luis; IMAMURA, Marta; ARENDT-NIELSEN, Lars. Gênese da dor na artrose. *Rev. Bras. Ortop.*, São Paulo, v. 46, n. 1, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-36162011000100002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-36162011000100002&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 11 fev. 2013.

CARLTON, S. M; HARGETT, G. L; COGGESHALL, R. E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Neurosci Lett**, v.197, p. 25–28, 1995.

CHANDRASEKHARAN, N.V et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

COIMBRA, I.B; REZENDE, M. U; PLAPLER, P. G. **Osteoartrite (artrose)** - cenário atual e tendências no Brasil, Jan, ed. 1, LIMAY EDITORA, v. 01, pp. 84, 2012.

COMBE, R.; BRAMWELL, S.; FIELD, M.J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? **Neurosci. Lett.**, Nov, v. 370, n. 2-3, p. 236-240, 2004.

DAL, D et al. The efficacy intra-articular ketamine for postoperative analgesia in outpatient arthroscopic surgery. **Arthroscopy**, v. 20, p. 300-5, 2004.

DALE, O et al. Does Intraoperative Ketamine Attenuate Inflammatory Reactivity Following Surgery?: a systematic review and meta-analysis. **Pain Medicine**, Oct, v. 115, n. 4, p. 934-943, 2012.

DICKENSON, A.H. Recent advances in the physiology and pharmacology of pain: plasticity and its implications for clinical analgesia. **J Psychopharm**, v,5, p. 342-351, 1991.

DICKENSON, A.H; SULLIVAN, A.F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. **Pain**, v, 30, p. 349-360, 1987.

DOERTHY, M. Pain in osteoarthritis. In: Giamberardino M.A, editor. **Pain 2002 - An updated Review: Refresher course syllabus**. Seattle, WA: IASP Press; p. 51-7, 2002.

FERNIHOUGH, J. et al. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. **Pain**, Nov., v. 112, n.1, p. 83-93, 2004.

FISCHER, A. A; IMAMURA, M. New concepts in the diagnosis and management of musculoskeletal pain. In: Lennard TA, editor. **Pain procedures in clinical practice**. 2nd ed. Philadelphia: Hanley & Belfus, p. 213-29, 2000.

FITZGERALD, G.A; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **N Engl J Med**, v. 345, p. 433-442, 2001.

FLOOD, P.; KRANSOWSKI, M.D. Intravenous anesthetics differentially modulate ligand-gated ion channels. **Anesthesiology**, v. 92, p.1418-1425, 2000.

GARCIA, J.B.S et al. Cetamina. In: SAKATA, R.K; ISSY, A.M. (Coords). **Fármacos para tratamento da dor**. Barueri, SP: Manole, p. 269-284, 2008.

GARCIA, J.B.S; ISSY, A.M; SAKATA, R. K. Cytokines and Anesthesia. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 52:1, p. 86-100, 2002.

GRAHAM, H; COUSINS, M. J. Ketamine in chronic pain management: an evidence-based review **Anesth Analg**, v. 97, p. 1730–1739, 2003.

GUARÁ SOBRINHO, H et al. Eficácia analgésica do uso da dextrocetamina intra-articular em pacientes submetidos a artroplastia total do joelho. **Rev Bras Anesthesiol** , v. 62:5. p. 665-675, 2012.

GUYTON, A.C; HALL, J.E. Controle Local do Fluxo Sanguíneo pelos Tecidos. In: GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.166-173, 2002.

GUZMAN, R.E. et al. Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: na animal modelo f osteoarthritis. **Toxicol. Pathol**, Jan/Fev. v. 52, n.1, p. 86-100, 2003.

HELMER, K. S et al. Effects of ketamine/xylazine on expression of tumor necrosis fator- $\alpha$ , inducible nitric oxide synthase, and cyclo-oxygenase-2 in rat gastric mucosa during endotoxemia. **SHOCK**, v. 20, n. 1, p. 63–69, 2003.

HEWITT, D.J. The use of NMDA-receptor antagonists in the treatment of chronic pain. **Clin J Pain**. Jun; v. 16 (2 Suppl):S73-9, 2000.

HIROTA, K; Lambert, D. G. Ketamine: new uses for an old drug. **British Journal of Anaesthesia**, v. 107 (2), p. 123–126, 2011.

HOCKING, G; COUSINS, M. J. Ketamine in chronic pain management: na evidence-based review. **Anesth Analg** , v. 97, p. 1730-1739, 2003.

IMAMURA, M et al. Impact of nervous system hyperalgesia on pain, disability, and quality of life in patients with knee osteoarthritis: a controlled analysis. **Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)**, Oct; v. 59, n. 10, p. 1424–1431, 2008.

JAMERO, D. et al. The emerging role of NMDA antagonists in pain management. **US Pharmacist**. 2011. Jobson Publishing. Posted to Medscape.com on 6/22/2011.  
JI, R.R et al. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? **Trends Neurosci**, v. 26, p. 696-705, 2003.

- KAMEKURA, M.D et al. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, p. 632-641, 2005.
- KIDD, B.L. Osteoarthritis and joint. **Pain**, Abr. n.123, p. 6-9, 2006.
- KRAYCHETE, D.C; CALASANS, M.T.A; VALENTE, C.M.L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Rev Bras Reumatol**, Mai/Jun; v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.
- KULKARNI, S.K; JAIN, N.K; SINGH, A. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 22, p. 291-298, 2000.
- LACERTE , M; SHAH, R. V. - Interventions in chronic pain management. 1. Pain concepts, assessment, and medicolegal issues. **Arch Phys Med Rehabil**, v. 84, p. S35-S38, 2003.
- LANE, N.E et al. K. OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, May; v. 19, Issue 5, p. 478-482, 2011.
- LEE, C.H. et al. Intra-articular magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>) reduces experimental osteoarthritis and nociception: association with attenuation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 1 phosphorylation and apoptosis in rat chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, Nov; v. 17, n.11, p. 1485-1489, 2009.
- LORENZ, H; RICHTER W. Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage. **Prog Histochem Cytochem**, v. 40, p. 135-163, 2006.
- LUFT, A; MENDES, F.F. S(+) Cetamina em baixas doses: atualização. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 55, p. 460-469, 2005.
- MAZAR, J et al. Involvement of adenosine in the antiinflammatory action of ketamine. **Anesthesiology**, v. 102, p. 1174–1181, 2005.
- MC NEARNEY , T. Excitatory amino acids, TNF-alfa , and chemokine levels in synovial fluids of patients with active arthropathies . **Clin Exp Immunol**, v. 137, p. 621–627, 2004.
- MERSKEY, H; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain**: description of chronic pain and definitions of pain terms. 2nd ed. Seattle, USA: IASP press 1994.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1-164, 1999.
- MILLER, K.E et al. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacol Ther**, v. 130, p. 283-309, 2011.
- NIEDJA, M. G. C. Enzimas ciclooxigenases 1 e 2: inflamação e gastro- cardíaco proteção. **REPM**, v. 2 (3), p. 13-20, 2008.

O'BANION, M. K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. **Crit Rev Neurobiol**, v. 13, p. 45-82, 1999.

OLIVEIRA, C.M.B et al. Cetamina e analgesia preemptiva. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v. 54, p. 739-752, 2004.

PETRENKO, A.B et al. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. **Anesth Analg**, v. 97, p. 1108-1116, 2003.

POMONIS, J.D. et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. **Pain**, Abr; v. 114, n. 3, p. 339-346, 2005.

RADI, Z.A; KHAN, N.K. Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon and ligament healing. **Inflamma Res**, v. 54, p. 358-366, 2005.

ROCHA, A. P. C. et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Rev. Bras. Anesthesiol**, Fev; Campinas, v.7, n. 1. 2007.

SANDLER, A.N.; SCHMID, R; KATZ, J. Epidural ketamine for postoperative analgesia. **Can J Anaesth**, v. 45, p. 99-102, 1998.

SANO, H. et al. In vivo cyclooxygenase expression in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis and rats with adjuvant and streptococcal cell wall arthritis. **J Clin Invest.**,Jan; v. 89, n.1, p. 97-108, 1992.

SCHADRACK, J et al. Metabolic activity changes in the rat spinal cord during adjuvant monoarthritis. **Neuroscience**, v. 94, p. 595-605, 1999.

SHARMA, L; KAPOOR, D; ISSA, S. Epidemiology of osteoarthritis: an update. **Curr. Opin. Rheumatol**, Mar; v. 18, n.2, p.147-156, 2006.

SILVA, F.C.C et al. Ketamina, da anestesia ao uso abusivo: artigo de revisão. **Rev Neurocienc**, v. 18, p. 227-237, 2010.

STACK, E; DUBOIS, R.N. Regulation of cyclo-oxygenase-2. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, Oct, v.15(5), p.787-800, 2001.

STAUD, R. Are tender point injections beneficial: the role of tonic nociception in fibromyalgia. **Curr Pharm Des**, v. 12(1), p.23-27, 2006.

STAUD, R; SPAETH, M. Psychophysical and neurochemical abnormalities of pain processing in fibromyalgia. **CNS Spectr**, v. 13(3 Suppl 5), p.12-17, 2008.

SULIBURK, J.W et al. Ketamine attenuates liver injury attributed to endotoxemia: role of cyclooxygenase 2. **Surgery**, Aug; v.138(2), p. 134-40, 2005.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v. 231, p. 232-235. 1971.

WHITE, P.F; WAY, W.L; TREVOR, A.J. ketamine, its pharmacology and therapeutic uses. **Anesthesiology**, v. 56, p.119-136, 1982.

WILLOUGHBY, D. A; MOORE, A.R; COLVILLE-NASH, P.R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **LANCET**, v.355, p.646-664, 2000.

WOOLF, C. J, SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288: 1765-1769, 2002.


WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiology of Disease**, v. 7, p. 504-510, 2000.

\_\_\_\_\_. Somatic pain pathogenesis and prevention. **Br J Anaesth**, v.75, p.169-176, 1995

\_\_\_\_\_. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. American College of Physicians; American Physiological Society. **Ann Intern Med**, v.140(6), p. 441-451, 2004.

YATINDRA, K. B; RAJESH, M; SUSHIL, K. B. Bupivacaine/ketamine is superior to intra-articular ketamine analgesia following arthroscopic knee surgery. **Can J Anesth**, v. 52: 8, p. 832–836, 2005.

## ANEXO – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

	<b>Universidade Federal do Maranhão</b> <b>Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação</b> <b>Comitê de Ética em Pesquisa</b>
---	--

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

<b>PROJETO DE PESQUISA</b>	Número do Protocolo	<b>23115 012030/2009-05</b>
<b>PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA</b>	Data de entrada no CEP	<b>29/10/2009</b>
<b>X TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO</b>	Data da assembléia	<b>01/03/2010</b>

**I - Identificação:**

Título do projeto:	<b>Efeito da Cetamina S (+) em modelo experimental de Osteoartrite em Ratos.</b>		
Identificação do Pesquisador Responsável:	<b>Prof. Dr. João Batista Santos Garcia</b>		
Identificação da Equipe executora:	<b>João Batista Santos Garcia, Eugênio dos Santos Neto e Marlene Oliveira da Rocha Borges</b>		
Instituição onde será realizado:	<b>Universidade Federal do Maranhão (UFMA)</b>		
Área temática:	<b>III</b>	Multicêntrico:	<b>Não</b>
Cooperação estrangeira:	<b>Não</b>	Patrocinador:	<b>Não</b>
		Data de recebimento:	<b>27/12/2009</b>
		Data de devolução:	<b>01/03/2010</b>

**II - Objetivos:****Geral:**

**Determinar o efeito potencial da Cetamina S (+) em ratos portadores de osteoartrite induzida experimentalmente**

**Específico:**

- Determinar o efeito da Cetamina S (+) através de parâmetros radiológicos, clínicos, histológicos e da dosagem de citocinas e contagem de células.

**III - Sumário do projeto:**

Esta pesquisa pretende avaliar o potencial do efeito aantiinflamatório da Cetamina S(+) sobre ratos acometidos de osteoartrite, induzida experimentalmente. Para tanto, serão adotados procedimentos de avaliação de parâmetros clínicos e radiológicos, bem como observação dos cortes histológicos das lesões, contagem de células e dosagem de citocinas no líquido sinovial. Ao final é esperado que os dados obtidos sirvam como fonte para pesquisas futuras na área, além de publicação dos resultados obtidos em periódicos, contribuindo para o aumento de bibliografia na área e fortalecimento do grupo de pesquisa na instituição.

**IV - Comentários do relator:**

Embora conste o orçamento, não identificamos claramente a fonte de recursos e por essa razão deixamos de identificar o patrocinador. Trata-se de uma pesquisa relevante no sentido de que trará dados que servirão para um melhor entendimento da fisiopatologia da osteoartrite humana e posteriormente a contribuição de bibliografia especializada nessa área, embora esses dados devam ser obtidos em modelos animais experimentais, visto que a utilização de modelos humanos nem sempre é possível. Também não apresenta, em qualquer uma de suas fases, possibilidades de causar danos à dimensão física,

psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual dos seres humanos e ainda, para a obtenção do conhecimento pretendido, esta nos parece uma boa alternativa. Entretanto, o perfil deste Comitê de Ética, o qual pretende analisar e emitir parecer sobre procedimentos éticos de pesquisa envolvendo seres humanos, não parece estar adequado para a emissão de parecer sobre projetos dessa natureza. Considerando que ainda não temos nesta instituição Comitê de Ética em Experimentação Animal, sugerimos a criação de um especificamente para essa área, no Campus de Chapadinha, visto que lá está alocado o Curso de Graduação em Zootecnia e consequentemente, o maior número de docentes especializados nessa área.

#### V - Pendências:

1. Datar a folha de rosto e preenche-la no campo 9;
2. Adequação do cronograma;
3. Declaração do pesquisador responsável sobre em que estágio se encontra a pesquisa;

#### VI - Recomendações:

Sugerimos nova redação dos objetivos dessa pesquisa, visto que a utilizada nos deixou dúvidas quanto ao resultado esperado. Por exemplo: "Avaliar o efeito da Cetamina S(+) sobre o grau de incapacitação..." Isso nos dá o entendimento de que a Cetamina S(+) aumenta a patologia; entretanto, no desenvolvimento do projeto verificamos que o esperado é que ela diminua essa patologia.

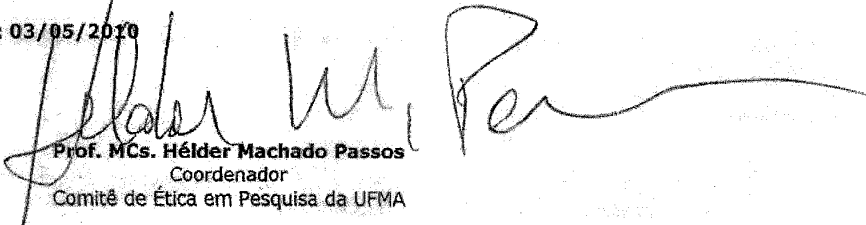
**NENHUMA**

#### VII - Parecer Consubstanciado do CEP

Foram apresentados os documentos enumerados em **Pendências**; desse modo o protocolo de pesquisa, **23115 012030/2009-05**, referente ao trabalho de conclusão de curso sob o título "**Efeito da Cetamina S (+) em modelo experimental de Osteoartrite em Ratos.**" é considerado por este CEP **COMO APROVADO.**

#### VIII - Data da reunião do CEP: 01/03/2010

#### IX - Data aprovação: 03/05/2010

  
**Prof. M.Cs. Hélder Machado Passos**  
 Coordenador  
 Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA

**DATA DE RECEBIMENTO:** 17/05/2010  
**RELATÓRIO PARCIAL:** 17/05/2010  
**RELATÓRIO FINAL:**

#### NOTA:

1. Anexa folha do Relatório Parcial;
2. Pesquisas com duração acima de 6 meses deverão apresentar relatórios parciais semestrais;
3. Pesquisas com duração acima de 12 meses deverão apresentar relatórios anuais;
4. Após a conclusão da pesquisa deverá ser apresentado relatório final ao CEP/UFMA.