



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
ROMILTON CROZETTA DA CUNHA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
IMPLANTES CONTENDO ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL NA
OSTEOARTRITE INDUZIDA EM JOELHOS DE RATOS**

Tubarão
2013

ROMILTON CROZETTA DA CUNHA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE
IMPLANTES CONTENDO ANTI-INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL NA
OSTEOARTRITE INDUZIDA EM JOELHOS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, da Universidade do Sul de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Luiz Alberto Kanis, Dr.

Tubarão

2013

C98 Cunha, Romilton Crozetta da, 1957-
Produção e avaliação da atividade anti-inflamatória de implantes contendo anti-inflamatório não esteroideal na osteoartrite induzida em joelhos de ratos / Romilton Crozetta da Cunha ; orientador: Luiz Alberto Kanis.-- 2013.
74 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (mestrado)–Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2013
Inclui bibliografias

1. Osteoartrite. 2. Agentes anti-inflamatórios. 3. Joelhos. 4. Osteoartrite – Tratamento. I. Kanis, Luiz Alberto. II. Universidade do Sul de Santa Catarina - Mestrado em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD (21. ed.) 616.7223

AGRADECIMENTOS

Aos acadêmicos de Farmácia e Bioquímica Beatriz Rohden Carvalho e Diego Moterle pelo auxílio prestado em todas as atividades nos laboratórios, pela boa vontade e ajuda incondicional.

Aos acadêmicos de medicina Fabrício Martinelli, Felipe Guadagnin e Marcelo Baggio pelo auxílio nos testes com as animais utilizados no estudo, pelo companheirismo e pelos estímulos quando as coisas ficavam difíceis.

Ao médico Antônio Castelan da Cunha, pela valiosa colaboração na disseção dos animais e contagem das lesões gástricas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Alberto Kanis, pelos ensinamentos e por me mostrar que sempre existe um caminho alternativo, e que a persistência é a chave para a conquista do objetivo.

RESUMO

Entre as formas de tratar a osteoartrite (AO) está o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), sempre com a recomendação para ser usado na menor dose efetiva e no menor tempo possível. Isso por que os efeitos adversos nos sistemas gastrointestinal, cardiocirculatório e renal são bem conhecidos. O uso de sistemas diferenciados de liberação de fármacos como os dispositivos implantáveis tem propiciado alternativas para reduzir a concentração plasmática circulante e direcionar o fármaco para o local de ação, podendo reduzir assim muitos dos efeitos colaterais dos fármacos. O objetivo deste estudo foi produzir, caracterizar e avaliar a atividade anti-inflamatória de dois sistemas poliméricos implantáveis contendo diclofenaco de sódio em modelo de inflamação aguda induzida por carragenina em joelho de ratos. Foram produzidos dois dispositivos implantáveis contendo diclofenaco de sódio, o primeiro incorporado em misturas de EUDRAGIT RS 100 e PEG400, chamado de EUDPEG; e outro contendo EUDRAGIT RS 100 e PCL-T, chamado de EUDPCL-T. Os materiais foram caracterizados por microscopia ótica, análises termomecânicas e foi determinada a velocidade de liberação em meio de tampão fosfato pH 7.4. Após caracterização os dispositivos EUDPCL-T (3,0 mg de diclofenaco de sódio) e EUDPEG (3,6 mg de diclofenaco de sódio) foram implantados intra articular na região posterior dos joelhos e após 4 dias foi induzido edema de joelho pela injeção intra-articular de carragenina. Nos tempos 6 horas e no 7º dia após a indução da artrite, os animais foram anestesiados e o edema medido através da variação da circunferência do joelho, seguido de sacrifício para análise de mediadores inflamatórios, mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico presentes na articulação. Também foram avaliadas as lesões gástricas. Os resultados foram comparados com administração oral de 30 mg/Kg de diclofenaco de sódio. As microscopias demonstraram que o filme EUDPEG é totalmente transparente devido à solubilidade do diclofenaco na matriz polimérica e apresenta um comportamento mecânico plástico com menor capacidade de deformação. Para o filme EUDPCL-T foi observado um filme totalmente opaco associado à cristalização do diclofenaco de sódio na matriz polimérica e variação de deformação em função da tensão característica de material elastomérico. Os estudos de liberação de diclofenaco de sódio in vitro a partir dos filmes utilizados mostraram duas fases distintas de liberação, uma fase de liberação acelerada, que durou em torno de 24 horas, onde EUDPEG apresentou maior velocidade de liberação, e uma fase lenta onde ocorreu a inversão das velocidades de liberação, com filme EUDPCL-T, apresentando um aumento da quantidade liberada por tempo quando comparado com o EUDPEG. O dispositivo EUDPCL-T promoveu

redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do edema e da concentração de MPO quando comparado com o grupo controle 6 horas e 7 dias após a indução do edema, enquanto o grupo que recebeu tratamento por via oral mostrou diferença significativa somente 7 dias após a indução da artrite. O dispositivo EUDPEG reduziu o edema significativamente ($p < 0,05$) somente 7 dias após a indução da artrite, mas não foi eficaz para reduzir a concentração de MPO. No doseamento de nitratos/nitritos 6 h após a indução da artrite, somente os grupos tratados com dispositivos implantáveis EUDPEG e EUDPCL-T mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle. Sete dias após a indução da artrite nenhum grupo que recebeu tratamento mostrou diferença estatística nos níveis de nitratos/nitrito com o grupo controle. Os resultados demonstram que a colocação do dispositivo EUDPCL-T para entrega do diclofenaco de sódio justa articular, promoveu a mesma atividade na diminuição do edema e na diminuição dos marcadores inflamatórios quando comparado com a administração por via oral, porém com doses inferiores.

Palavras chaves: Osteoartrite. Sistemas implantáveis. Inflamação.

ABSTRACT

Among the options to treat osteoarthritis there is the use of non-steroidal anti-inflammatory, always with the recommendation of using the least effective dose in the shortest time possible. It is suggested because the adverse effects in the gastrointestinal, cardio circulatory and renal systems are well known. The use of different systems of drug releases like implantable devices has propitiated alternatives to reduce the circulatory plasma concentration, directing the drug to the action site than reducing many of the collateral effects. The objective of this study was to characterize and evaluate the anti-inflammatory activity of two polimeric implantable devices containing diclofenac sodium in a model of induced osteoarthritis by carragenina in the knees of Wistar rats. It was produced two implantable devices containing diclofenac sodium, the first one obtained by blending of EUDAGRIT RS 100 and PEG400, called EUDPEG, and the other one containing EUDRAGRIT RS 100 and PCL-T, called EUDPCL-T. The materials were characterized by optic microscope and thermodynamic analysis (DMA) and the release mechanism determined within a phosphate buffer pH 7.4. After characterizing, the devices was implanted EUDPCL-T (3,0 mg of Sodium diclofenaco) and EUDPEG (3,6 mg of sodium diclofenaco) in the articulation in the posterior knee region and after 4 days it was induced the knee edema by the injection of carragenina. In the 6th hour and 7 days after the inducing the animals received anesthesia and the edema was measured by the variation of the knee circumference, followed by sacrifice for the analysis of the inflammatory mediators, MPO and nitric oxide within the articulation, it was also evaluated the number of gastric lesions. The optic microscopy showed that the EUDPEG film is totally transparent due to the solubility of diclofenac in the polymeric matrix and shows a mechanical plastic behavior with less capacity of deformation. For the EUDPCL-T film it was observed a totally opaque film associated with diclofenac sodium crystallization in the polymeric matrix and shows deformation variation due to tension characteristic of elastomeric material. The in vitro studies of diclofenac sodium releases by the films showed two distinct phases of release for both polymeric films, one fast release phase, which lasted 24 hours, where EUDPEG showed faster release , and one slow phase where the inversion of release speed was observed. EUDPCL-T showed a tendency of increase in quantity released by time when compared to EUDPEG. The EUDPCL-T device promoted statistically significant reduction ($p < 0,05$) of the edema and the MPO concentration when compared to the group that didn't received treatment, 6 hours 7 days after the edema induction while the group

that received oral treatment, showed significant difference only seven days after the osteoarthritis induction. The EUDPEG device also reduced the edema only after seven days of osteoarthritis induction but wasn't able to reduce the MPO concentration. When the measures of the knee circumference were taken in the 7th day after osteoarthritis induction, all the treated groups showed edema reduction when compared to the group that only received carragenina. The MPO activity was lesser in the EUDPCL-T group with a statistically significant difference when compared to the CRGN group in the sixth hour seven days later of osteoarthritis induction, while the DICL group showed difference only after seven days of osteoarthritis induction. In the nitrates/nitrites research six hours after osteoarthritis induction only the EUDPEG and EUDPCLT groups showed significant statistical difference when compared to the CRGN group, seven days after osteoarthritis induction none group showed statistical difference with the CRGN group. The results showed that the device implantation delivers the diclofenac sodium at the joint, promoted the same activity in reducing edema and inflammatory markers when compared to the oral administration, but with much inferior doses.

Keywords: Osteoarthritis. Implantable device. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfil de concentração plasmática de uma droga versus tempo, comparando administração oral e administração com dispositivo de liberação programada.	31
Figura 2 - Estrutura química do EUDRAGIT® RS 100.	33
Figura 3 - Policaprolactona triol (PCL-T).	33
Figura 4 - Estrutura química do PEG 400.	33
Figura 5 - Célula de liberação utilizada para estudos de liberação dos fármacos.	35
Figura 6 - Desenho esquemático de joelho de rato, aplicação da injeção intra-articular de carragenina.....	39
Figura 7 - Anatomia da coxa do rato.	40
Figura 8 - Anatomia da coxa do rato.	40
Figura 9 - Microscopias óticas dos filmes EUDPEG e EUDPCL-T obtidos em aumento de 25x.	44
Figura 10 - Variação da deformação em função da tensão aplicada nos filmes de EUDPEG (●) e EUDPCL-T (■).	46
Figura 11 - Perfil de liberação do diclofenaco de sódio a partir dos dispositivos EUDPEG (■) e EUDPCL-T (●).	48
Figura 12 - Dispositivos implantáveis de EUDPCL-T e EUDPEG depois de cortado com bisturi pronto para ser implantado.	49
Figura 13 - Fotografia do dispositivo implantado no joelho após dissecção.....	50
Figura 14 - Variação do edema do joelho nos grupos controle CRGN, DICL, EUDPEG E EUDPCL-T 6 horas após a indução da artrite com 4 dias de tratamento com diclofenaco de sódio. (N ≥ 6; **diferença significativa em relação ao grupo CRGN para um p < 0,05).	51
Figura 15 - Variação do edema do joelho nos grupos controle CRGN, DICL, EUDPEG E EUDPCL-T 7 dias após a indução da artrite com 11 dias de tratamento com diclofenaco de sódio. (N ≥ 6; **diferença significativa em relação ao grupo CRGN para um p < 0,05).	53
Figura 16 - Variação da concentração de MPO nos joelhos nos grupos controle CRGN, DICL, EUDPEG E EUDPCLT 6 horas após a indução da artrite e com 4 dias de tratamento com diclofenaco de sódio. (N ≥ 6; **diferença significativa em relação ao grupo CRGN para um p < 0,05).	56
Figura 17 - Variação da concentração de MPO nos joelhos nos grupos controle CRGN, DICL, EUDPEG E EUDPCLT 7 dias após a indução da artrite e com 11 dias de tratamento com	

diclofenaco de sódio. (N ≥ 6; **diferença significativa em relação ao grupo CRGN para um p<0,05).....	57
Figura 18 - Variação da concentração de nitratos/nitritos nos joelhos nos grupos controle CRGN, DICL, EUDPEG E EUDPCLT 6 horas após a indução da artrite e com 4 dias de tratamento com diclofenaco de sódio. (N ≥ 6; **diferença significativa em relação ao grupo CRGN para um p<0,05).	58
Figura 19 - Variação da concentração de nitratos/nitritos nos joelhos nos grupos controle CRGN, DICL, EUDPEG E EUDPCLT 7 dias após a indução da artrite e com 11 dias de tratamento com diclofenaco de sódio. (N ≥ 6; **diferença significativa em relação ao grupo CRGN para um p<0,05).	59
Figura 20 - Estômagos dos ratos abertos pela curvatura maior, visto em estereomicroscópio do grupo controle negativo no lado direito e do grupo DICL no lado esquerdo.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração dos componentes utilizados para produção dos dispositivos implantáveis.....	34
Tabela 2 - Valores de tensão máxima, deformação e módulo de elasticidade dos filmes de EUDPEG e EUDPCL-T.	46
Tabela 3 - Doses em miligramas de diclofenaco de sódio administradas por via oral em ratos Wistar e doses liberadas/dia pelos dispositivos implantados calculadas teoricamente a partir dos estudos in vitro.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS - Ácido acetilsalicílico

COX-1 - Ciclooxigenase 1

COX-2 - Ciclooxigenase 2

COX-3 - Ciclooxigenase 3

g - grama(s)

h - hora(s)

Kg - quilograma(s)

mg - miligrama(s)

min - minuto(s)

mL - mililitro(s)

mol - molécula, moléculagrama

mm - milímetro(s)

NO - Óxido nítrico

NO₂ - Nitrito

NO₃ - Nitrato

OA – Osteoartrite

pH - potencial Hidrogeniônico

PCL-T - Policaprolactona-triol

PEG - Polietilenoglicol

PGA - Poli (ácido glicólico)

PLA - Poli (ácido láctico)

PLGA - Poli (ácido láctico-co-glicólico)

Rpm - rotações por minuto

LISTA DE SIGLAS

ACR - American College of Rheumatology

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroidais

EULAR - European League Against Rheumatism

MPO - Mieloperoxidase

NHANES - National Health and Nutrition Examination Survey

NICE – National Institute for Health and Clinical Excellence

OARSI – Osteoarthritis Research Society International

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

UNISUL - Universidade do Sul de Santa Catarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVO GERAL	17
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1 OSTEOARTRITE (OA)	18
4.2 ETIOPATOGENESE	18
4.3 INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA.....	19
4.4 FATORES DE RISCO.....	20
4.5 TRATAMENTO	21
4.5.1 Tratamento não-farmacológico	22
4.5.2 Tratamento farmacológico	22
4.5.2.1 Acetaminofen (Paracetamol)	22
4.5.2.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).....	23
4.5.2.3 Tratamento com injeções intra-articulares	27
4.5.2.4 Fármacos de ação lenta para o tratamento sintomático das osteoartrites.....	27
4.5.2.5 Opióides	28
4.5.3 Modalidades cirúrgicas de tratamento	28
4.6 SISTEMAS IMPLANTÁVEIS	28
4.6.1 Controle da liberação	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 MATERIAIS.....	32
5.1.2 POLÍMEROS	32
5.2 PRODUÇÃO DOS SISTEMAS IMPLANTÁVEIS.....	34
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS IMPLANTÁVEIS.....	34
5.3.1 Caracterização visual	34
5.3.2 Análises mecânicas	34
5.3.3 Estudos de liberação	35
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-EDEMATOGÊNICA	36
5.4.1 ANIMAIS	36
5.4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO	37
5.4.3 Indução da Osteoartrite	38

5.4.4 Implantação dos dispositivos	39
5.4.5 Quantificação do edema nos joelhos dos ratos através da medida do diâmetro da articulação do joelho induzido à artrite	40
5.4.6 Doseamento dos mediadores inflamatórios na articulação	41
5.5 Avaliação das lesões gástrica	42
5.6 Aspectos éticos	42
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
7.1 CARACTERIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS POLIMÉRICOS IMPLANTÁVEIS	44
7.2 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DO DICLOFENACO DE SÓDIO	47
7.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS DISPOSITIVOS IMPLANTADOS	49
8 CONCLUSÃO	61
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Osteoartrite (OA), também denominada osteoartrose, é uma doença crônica. De alta prevalência na população idosa, sendo a forma mais comum de artrite em todo o mundo. Sua causa é desconhecida, porém existem evidências de que é uma doença multifatorial. (BUSIJA et al., 2010; FELSON et al., 2000; HELMICK et al., 2008; MURPHY et al., 2008).

Os principais fatores de risco para a OA são a idade, o sexo feminino e a obesidade. Alguns fatores geográficos e profissionais assim como grupos étnicos e o trauma articular também estão associados ao desenvolvimento da doença. (AYALA; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2007; DAS; FAROOQI, 2008; BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009; ZHANG; JORDAN, 2010).

A prevalência da OA varia em função da sua definição, da articulação em estudo e das características da população estudada, tornando difícil conhecer a real prevalência da doença. Porém, as pesquisas realizadas concordam que a OA é uma doença de alta incidência que está aumentando com o envelhecimento da população mundial, que sua etiologia é multifatorial e que tem um grande impacto em todo o mundo, ainda que cada população estudada apresente uma combinação diferente de fatores de risco. (AYALA; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2007; BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009; BUSIJA et al., 2010; DAS; FAROOQI, 2008; FRÍAS et al., 2009; HELMICK et al., 2008; JORDAN, 2010; MURAKI et al., 2009; POTTIE et al., 2010; ZHANG; JORDAN, 2010).

Do ponto de vista clínico observou-se que os pacientes com OA experimentam episódios de dor recorrente ou de piora da dor no curso da enfermidade. Com frequência a dor artrítica piora com o uso das articulações afetadas e melhora com o repouso. A redução da dor se associa à melhora da função e diminuição de faltas ao trabalho. (EDMONDS, 2009; SCHNITZER, 2002; ZHANG; JORDAN, 2010).

Ao longo dos anos uma série de diretrizes nacionais, regionais e internacionais, foram desenvolvidas para ajudar os médicos e outros profissionais de saúde, juntamente com o paciente na escolha de terapias universalmente aplicáveis para a gestão da OA. De forma convergente, as orientações dirigem o tratamento da OA para a redução da dor e da rigidez articular, procurando reduzir a incapacidade física, melhorando a qualidade de vida, limitando a progressão das lesões, educando os pacientes sobre a natureza da sua doença e planejando sua gestão. (ZHANG; JORDAN, 2010; ZHANG et al., 2007).

Mais de 50 modalidades de tratamento estão incluídos na literatura médica, que evolui iniciando com medidas terapêuticas não farmacológicas para associação com

medicação e terminando em terapia cirúrgica para alguns casos. Em todas as diretrizes estudadas foi constante a indicação do uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), no tratamento da OA, com a recomendação de que estes fármacos devem ser usados na menor dose efetiva e pelo menor tempo possível, isso por que AINEs apresentam contra indicações conhecidas no sistema gastrointestinal, cardiovascular e renal. (COIMBRA et al., 2002; DAS; FAROOQI, 2008; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE, 2008; PATRONO; ROCCA, 2009; SCHNITZER, 2002; ZHANG; JORDAN, 2010; ZHANG et al., 2007b; ZHANG et. al., 2010).

Apesar destas recomendações, os AINEs ainda são largamente prescritos, provavelmente por causa do seu efeito analgésico e da dificuldade em manusear os pacientes com OA com analgésicos simples. Outro problema é a automedicação com estes fármacos que são amplamente popularizados. (WILLIAMS; SPECTOR, 2006).

O mecanismo de ação dos AINEs, inibindo a produção de prostaglandinas e com isso diminuindo a resposta inflamatória, é responsável pelos efeitos colaterais destes fármacos. Assim, novas pesquisas procurando diminuir os efeitos adversos têm sido realizadas. (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008; PATRONO; ROCCA, 2009).

Em 1990 a descoberta de uma segunda forma da enzima ciclooxigenase, a COX-2, proporcionou o desenvolvimento de AINEs inibidores seletivos da COX-2 procurando desta forma diminuir a toxicidade gástrica. Porém logo se descobriu que estes fármacos podem afetar o equilíbrio da cascata de coagulação, inclinando a balança em favor da atividade pró-trombótica aumentando assim o risco de eventos cardiovasculares. (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008; NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE, 2008; WILLIAMS; SPECTOR, 2006).

Devido à associação com complicações cardiovasculares alguns fármacos inibidores seletivos de COX-2 foram retirados do mercado, e os que ainda estão disponíveis estão sujeitos a receituário controlado, e com contra indicação formal para pacientes com risco tromboembólico. Desta forma o manuseio da OA com AINEs permanece com restrições importantes e novos estudos são necessários para contornar o problema. (NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008).

Nas últimas décadas, muitos estudos foram conduzidos no desenvolvimento de novas formas de administração de fármacos com o objetivo de promover uma liberação localizada e controlada do ativo, melhorar a eficácia e reduzir a toxicidade e efeitos colaterais. Entre as novas formas farmacêuticas podemos destacar o uso de sistemas implantáveis para

distribuição de fármacos, onde são utilizados polímeros como os poliésteres alifáticos, os copolímeros do ácido metacrílico e dos ésteres acrilatos, além de diferentes polissacarídeos. (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008; STRUCTURE..., 2009; WILSON et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

Estes sistemas de distribuição de fármacos são capazes de proteger os medicamentos que são instáveis *in vivo* e também realiza uma liberação local do ativo reduzindo desta forma a concentração plasmática circulante e promovendo uma redução dos efeitos colaterais oriundos do fármaco. Estudos preliminares com estes sistemas têm demonstrado eficácia superior em relação aos métodos convencionais de administração de fármacos. (FREICHELS; JÉRÔME; JÉRÔME, 2011; PARK et al., 2010; VENKATARAMAN et al., 2011). Esta alternativa quando aplicada ao tratamento da OA pode favorecer o paciente diminuindo a concentração plasmática total de AINEs e reduzindo o risco de danos no sistema gástrico, cardiovascular e renal.

2 JUSTIFICATIVA

A osteoartrite é uma doença crônica, incapacitante e de alta prevalência na população, onde a prescrição de AINEs está indicada na literatura pesquisada, devido a sua eficácia no tratamento da dor; sempre com a recomendação de que deve ser utilizada a menor dose efetiva e pelo menor tempo possível, devido às possíveis complicações no sistema gastrointestinal, cardiovascular e renal. (DAS; FAROOQI, 2008; PATRONO; ROCCA, 2009).

Estas recomendações limitam de forma indiscutível o manuseio destes pacientes com a utilização de AINEs, uma vez que existe alta prevalência da OA nas faixas etárias mais altas da população, onde as doenças gastrointestinais cardiovasculares e renais também são prevalentes, aumentando a chance de complicações adversas com uso dos AINEs. (BUSIJA et al., 2010; GUILLEMIN et al., 2011; MURAKI et al., 2009; PATRONO; ROCCA, 2009; ZHANG; JORDAN, 2010).

Uma nova forma de administração de AINE que possa proporcionar alta concentração de fármaco no local de ação, com baixa concentração plasmática, diminuindo desta forma efeitos colaterais e aumentando a eficácia terapêutica do medicamento, parece ser hoje um objetivo factível com o uso de sistemas implantáveis para distribuição de fármaco. (DASH; CUDWORTH, 1998).

Esta nova tecnologia, já demonstrou eficácia utilizando os mais variados sistemas de entrega, em diferentes sistemas orgânicos, com uma grande diversidade de fármacos. No entanto poucos produtos estão disponíveis para utilização clínica no momento, muitos sistemas estão em estágios iniciais de desenvolvimento e muitas perguntas ainda estão por ser respondidas (FREICHEL; JÉRÔME; JÉRÔME, 2011; PARK et al., 2010).

Desta forma o desenvolvimento de sistemas implantáveis para entrega de AINES justa articular pode ser uma alternativa eficiente para o manuseio dos pacientes com OA pois podem melhorar a eficácia dos fármacos e diminuir a toxicidade, além de ser uma forma de tratamento cômodo para pacientes que em muitas ocasiões já fazem uso de várias medicações por via oral. (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008; DASH; CUDWORTH, 1998).

3 OBJETIVO GERAL

Produzir, caracterizar e avaliar a atividade anti-inflamatória de dois sistemas poliméricos implantáveis contendo diclofenaco de sódio em modelo de osteoartrite induzida com carragenina no joelho de ratos Wistar.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir dispositivo polimérico implantável de diclofenaco de sódio incorporado em uma base de derivado de acrilato contendo polietileno glicol 400 ou policaprolactona triol.

Caracterizar as propriedades mecânicas, óticas e de liberação do diclofenaco de sódio nos dispositivos produzidos.

Verificar a atividade anti-inflamatória dos sistemas implantáveis contendo diclofenaco sódico quando implantado extra articular e justa capsular no joelho de rato Wistar com artrite induzida por carragenina.

Comparar a atividade anti-inflamatória do sistema implantável contendo baixas doses de diclofenaco de sódio com o mesmo fármaco administrada por via oral

Quantificar o número de lesões gástricas das duas formas de administração do fármaco.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 OSTEOARTRITE (OA)

A OA pode ser dividida de forma ampla em OA primária, ou idiopática, e a OA secundária a outra condição patológica. A OA primária pode ser localizada em uma articulação ou na sua forma generalizada, em várias articulações, quando geralmente incluem a participação conjunta de pequenas articulações das mãos e uma ou mais articulação de grande porte. (ASPDEN, 2008; FELSON et al., 2000; SWALES; ATHANASOU, 2010).

A doença se apresenta como o resultado de processos mecânicos e biológicos que alteram a relação normal de degeneração e regeneração da articulação e podem ser desencadeadas por alterações metabólicas, genéticas, e traumáticas. Quando manifestações clínicas estão presentes a doença é caracterizada por dor articular, limitação de movimento, crepitação e graus variáveis de inflamação. Os locais mais freqüentemente afetados são as mãos, os joelhos, os quadris e coluna vertebral. (BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009; CREAMER; HOCHBERG, 1997; DAS; FAROOQI, 2008; EDMONDS, 2009; FELSON et al., 2000; McGONAGLE, 2008).

4.2 ETIOPATOGENESE

Pode ser que a OA seja o resultado da falha da reparação, como comentou Joseph Trueta em 1953. O processo osteoartrítico parece ser uma tentativa de transformar uma articulação deteriorada em uma articulação jovem. (HARRISON; SCHAJOWICZ; TRUETA, 1953).

Mais recentemente, foi sugerido que o fator comum da OA primária seria o aumento patológico no estresse intra-articular causado por carga anormal, levado à microlesões na cartilagem e no osso subcondral que em algum momento excederiam a capacidade de regeneração tecidual; isso poderia explicar por que as pessoas com excesso de peso são mais suscetíveis para desenvolver OA. (BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009).

Outros autores defendem que a OA é uma doença músculo-esquelética sistêmica, caracterizado por excessivo e mal regulado crescimento de tecidos músculo-esqueléticos; possivelmente como resultante de células com um fenótipo para desenvolvimento da doença. (EDMONDS, 2009; POTTIE et al., 2010).

Embora a maioria dos pesquisadores se concentre na cartilagem, há outros que propõem que o osso deve ser o principal tecido de interesse. Foi relatado a mais de uma década, que uma proporção significativa dos osteoblastos no osso afetado por OA são fenotipicamente diferentes. (CREAMER; HOCHBERG, 1997).

Estudos de ligação genética identificaram um pequeno número de genes que parecem conferir susceptibilidade à OA, mas ainda há pouca compreensão da conexão entre genótipo e fenótipo. Além disso, uma série de estudos mostram diferenças na natureza da susceptibilidade genética para a OA em diferentes articulações. (BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009; CREAMER; HOCHBERG, 1997; EDMONDS, 2009).

Uma revisão recente sugere haver um papel importante para os ligamentos articulares no desenvolvimento da OA onde desempenhariam um papel central na sua gênese (McGONAGLE, 2008). Não há dúvida de que a etiopatogenia da OA é complexa, mas é possível dizer que ocorre quando o equilíbrio dinâmico entre a degradação e reparação dos tecidos articulares é perdido. Este “fracasso articular” muitas vezes resulta em dor e incapacidade, mas algumas pessoas com alterações estruturais consistentes são assintomáticas. (EDMONDS, 2009).

Em última análise, a doença OA é manifesta por alterações moleculares, bioquímicas, morfológicas e biomecânicas do tecido celular e sua matriz que levam a um amolecimento, fibrilação, ulceração, perda da cartilagem articular, esclerose subcondral, eburniação do osso subcondral, osteófitos e cistos subcondrais. A perda da cartilagem articular se manifesta como um estreitamento do espaço articular que pode ser visto em um Raio-X simples da articulação acometida. (BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009; WILLIAMS; SPECTOR, 2006).

4.3 INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA

As estimativas de incidência e prevalência de osteoartrite apresentam uma ampla variabilidade nos estudos realizados, ela depende da idade e do sexo da população estudada, do método de identificação de casos utilizados e das articulações incluídas no estudo. Não existe até o momento um “padrão ouro” para a identificação dos casos de OA em estudos epidemiológicos. (CUNNINGHAM; KELSEY, 1984; KOPEC et al., 2008; ZHANG; JORDAN, 2010).

Apesar da falta de padronização, é consistente em estudos de base populacional que a prevalência da OA é positivamente associada com o aumento da idade, este fato

proporciona um contínuo aumento da incidência dado que a população mundial em geral está envelhecendo. (BUSIJA et al., 2010; DAS; FAROOQI, 2008; GUILLEMIN et al., 2011; HELMICK et al., 2008; MURAKI et al., 2009; PATRONO; ROCCA, 2009; ZHANG; JORDAN, 2010).

A prevalência de OA radiográfica do joelho em adultos com 45 anos ou mais foi de 19,2% entre os participantes do *Framingham Study* e 27,8% no *Condado de Johnston Osteoartrite Project*, na *3ª National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)*, aproximadamente 37% dos participantes com mais de 60 anos apresentaram OA radiográfica do joelho (HELMICK et al., 2008; ZHANG; JORDAN, 2010).

A prevalência de OA sintomático do joelho foi de 4,9%, em Framingham, em indivíduos de 26 anos ou mais; já no *Johnston County Osteoarthritis Project*, a prevalência de OA sintomática de joelho foi de 16,7% entre indivíduos com 45 anos ou mais; muito maior do que a relatada no estudo de *Framingham*, indicativo de que a idade é um fator determinante na prevalência desta doença. (AYALA; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2007; KOPEC et al., 2008; ZHANG; JORDAN, 2010).

4.4 FATORES DE RISCO

A etiologia da OA é um processo complexo e ainda está sob investigação. Existem fortes evidências de que a doença é multifatorial e pode ser considerado o produto da interação de fatores de risco sistêmicos e locais (BUSIJA et al., 2010; FELSON et al., 2000; ZHANG; JORDAN, 2010).

Entre os fatores de risco sistêmicos, a idade esta fartamente documentada como risco para a OA em todas as articulações e provavelmente esta relacionada ao acúmulo de riscos biológicos a alterações que ocorrem com o envelhecimento, tornando a articulação menos capaz de responder de forma satisfatória ao desgaste articular. (AYALA; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2007; BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009; BUSIJA et al., 2010; DAS; FAROOQI, 2008; FELSON et al., 2000; HELMICK et al., 2008; JUHAKOSKI et al., 2009; MURPHY et al., 2008; ZHANG; JORDAN, 2010).

O fator hormonal, ligado ao sexo mostra que as mulheres não só estão mais propensas à doença como também apresentam a forma mais grave de OA quando comparada com os homens. O aumento bem estabelecido da OA em mulheres na menopausa levantou a hipótese de que o estrogênio estivesse envolvido no desenvolvimento da OA, no entanto estudos observacionais sobre o efeito do estrogênio na OA têm sido conflitantes. (AYALA;

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2007; BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009; BUSIJA et al., 2010; DAS; FAROOQI, 2008; JUHAKOSKI et al., 2009; ZHANG; JORDAN, 2010).

Entre os fatores de risco local, isto é na articulação, a obesidade é reconhecida por sua associação positiva com a OA. O uso repetitivo das articulações e alguns fatores mecânicos como a atrofia muscular, discrepância dos membros inferiores, frouxidão ligamentar e mau alinhamento dos membros inferiores são comumente associados com OA do joelho. (AYALA; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2007; BRANDT; DIEPPE; RADIN, 2009; BUSIJA et al., 2010; DAS; FAROOQI, 2008; FELSON et al., 2000; JUHAKOSKI et al., 2009; POTTIE et al., 2010; ZHANG; JORDAN, 2010).

4.5 TRATAMENTO

Mais de cinquenta modalidades de tratamento para a OA estão descritos na literatura, e estão divididos entre tratamento não medicamentoso, medicamentoso, cirúrgicos e suas associações. (WILLIAMS; SPECTOR, 2006; ZHANG et al., 2007a; ZHANG et al., 2007b).

Tentando melhorar a qualidade do atendimento aos pacientes com OA entidades como o *American College of Rheumatology (ACR)*, a *European League Against Rheumatism (EULAR)*, o comitê *The Osteoarthritis Research Society International (OARSI)* e o estudo *National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE)*, desenvolveram recomendações para aperfeiçoar o tratamento da OA baseado em uma combinação de consenso entre os especialistas e a Revisão Sistemática de Pesquisas Baseadas em Evidências. (NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; ZHANG et al., 2007a).

Estudos OARSI III publicado em 2010 apresentam recentes recomendações do manuseio da AO. São baseados em busca sistemática da literatura de ensaios clínicos randomizados, estudos observacionais e estudos de avaliações econômicas publicados em qualquer idioma entre janeiro de 2006 e janeiro de 2009. (NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; ZHANG et al., 2007a; ZHANG et al., 2010).

A estratégia atual de tratamento com medidas não farmacológicas associadas a terapias medicamentosa visam a redução da dor e a rigidez articular, manter e melhorar a mobilidade, reduzir a deficiência física, melhorar a qualidade de vida, limitar a progressão das lesões articulares e educar os pacientes sobre a natureza da doença e sua gestão. (NATIONAL

COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; WILLIAMS; SPECTOR, 2006; ZHANG; JORDAN, 2010; ZHANG et al., 2007a; ZHANG et al., 2007b; ZHANG et al., 2010).

Alguns tratamentos tentam limitar a deterioração estrutural nas articulações afetadas, além disso, terapias cirúrgicas estão disponíveis para os pacientes que não respondem ao tratamento conservador. (COIMBRA et al., 2002; EDMONDS, 2009; ZHANG et al., 2007b).

4.5.1 Tratamento não-farmacológico

Autogestão, educação e informações sobre OA e seu tratamento são amplamente recomendados para o tratamento da OA nas diretrizes estudadas. Os pacientes com OA podem ser instruídos sobre a prática de exercícios apropriados, estimulados a perder peso e a utilizar muletas ou andadores visando à redução da dor e melhorar a capacidade funcional. (DAS; FAROOQI, 2008; EDMONDS, 2009; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; WILLIAMS; SPECTOR, 2006; ZHANG et al., 2007b; ZHANG et al., 2010).

O tratamento com acupuntura tem alguma eficácia para o alívio da dor. Estudos comparando acupuntura, eletro-acupuntura e acupuntura sham (placebo); demonstraram superioridade da acupuntura em relação ao placebo. (EDMONDS, 2009; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; ZHANG et. al., 2010).

Existe recomendação para o uso de estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) como adjuvante ao tratamento para o alívio da dor. (NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE, 2008; WILLIAMS; SPECTOR, 2006; ZHANG et. al., 2010).

4.5.2 Tratamento farmacológico

4.5.2.1 Acetaminofen (Paracetamol)

Acetaminofen é um AINE que na prática clínica e em modelos animais apresenta pouca atividade anti-inflamatória, entretanto é um dos analgésicos e antitérmicos mais populares no mundo. Porém apesar de ser amplamente prescrito e por um período de tempo

bastante longo, seu mecanismo de ação ainda é incerto. (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008; VANE, 1996;).

Em 1996 foi descrito uma nova isoenzima COX, derivada da COX-1 que apresenta algumas diferenças estruturais e foi denominada COX-3. Quando comparada as atividades entre os três tipos de COX, ficou demonstrado que a COX-3 é inibida seletivamente por fármacos analgésicos e antitérmicos como o paracetamol e dipirona. Desta forma a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo pelo qual essas fármacos diminuem a dor e possivelmente a febre. (BOTTING, 2010; CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008).

Acetaminofen em doses de até 4 g/dia, deve ser o analgésico oral de primeira escolha para dor leve e moderada devido à sua relativa segurança e eficácia e, se bem sucedida, deve ser usado em longo prazo como o analgésico oral de preferência. (COIMBRA et al., 2002; DAS; FAROOQI, 2008; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; SCHNITZER, 2002; STRUCTURE..., 2009; WILLIAMS; SPECTOR, 2006; ZHANG et. al., 2010).

Evidências acumuladas em estudos de base populacional sugerem que o acetaminofem pode ter efeito colateral no sistema gastrointestinal superior e na função renal com doses acima de 3 g/dia. Mesmo assim existe recomendação para o uso de paracetamol em doses de até 4 g/ dia nas recomendações OARS I. Tal recomendação foi mantida apesar das incertezas sobre segurança do fármaco no momento da publicação. (ZHANG et al., 2007b; ZHANG et. al., 2010).

Por causa de preocupações adicionais sobre a estreita margem terapêutica para hepatotoxicidade, um comitê consultivo da *Food and Drug Administration* recomendou recentemente que a dose diária máxima de paracetamol deve ser inferior a 4 g/dia e que o conteúdo das apresentações comerciais de acetaminofen em doses únicas deve ser limitado a 650mg. (NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; ZHANG et. al., 2010).

4.5.2.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

AINEs podem ser definidos como uma classe heterogênea de fármacos com estrutura química semelhante com o mesmo mecanismo de ação e que apresentam atividades antitérmicas, analgésicas e anti-inflamatórias, e também os mesmos efeitos colaterais de

danos à mucosa gástrica, toxicidade para os rins e inibição da agregação plaquetária. (BOTTING, 2010; FEUCHT; PATEL, 2010; PATRONO; ROCCA, 2009).

O processo inflamatório é desencadeado pela via do ácido araquidônico, essencialmente ocorre à adição de moléculas de oxigênio no ácido araquidônico, catalisado pela enzima ciclooxigenase, que irão gerar prostanóides que são as prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Outras enzimas também podem oxidar o ácido araquidônico, como as lipoxigenases (LOX) para produzir leucotrienos e ainda o citocromo P-450. (BERGSTRÖM et al., 1964; BUNIMOV; LANEUVILLE, 2008; CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008; FEUCHT; PATEL, 2010; VANE, 1971).

As prostaglandinas quando liberadas dentro do espaço intracelular podem produzir febre, inflamação e dor. Os tromboxanos são liberados em resposta à lesão tecidual e são responsáveis pela produção e agregação das plaquetas, formação de coágulos e para regular o tônus vascular. A prostaciclina é um vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008; VANE, 1996; VANE, 1971).

O mecanismo de ação dos AINEs pode ser explicado pela inibição da ação da enzima ciclooxigenase, inibindo a via do ácido araquidônico e a consequente formação dos prostanoides; alterando desta forma as reações mediadas por estes hormônios. (FEUCHT; PATEL, 2010; VANE, 1996).

O papel dos AINEs em complicações gastrointestinais, sua morbidade e mortalidade subsequente está bem estabelecida e a incidência destes efeitos muitas vezes é motivo de descontinuidade do tratamento. A toxicidade geralmente é dose-dependente e associada ao uso crônico. Os efeitos colaterais gastrointestinais dos AINEs podem variar de lesão da mucosa assintomática, dispepsia, erosões gástricas, à complicações mais graves, como úlceras pépticas, hemorragia, perfuração e obstrução intestinal. (LEE; CRYER, 2011; MURPHY et al., 2008).

Em 1991 foi publicada a descoberta de uma nova ciclooxigenase, a enzima foi chamada de ciclooxigenase 2, (COX-2) que é induzível, em oposição à ciclooxigenase 1(COX-1) que é constitutiva. (BOTTING, 2010; VANE; BOTTING, 1997).

A Cox-1 é expressa na maioria dos tecidos normais, é a forma predominante dentro de células epiteliais gástricas protegendo a mucosa gastrointestinal da acidez, enquanto a Cox-2 é expressa em resposta ao dano tecidual e sua liberação é induzida em resposta aos estímulos inflamatórios. (BOTTING, 2010; FEUCHT; PATEL, 2010; GALVAN-VILLEGAS; NAVARRETE, 2006; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; VANE; BOTTING, 1997; XIE et al., 1991).

Embora os AINEs tradicionais e os inibidores específicos da COX-2, chamados de coxibes sejam considerados como uma única classe de fármacos, “anti-inflamatórios”, os dois termos são utilizados devido às diferenças no perfil de efeitos colaterais. (BUNIMOV; LANEUVILLE, 2008; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008).

Baseado em diferenças estruturais entre as COX 1 e 2 foi possível sintetizar fármacos inibidores seletivos da COX-2, como o celecoxibe, lumiracoxibe, etoricoxibe entre outros. Estes fármacos foram desenvolvidos para apresentar efeitos terapêuticos anti-inflamatório sem que os efeitos colaterais gástricos e anti adesivo plaquetário estivessem presentes. (BOTTING, 2010).

Por não inibir a enzima COX-1, que é responsável pela produção de prostaglandinas na mucosa gastrointestinal, os coxibes deveriam apresentar menos risco de efeitos colaterais gástricos. Porém o benefício de inibidores COX-2 seletivos em relação à menor toxicidade gastrointestinal permanece controverso. (FEUCHT; PATEL, 2010; GALVAN-VILLEGAS; NAVARRETE, 2006; LEE; CRYER, 2011).

O efeito colateral gastrointestinal pode estar relacionado à inibição da produção de prostaglandinas, uma vez que estas regulam o fluxo sanguíneo na mucosa gastrointestinal e interferem na produção de muco, do bicarbonato e na produção de ácidos. Além disso, estudos recentes sugerem que a irritação local da mucosa gástrica causada pelo comprimido contendo AINEs pode ter um papel maior do que se acreditava anteriormente. Lee e Cryer (2011) sugerem que a irritação local é provavelmente o principal mecanismo responsável por hemorragias agudas e erosões observadas após uso de AINEs. (FEUCHT; PATEL, 2010; LEE; CRYER, 2011).

Para pacientes com fator de risco aumentado para complicações gastrointestinais com uso de AINEs, a utilização concomitante de um inibidor de bomba de prótons tem se mostrado eficaz em reduzir a frequência e a gravidade dos sintomas digestivos altos. (FEUCHT; PATEL, 2010; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; TRIANTAFYLLOU; VLACHOGIANNAKOS; LADAS, 2010).

Existem também fortes evidências de que a população geriátrica apresenta um risco maior de complicações gastrointestinais com o uso de AINEs. Em pessoas com menos de 65 anos, os AINEs aumentam o risco de sangramento gastrointestinal em 1,65 vezes, mas nos pacientes com mais de 65 anos o risco é 5,5 vezes maior do que em não usuários. (FEUCHT; PATEL, 2010; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; TRIANTAFYLLOU; VLACHOGIANNAKOS; LADAS, 2010).

AINEs também estão associados a risco de lesões no cólon onde podem causar colite, exacerbar diverticulite e estão relacionados a sangramento diverticular. (LEE; CRYER, 2011; STRATE et al., 2011; TRIANTAFYLLOU; VLACHOGIANNAKOS; LADAS, 2010).

Insuficiência renal causada por AINEs é bem conhecida e é provável que seja o resultado de inibição das prostaglandinas renais. Insuficiência renal pode ocorrer entre 1% e 5% dos pacientes, sendo caracterizada pela elevação dos níveis séricos de creatinina, geralmente reversíveis com a descontinuação do tratamento. (FEUCHT; PATEL, 2010; LEE; CRYER, 2011).

Complicações cardiovasculares relacionados ao uso de AINEs vieram à tona com o surgimento dos inibidores seletivos COX-2. Até então nenhum estudo epidemiológico havia abordado a questão do risco cardiovascular associado ao uso de AINEs. O primeiro estudo foi projetado para testar a visão pressuposta de que os AINEs tradicionais iriam imitar o efeito cardioprotetor da aspirina, mas o estudo não conseguiu confirmar sua principal hipótese e, de fato, relatou sinais cardiotóxicos moderados com o uso de AINEs. (PATRONO; ROCCA, 2009).

Dados atuais sugerem que os AINEs seletivos COX 2 podem aumentar o risco cardiovascular, mas os estudos são heterogêneos e conflitantes. Quando analisados a seleção dos pacientes, a duração do estudo, os agentes utilizados e o desenho do estudo, fica difícil resumir os riscos cardiovasculares associados com uso de AINEs. (FEUCHT; PATEL, 2009; MUKHERJEE; NISSEN; TOPOL, 2010).

No tratamento farmacológico da OA existe evidência de que os AINEs são superiores ao paracetamol para o alívio da dor. Tal afirmativa é suportada por revisão sistemática de comparação par a par entre AINEs e acetaminofen, onde a resposta clínica e o número de pacientes preferindo AINEs ao acetaminofen foi consistentemente maior. (NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; ZHANG et. al., 2010).

As recomendações de tratamento para pacientes com OA sintomáticos utilizando AINEs apresentam pequenas variações entre as várias diretrizes de tratamento pesquisadas, mas todas recomendam que o fármaco deve ser usado no menor tempo possível e na menor dose efetiva para evitar ou diminuir os efeitos colaterais adversos. (DAS; FAROOQI, 2008; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; STRUCTURE..., 2009; ZHANG et al., 2007b).

A terapia com AINEs tópicos são recomendados como terapia alternativa ou adjuvante. Esta forma de administração do fármaco pode atingir eficácia terapêutica com

baixa exposição sistêmica por ser um método direcionado de tratamento, oferecendo menor potencial de efeitos adversos. Em ensaios clínicos, AINEs de apresentação tópica tem demonstrado eficácia semelhante aos AINEs orais para o tratamento da dor na OA. (FRÍAS et al., 2009; WILLIAMS; SPECTOR, 2006; STRUCTURE..., 2009).

4.5.2.3 Tratamento com injeções intra-articulares

Injeções intra-articulares de corticosteróides são utilizadas principalmente para uma rápida ação anti-inflamatória. Uma revisão da literatura realizada pelo grupo Cochrane avaliou este tipo de tratamento para OA do joelho, e concluiu que é eficaz para reduzir os sinais de inflamação aguda, particularmente o derrame articular. (DAS; FAROOQI, 2008; EDMONDS, 2009; WILLIAMS; SPECTOR, 2006).

Injeções de ácido hialurônico intra-articular tem indicação controversa, o resultado dos estudos foram heterogêneos sugerindo viés de publicação. Quando a análise é restrita a estudos de alta qualidade não há evidência para alívio significativo da dor. (DAS; FAROOQI, 2008; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; STRUCTURE..., 2009; WILLIAMS; SPECTOR, 2006; ZHANG et. al., 2010).

4.5.2.4 Fármacos de ação lenta para o tratamento sintomático das osteoartrites

Vários fármacos incluindo a condroitina, glicosamina, diacereina e extratos insaponificados de soja e abacate, demonstraram efeito estruturais capazes de atrasar a degradação da estrutura articular na OA. (STRUCTURE..., 2009).

Nas recomendações OARSI publicadas em 2010, as evidências para eficácia sintomática dos insaponificados de soja e abacate avaliadas em uma revisão sistemática apresentaram uma considerável heterogeneidade de resultados, tornando inconclusiva sua eficácia. A diacereina, um derivado de antraquinona, mostrou pequena eficácia para a redução da dor com considerável heterogeneidade entre os ensaios e a diarreia uma complicação significativa. (DAS; FAROOQI, 2008; WILLIAMS; SPECTOR, 2006; ZHANG et. al., 2010)

As recomendações EULAR, publicadas em 2009, baseado em resultados de grandes estudos randomizados, indicam que há evidências suficientes para uma atualização das diretrizes atuais, e que os estudos “Zurich” e “STOPP” demonstraram a capacidade da condroitina para abrandar a progressão radiológica de OA, assim como apresentam efeitos

modificadores estruturais, além do seu comprovado efeito sintomático. (NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; STRUCTURE..., 2009).

4.5.2.5 Opióides

A administração de opióides pode ser uma alternativa para os pacientes sintomáticos com contra indicação formal para uso de AINEs, ou para aqueles pacientes sintomáticos que não respondem de forma satisfatória ao tratamento com AINEs. Os benefícios associados ao uso de opióides foram limitados pelos frequentes efeitos colaterais, incluindo náusea, constipação, tonturas, sonolência e vômito. Mas sua recomendação associada ou não ao paracetamol está presente nas diretrizes de tratamento estudadas. (DAS; FAROOQI, 2008; NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE, 2008; WILLIAMS; SPECTOR, 2006; ZHANG et al., 2007b; ZHANG et al., 2010).

4.5.3 Modalidades cirúrgicas de tratamento

Para pacientes com OA, que não estão obtendo alívio adequado da dor e da função articular com tratamento combinado farmacológico e não farmacológico, o tratamento cirúrgico deve ser considerado, pois é eficaz e tem uma boa relação custo-benefício.

Os principais procedimentos cirúrgicos realizados são: artrodese, desbridamento artroscópico, osteotomias e as próteses de substituição parciais ou totais das articulações acometidas. (DAS; FAROOQI, 2008; FRÍAS et al., 2009; NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS, 2008; STRUCTURE..., 2009).

4.6 SISTEMAS IMPLANTÁVEIS

A busca por sistemas cada vez mais eficientes direcionam as pesquisas para um sistema “inteligente” de transporte, de certa forma buscando a “bala mágica” proposta por Paul Ehrlich há um século atrás, que postulava o desenvolvimento de um fármaco capaz de destruir seletivamente as células doentes sem danificar as células saudáveis. Paul Ehrlich estava procurando um quimioterápico ideal, talvez sistemas implantáveis possam ser a “bala

mágica”. (FREICHELS; JÉRÔME; JÉRÔME, 2011; JUBELI et al., 2011; PARK et al., 2010).

A administração de fármacos mantendo concentrações plasmáticas em níveis terapêuticos tem sido um grande desafio desde o início de sua utilização no final dos anos 1800. A administração de fármacos de forma intermitente, seja por via oral ou parenteral, apresenta a desvantagem potencial de intercalar picos de alta concentração plasmática, podendo levar à toxicidade e picos de baixa concentração que podem ser subterapêuticos. (DASH; CUDWORTH, 1998).

Além disso, uma quantidade significativa do fármaco administrado é distribuída sobre os tecidos que não estão envolvidos no processo patológico onde podem ocasionar graves efeitos colaterais. (PARK et al., 2010).

Nas últimas décadas a procura por novas tecnologias para proporcionar liberação controlada de fármacos tiveram um grande impulso, pesquisas em busca de materiais que possam levar à liberação constante de um medicamento, sustentada por um período prolongado de tempo foi alcançada com a utilização de sistemas de variadas composições que podem proporcionar entrega controlada de fármacos. (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008; FREICHELS; JÉRÔME; JÉRÔME, 2011; PARK et al., 2010; LANGER, 1998; VENKATARAMAN et al., 2011; WILSON et al., 2010).

Existem vários fatores que devem ser levados em conta para o desenvolvimento destes sistemas para liberação controlada de fármacos. A biocompatibilidade com o meio ambiente humano é essencial para que os sistemas sejam implantados, portanto devem ser quimicamente inertes, não carcinogênicos, hipoalérgicos e mecanicamente estáveis no local do implante. Além disso, não podem sofrer modificações físicas ou químicas nem causar resposta inflamatória local. (DASH; CUDWORTH, 1998; SUN et al., 2006).

Sistemas implantáveis podem ser biodegradáveis ou não e ambos oferecem várias vantagens em relação à forma tradicional de administração de medicamentos, incluindo a melhora na eficácia do fármaco, a redução da toxicidade e a comodidade para o paciente. Sistemas biodegradáveis tem recebido preferência para uso em humanos, por não necessitarem cirurgia adicional para sua remoção após o tratamento. (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008; DASH; CUDWORTH, 1998; LANGER, 1998).

Um sistema implantável para entrega de fármacos é composto basicamente por um sistema transportador e um agente terapêutico. O fármaco pode ser incorporado ao sistema transportador por absorção passiva ou por conjugação química. (PARK et al., 2010).

Uma grande variedade de materiais, como polímeros naturais ou sintéticos, lipídios, surfactantes, dendrímeros e polissacarídeos como a celulose e seus derivados alginatos e quitosanas, têm sido utilizado como transportadores de fármacos. (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008; FREICHELS; JÉRÔME; JÉRÔME, 2011; KEDAR et al., 2010; LEE; FEIJEN, 2011; PARK et al., 2010).

A classificação destes sistemas de transporte, assim como o mecanismo pelo qual o fármaco é liberado do sistema, o tipo de absorção que apresenta e outras propriedades físico químicas sofrem ampla variação devido à diversidade de materiais utilizados. (CARMIGNAN; BIDONE; KEDAR et al., 2010; LEMOS-SENNA, 2008; LIU et al., 2011; WILSON et al., 2010).

Podemos citar um dos polímeros mais estudados, os poliésteres alifáticos biodegradáveis, como o poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), e seus copolímeros, poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Estes polímeros sofrem hidrólise por reações químicas quando em contato com o meio aquoso dos fluidos corporais sendo metabolizados para dióxido de carbono e água e serão excretados pelos rins. (CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008; LIU et al., 2011; WILSON et al., 2010).

Em vários modelos de transportadores, à medida que o polímero vai sendo metabolizado, moléculas do fármaco retidas no sistema serão liberadas nos fluidos corporais. (DASH; CUDWORTH, 1998; SERSHEN; WEST, 2002).

A velocidade de biodegradação do polímero depende de algumas propriedades químicas, como a configuração das cadeias poliméricas e a massa molar, que podem ser alterados modificando a velocidade de liberação dos fármacos. (SERSHEN; WEST, 2002; SUN et al., 2006).

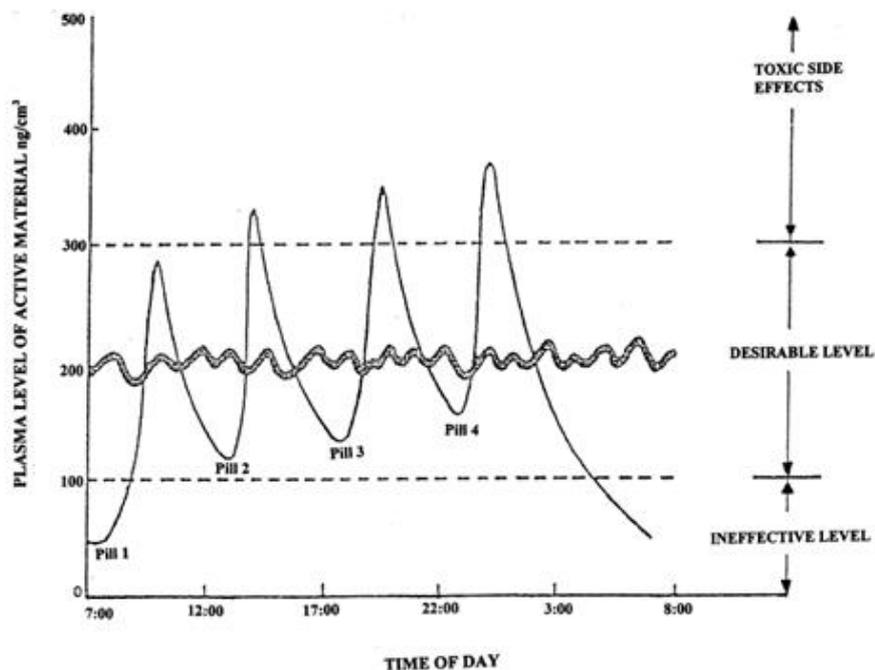
Os sistemas podem ser controlados por absorção de água, por difusão ou por taxas de erosão. Além disso, os sistemas podem funcionar induzidos por alterações no pH, campos magnéticos, ultrassom, campos elétricos, temperatura, luz e estimulação mecânica, entre outras técnicas já em uso e as que estão sendo investigadas. (LEE; FEIJEN, 2011).

Sistemas de liberação controlada de fármaco podem proporcionar o controle de dois pontos importantes na administração de medicamentos, o controle do tempo de ação do medicamento em doses terapêuticas e o controle da distribuição dos fármacos, ou seja, o transporte do fármaco ao seu local de ação. (DASH; CUDWORTH, 1998; SUN et al., 2006; UHRICH et al., 1999).

4.6.1 Controle da liberação

O controle temporal proporcionado por estes sistemas incluem a liberação controlada do fármaco por um período de tempo pré-determinado durante o tratamento, evitando assim que a concentração do fármaco permaneça alguns períodos fora da janela terapêutica, figura 1. (FREICHEL; JÉRÔME; JÉRÔME, 2011; UHRICH et al., 1999).

Figura 1 - Perfil de concentração plasmática de um fármaco em função do tempo, comparando administração oral e administração com dispositivo de liberação programada.



Fonte: Dash e Cudworth (1998).

O controle do fluxo de fármacos para fora dos sistemas a uma taxa constante pode ser controlado por diversos mecanismos, dependendo das propriedades físico químicas dos polímeros utilizados. (UHRICH et al., 1999).

Um dos mecanismos consiste em dissolver o fármaco junto com o polímero. O fármaco é encapsulado no sistema polimérico, desta forma ao controlarmos a cinética de dissolução do polímero controlamos a liberação do fármaco. (CARMIGNAN; BIDONE; FREICHEL; JÉRÔME; JÉRÔME, 2011; LEE; FEIJEN, 2011; LEMOS-SENN, 2008).

Podemos também utilizar polímeros insolúveis que retardam a liberação da molécula do fármaco dificultando sua saída do sistema. Sistemas poliméricos podem ser fabricados como matrizes onde o fármaco é distribuído através de uma membrana que limita a velocidade de saída e protege o reservatório de fármacos dos fluidos biológicos.

(CARMIGNAN; BIDONE; LEMOS-SENNA, 2008; DASH; CUDWORTH, 1998; UHRICH et al., 1999).

Podem utilizar ainda gradientes de pressão osmótica, onde a pressão é aliviada pelo fluxo da solução para fora do dispositivo e a taxa de fluxo é controlada através do diâmetro dos poros da membrana. (UHRICH et al., 1999).

Outra forma de controle é a liberação mediante resposta, onde o fármaco é liberado por alteração na homeostase do organismo. Este tipo de sistema está em estudo com um projeto de liberação de insulina em resposta ao aumento dos níveis de glicose no sangue. (PARK et al., 2010; UHRICH et al., 1999).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 REAGENTES

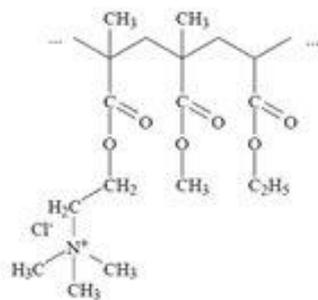
Tampão fosfato (Sigma S.A., USA), Detergente HTAB (Sigma S.A., USA), NaOH (Vetec S.A, Brasil) Sulfato de zinco (Vetec S.A. Brasil), Fosfato de sódio (Sigma S.A, USA) Tampão PBS, Solução de Griess, Etanol (Lafam S.A., Brasil), cloridrato de cetamina (Fort Dodge Ltda, Brasil) , cloridrato de xilazina (Sespo Ltda, Brasil) éter etílico (F.Maia Ltda, Brasil). Todos os materiais foram utilizados sem prévia purificação.

5.1.2 POLÍMEROS

Eudragit RS 100

O EUDRAGIT[®] RS 100 (figura 2) é um copolímero de etil acrilato, metil metacrilato e baixa quantidade de ácido metacrílico com grupos amônio quaternário. Apresenta alta permeabilidade e sua insolubilidade não é pH dependente. Foi obtido da Evonik Industries (Essen, Alemanha) e utilizado sem prévia purificação.

Figura 2 - Estrutura química do EUDRAGIT® RS 100.

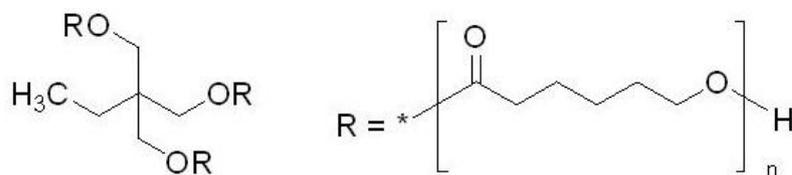


Fonte: Evonik Industries (2013).

Policaprolactona-triol (PCL-T)

A policaprolactona-triol (figura 3) é um poliéster alifático de massa molar 900 g/mol, com aspecto físico pastoso, ponto de fusão em 33 °C (conforme fabricante) solubilidade em água. Foi obtido da Aldrich Chemical Co. Inc. (St. Louis, USA) e utilizado sem prévia purificação.

Figura 3 - Policaprolactona triol (PCL-T).



Fonte: Sigma Aldrich (2013a).

Polietilenoglicol 400 (PEG 400)

O polietilenoglicol 400 (figura 4) é um polímero de baixa massa molar derivado do etileno glicol. É um líquido claro, transparente e viscoso usado nas mais variadas formulações farmacêuticas, principalmente devido a sua baixa toxicidade.

Figura 4 - Estrutura química do PEG 400.



Fonte: Sigma Aldrich (2013b).

5.2 PRODUÇÃO DOS SISTEMAS IMPLANTÁVEIS

Foram produzidos dois sistemas de liberação prolongada de diclofenaco de sódio (Galena S.A., SP, Brasil) pelo processo de dissolução prévia em solvente comum e secagem em placa de Teflon. Na tabela 1 estão apresentadas as concentrações de cada componente utilizado na formulação dos dispositivos.

Tabela 1 - Concentração dos componentes utilizados para produção dos dispositivos implantáveis.

DISPOSITIVO	EUDRAGIT-L (mg)	PEG (mg)	PCL-T (mg)	DICLOFENACO DE SÓDIO (mg)	ETANOL (ml)
EUDPEG	1350	600	0	975	35
EUDPCL-T	1350	0	600	862	35

Fonte: Elaboração do autor, 2013.

A concentração de diclofenaco de sódio incorporado aos sistemas foi a máxima suportada pela matriz polimérica sem que ocorresse separação de fase. As massas de polímeros e fármaco descritas na tabela 1 foram solubilizadas em etanol e a solução foi vertida dentro de uma placa de teflon. Esta placa foi mantida a temperatura ambiente até total secagem. Após secos, os filmes produzidos foram armazenados em placas de petry fechadas. Os filmes produzidos foram utilizados para caracterização ótica e mecânica e cortados em peças com 1 mm de largura e 11 mm de comprimento para utilização nos ensaios *in vivo*.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS IMPLANTÁVEIS

5.3.1 Caracterização visual

Para caracterizar o aspecto físico do material utilizado para produção dos dispositivos foram obtidas fotomicrografias utilizando uma Lupa Leica com aumento de 25x.

5.3.2 Análises mecânicas

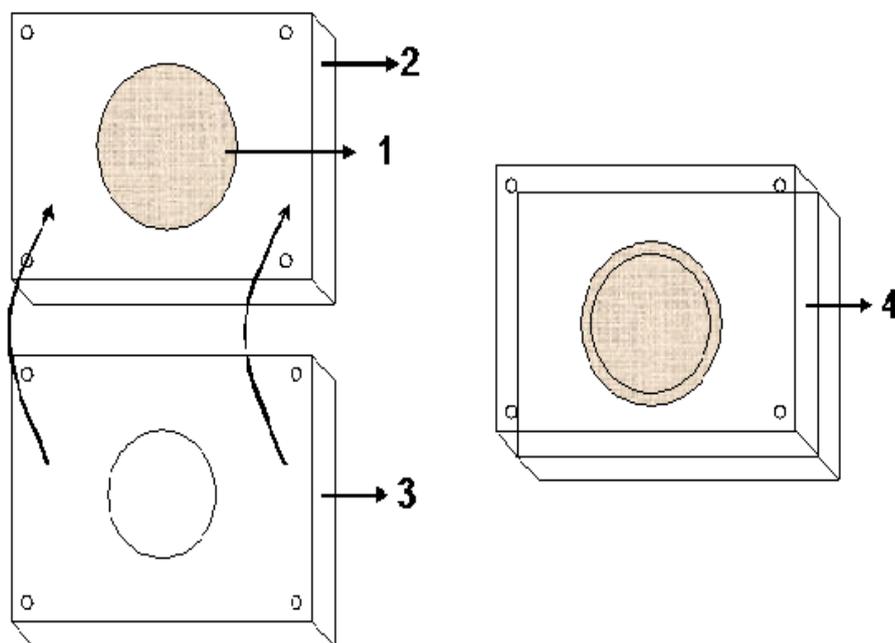
Os ensaios dinâmicos de amostras dos filmes utilizados para produzir os dispositivos foram analisados em equipamento de análise dinâmico-mecânico DMA Q800 da

TA Instruments, pertencente ao laboratório POLIMAT na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os ensaios foram realizados em temperatura constante de 37°C e taxa de carregamento de 1N/min até uma força máxima de 18 N. As respostas avaliadas foram módulo elástico na faixa de deformação entre 0,2 a 0,4%, tensão máxima e deformação de ruptura, sendo estas obtidas a partir da análise de 3 amostras.

5.3.3 Estudos de liberação

Os estudos de liberação foram realizados utilizando o equipamento de dissolução modelo Ética com 6 cubas e uma célula de liberação apresentada na figura 5. Os filmes (1) utilizados para produção dos dispositivos foram cortados em pedaços circulares com 4 cm de diâmetro e colocados sobre uma placa de acrílico (2). Sobre esta foi colocada uma membrana filtrante de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,45 µm, para evitar o contato direto do filme com a solução receptora, em seguida estes foram fixados com uma segunda placa de acrílico (3).

Figura 5 - Célula de liberação utilizada para estudos de liberação dos fármacos.



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

A célula foi imersa em 350 mL de solução tampão fosfato (pH = 7,4) com agitação de 120rpm, mantido à temperatura de 37 °C ± 1,0 °C. Foram retiradas amostras da

solução durante um período de 11 dias e a concentração de diclofenaco de sódio liberada foi determinada por espectroscopia de ultravioleta (Hitachi 2010, Japão) em λ_{max} 272 nm, sendo os testes realizados em triplicata. Após cada coleta da amostra foi adicionado um volume igual ao retirado de tampão fosfato ao meio de dissolução para manutenção constante do volume e das condições sink.

A concentração de diclofenaco de sódio liberado dos filmes foi calculada através da equação da reta derivada da curva de calibração do diclofenaco com coeficiente de correlação igual a 0,99838 sendo coeficiente linear igual a 0,0046 e coeficiente angular 32,9342. O coeficiente de variação entre análise foi de 2,5% (precisão) e a exatidão na presença dos componentes da formulação de 98,7%.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-EDEMATOGÊNICA

5.4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 70 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, oriundos do biotério central da Universidade do Sul de Santa Catarina, com peso variando de 250 a 350 g, os animais foram mantidos em caixas coletivas com 4 ou 3 animais cada uma, em regime de luz claro/escuro de 12 horas e temperatura controlada em 22 °C, alimentados com água e ração balanceada *ad libitum*, as caixas foram higienizadas semanalmente, os animais permaneceram neste local por um período de 11 dias.

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma combinação de cloridrato de ketamina a uma concentração de 0,04 mL/100g e Xilazina a 2% na concentração de 0,08 mL/100g de massa corporal. (BOLDRINI, 2010).

A forma de eutanásia adotada foi por overdose de anestésico com éter em câmara fechada sendo que os animais foram colocados nesta câmara sob anestesia (descrito anteriormente). O procedimento foi acompanhado por um médico veterinário, conforme Resolução N° 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Os resíduos gerados não acarretaram riscos ao meio ambiente e a saúde pública, sendo descartados como lixo orgânico. Os animais mortos após os procedimentos foram destinados ao responsável pelo biotério. Os estudos tiveram início após a aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL).

5.4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos denominados grupos DICL, EUDPEG, EUDPCL-T, CRGN e CONTROLE contendo quatorze animais cada grupo, totalizando setenta animais no estudo.

No primeiro dia os ratos foram anestesiados, pesados e tiveram a espessura do joelho direito medida com micromêtro digital Insize modelo 3109 e em seguida foram iniciados os tratamentos.

Os ratos do grupo DICL foram receberam 7,5 mg (correspondente a 25 mg/Kg) de diclofenaco de sódio através de sonda gástrica introduzida por via oral em dose única diária durante 11 dias (PIAO et al., 2006).

Nos ratos do grupo EUDPEG foram implantados os dispositivos EUDPEG na região poplíteia do joelho direito contendo 3,6 mg de diclofenaco de sódio.

Nos ratos do grupo EUDPCL-T foram implantados os dispositivos EUDPCL-T na região poplíteia do joelho direito contendo 3,0 mg de diclofenaco de sódio.

Os ratos do grupo CRGN e CONTROLE nada receberam no primeiro dia.

No 4º dia após o início do tratamento os ratos foram novamente anestesiados. Nos grupos DICL, EUDPEG, EUDPCL-T e CRGN foram induzidos a artrite do joelho direito por injeção intra-articular de 0,4 ml de carragenina (3% em soro fisiológico). Já os ratos do grupo CONTROLE receberam injeção intra-articular de 0,4 ml soro fisiológico no joelho direito.

Após seis horas da indução da artrite, sete ratos de cada grupo escolhidos aleatoriamente foram anestesiados para medição do edema de joelho, seguido de eutanásia para ressecção do estômago e do joelho direito. As lesões gástricas foram contadas e tecidos moles do joelho foram coletados para pesquisa de mieloperoxidase (MPO) e nitritos/nitratos.

Após 7 dias da indução da artrite os ratos remanescentes em cada grupo foram submetidos ao mesmo procedimento.

Não foi possível formar um grupo controle contendo apenas dispositivos de EUDPEG e EUDPCL-T sem adição de diclofenaco de sódio para avaliar possíveis efeitos adversos causados pelo implante. Quando da produção dos dispositivos sem a adição do diclofenaco de sódio, o material resultante era imiscível e extremamente sem maleabilidade, impossibilitando a obtenção de um material com características possíveis de serem implantados nos joelhos dos ratos.

5.4.3 Indução da Osteoartrite

Os ratos foram anestesiados e imobilizados em mesa cirúrgica, a osteoartrite foi induzida através de administração intra-articular de 0,4 ml de carragenina (3%), utilizando agulha hipodérmica de 12,7mm x 0,33 mm inserida no espaço intra-articular entre o fêmur e a tíbia do joelho direito (figura 2) (GENSKE, 2005; NEUGEBAUER et al., 2007).

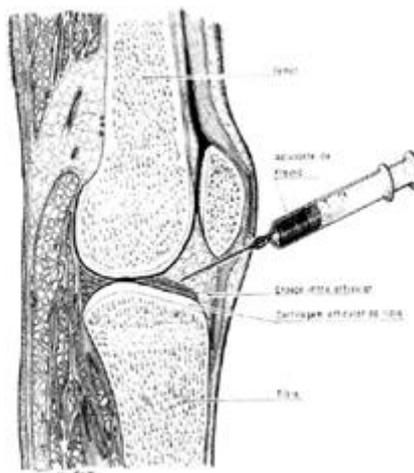
Para avaliar a atividade dos dispositivos implantados contendo baixas doses de diclofenaco de sódio, foi comparado seu efeito anti-inflamatório com o efeito do diclofenaco de sódio administrado por via oral em animais que tiveram artrite induzida por carragenina no joelho direito.

O modelo de inflamação produzida por carragenina foi descrito por Winter *et al* no ano de 1960. A alga *Chondrus crispus* conhecida como “Irishmoss” é a principal fonte de produção de carragenina, um polissacarídeo sulfatado, agente flogístico que causa reação inflamatória.

A inflamação gerada por carragenina é do tipo aguda, não imune e bifásica. Os agentes pró-inflamatórios são produzidos por células ou derivados do plasma em uma sequência que se convencionou chamar de cascata inflamatória, com uma variedade de mediadores atuando em sequência para produzir a resposta inflamatória. Na fase inicial (0-1 h) ocorre liberação de histamina, serotonina e bradicinina. A fase posterior (1-6 h) está correlacionada com elevada produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 e liberação de óxido nítrico (LARANJEIRA; SILVA, 2011).

A artrite induzida por carragenina é dose dependente e pode produzir um efeito de longa duração em modelos animais. A injeção intra-articular de 3 mg de carragenina diminui a latência do limiar de retirada tanto mecânica como ao calor de forma significativa em 4 horas e duram 7 semanas, enquanto doses de 1 mg produz efeito por 3 semanas e dose de 0,3 mg produz efeito por 24 h. A artrite induzida produz edema na articulação acometida que pode ser mensurável pela medida do diâmetro articular antes e depois da injeção. Neste modelo, o diâmetro da articulação injetada com carragenina aumenta para nível máximo 8 horas após a injeção, e progressivamente vai diminuindo dependendo da dose injetada (MA; ZHANG, 2011; MIN et al., 2001; SILVA, 2012).

Figura 6 - Desenho esquemático de joelho de rato, aplicação da injeção intra-articular de carragenina.



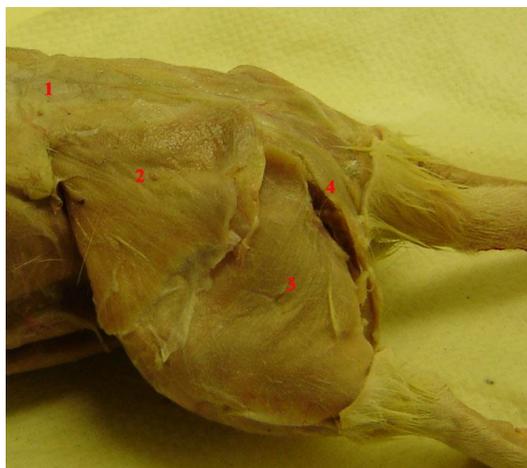
Fonte: Guerino (2001).

O modelo é facilmente reproduzível e mensurável e tem sido utilizado como ferramenta farmacológica para experimentos que envolvem a análise de processos inflamatórios (DI ROSA, 1972). A Carragenina induz reação inflamatória aguda (edema) e crônica (granuloma), e segundo Di Rosa (1972) a reação aguda é mais apropriada para o ensaio de fármacos antirreumáticos, mesmo que estes fármacos sejam dirigidos ao processo crônico da inflamação.

5.4.4 Implantação dos dispositivos

Os sistemas implantáveis produzidos, foram implantados sob anestesia (descrita no item 5.2), na região poplíteia dos joelhos direitos dos ratos dos grupos EUDPEG E EUPCL-T em posição medial ao tendão do bíceps femoral e lateral ao músculo semitendinoso, junto à cápsula articular posterior do joelho. Para a implantação foi utilizado agulha hipodérmica 40-90 mm inserida na região poplíteia.

Figura 7 - Anatomia da coxa do rato.



Legenda: 1-Facia lombo dorsal; 2- Glúteo superficial; 3- Bíceps femoral; 4- semitendinoso.
Fonte: Pennstate (2012).

Figura 8 - Anatomia da coxa do rato.



Legenda: 1-Glúteo superficial (refletido); 2- Glúteo médio 3-Piriforme; 4-Semitendinoso; 5 - Bíceps femoral; 6- Semimembranoso; 7 - Vasto lateral; 8-Gastrocnêmio.
Fonte: Pennstate (2012).

5.4.5 Quantificação do edema nos joelhos dos ratos através da medida do diâmetro da articulação do joelho induzido à artrite

O diâmetro da articulação do joelho foi definido como a distância entre as regiões do ligamento colateral medial e lateral medido com micromêtro digital com o joelho em extensão. A variação do diâmetro do joelho após administração de carragenina foi determinada em função do diâmetro inicial medido (MIN et al., 2001; SILVA, 2012).

5.4.6 Doseamento dos mediadores inflamatórios na articulação

Nos ratos sacrificados foram retiradas as cápsulas articulares e estruturas tendinosas peri articulares, que foram homogeneizadas em 0,3 mL de soro fisiológico, pH 7,4 com homogeneizador Turrax durante 10 segundos, o material homogeneizado foi colocado em Freezer a -20 C° para posterior análise (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; CUNHA et al., 2008; DEVI et al., 2007).

No dia do experimento as amostras foram retiradas do freezer e aquecidas durante 2h a 60°C em estufa para inativação da atividade endógena da catalase. Após o aquecimento foram centrifugadas a 12.000g durante 2 min, e neste centrifugado foram pesquisados MPO e Nitritos (BARSANTE et al., 2005).

Para pesquisa do MPO 10 µL do sobrenadante foi pipetado e acrescidos de 200µL de uma solução tampão de fosfato de potássio (pH=6) contendo 0,164mg/mL de dihidrocloro de o-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (LARANJEIRA; SILVA, 2011).

A H₂O₂ é quebrada pela MPO liberada dos tecidos homogeneizados com o detergente HTAB. O radical oxigênio resultante combina com a o-dianisidina que é convertido em um composto colorido. A formação deste composto ao longo do tempo é medida utilizando-se um espectrofotômetro e desta forma determina a quantidade de MPO no tecido. (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; KASAMA et al., 1995; MENEGUZZO, 2010).

O óxido nítrico (NO) foi quantificado pela pesquisa de seus metabólitos estáveis nitrato (NO₃) e nitrito (NO₂). As amostras foram desproteinizadas adicionando-as hidróxido de sódio (2,5 N) e sulfato de zinco (10%), logo a seguir, 300µL dos lavados das partes moles dos joelhos foram diluídos em uma solução de formato de amônio (30 µL), fosfato de sódio (30 µL). A solução foi incubada durante 2 h, em estufa à 37°C, depois centrifugada (50 x g, por 5 min). Cerca de 250 µL do sobrenadante foi coletado em uma cubeta e adicionado o mesmo volume de solução de Griess (sulfanilamida (1%) (p/v), ácido fosfórico (5%) (v/v) e N-(1-naftil) etilenodiamina (0,1%) (p/v) e incubado durante 10 minutos, à temperatura ambiente.

A reação de NO₂ produz uma coloração rósea, que foi quantificada através da medida das absorbâncias em espectrofotômetro Hitachi 2000 no comprimento de onda de 540 nm. A quantificação de NO₃ e NO₂ expressos em µM foi determinada em função de uma

curva-padrão com concentrações previamente conhecidas de (0-150 μ M) (MONTANHER, 2006).

5.5 Avaliação das lesões gástrica

Após a eutanásia foi removido o estômago dos ratos que foram incisados ao longo da curvatura maior, lavado com solução de NaCl a 0,9%. O órgão foi analisado sob visão em estereomicroscópio (CARVALHO et al., 2011; FILARETOVA et al., 2002), as lesões ulcerativas foram medidas e classificadas conforme o grau de severidade de acordo com o descrito por Szelenyi e Thiemer (1978).

Lesões nível 1 (pontos hemorrágicos < 1mm), nível 2 (úlceras de 1 a 3 mm de extensão) e nível 3 (úlceras profundas > 3mm de extensão). Para cada grupo de tratamento foi calculado um índice de lesões ulcerativas (I.L.U.) obtido através da equação:

$$\text{I.L.U.} = (\Sigma \text{ lesões nível 1}) + (2 \times \Sigma \text{ lesões nível 2}) + (3 \times \Sigma \text{ lesões nível 3}).$$

(KUSHIMA, 2006; COLA-MIRANDA et al., 2006; SZELENYI; THIEMER, 1978).

5.6 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido à aprovação do CEUA da Unisul e os testes em laboratório iniciaram após a sua aprovação registrada sob o número 12.013.4.01 IV.

Todos os pesquisadores envolvidos no estudo receberam treinamento para o manejo dos animais, seguiram as técnicas de contensão e as técnicas específicas ligadas aos procedimentos, obedecendo ao que determina a lei 11.794/2008 de 08/10/2008.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de todos os resultados foi realizada através do sistema Graph Pad Prism 6. As variáveis estudadas tiveram como objetivo comparar a ação do diclofenaco sódico administrado em baixa dose por sistema implantável justa articular, com o mesmo fármaco administrado por via oral.

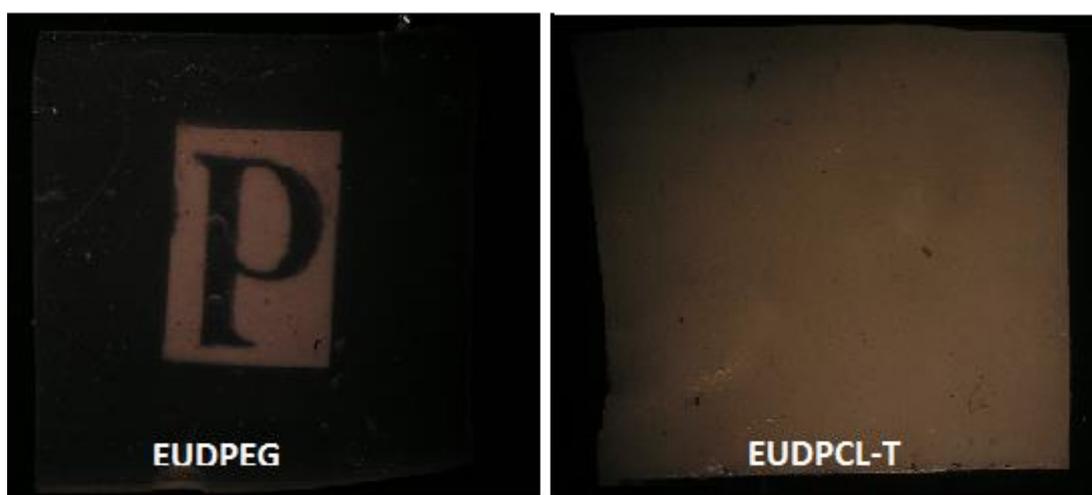
A avaliação quantitativa do edema dos joelhos dos ratos e dos níveis de MPO e Nitrito/nitrato foram comparadas utilizando testes de análise de variância, ANOVA, seguidos do teste de Tukey para comparação entre as médias, utilizando nível de significância de 95%.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 CARACTERIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS POLIMÉRICOS IMPLANTÁVEIS

Na figura 9 estão apresentadas as microscopias obtidas dos filmes utilizados para produzir os dispositivos implantáveis, dispostos sobre uma impressão da letra P com objetivo de verificar a transparência do material.

Figura 9 - Microscopias óticas dos filmes EUDPEG e EUDPCL-T obtidos em aumento de 25x.



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

As microscopias demonstram que os filmes de EUDPEG apresentam total transparência, diferente do observado para EUPCL-T que é totalmente opaco. Tanto o EUDRAGIT RS como o PEG 400 e o PCL-T 900 apresentam transparência quando puros, desta forma é esperado que a mistura miscível destes produzisse um filme transparente que pode ter esta característica alterada pela presença do diclofenaco de sódio na matriz. São esperados dois possíveis comportamentos da adição do diclofenaco de sódio nas matrizes, a cristalização do fármaco durante o processo de produção que produziria filmes opacos ou, a solubilização deste na matriz polimérica produzindo filmes transparentes. Desta forma é possível afirmar que os filmes de EUDPEG apresentam o diclofenaco de sódio solubilizado na matriz polimérica provavelmente atribuída a interação do fármaco com a matriz polimérica.

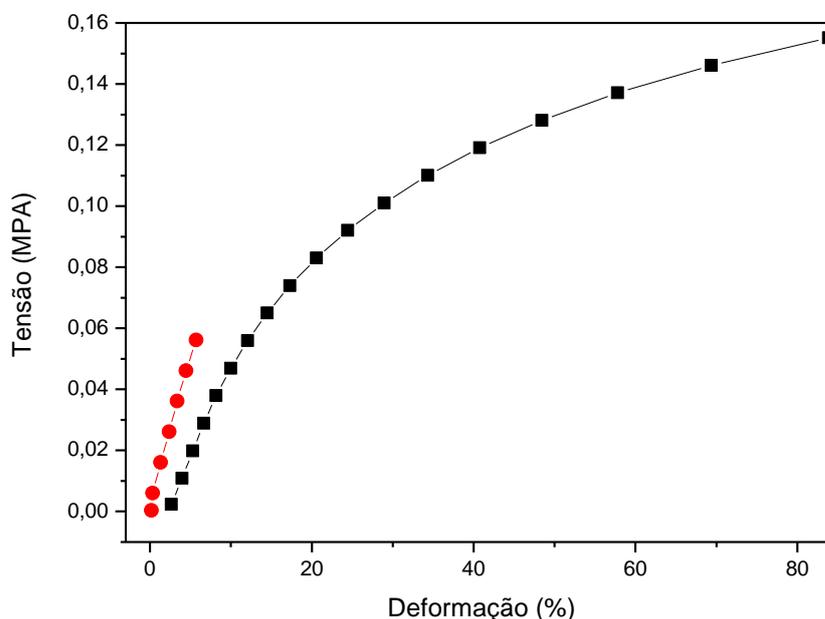
Foram produzidos misturas somente de EUDRAGIT RS e PEG400, para verificar o efeito do diclofenaco na estrutura dos filmes, entretanto o material resultante foi uma mistura transparente disforme e indicativa de imiscibilidade entre os polímeros nesta proporção polimérica. Este resultado demonstra que a estrutura uniforme do filme é dependente da presença do diclofenaco na matriz o qual deve servir de ponte de ligação entre os polímeros.

Para o filme EUDPCL-T é observado um filme totalmente opaco que está associado à cristalização do diclofenaco na matriz. Estas diferenças nas propriedades óticas são indicativos de diferenças nas propriedades físicas das matrizes, fato que pode proporcionar diferenças nos comportamentos de liberação do fármaco da matriz e também nas propriedades mecânicas.

A aplicação final de filmes poliméricos depende muito de suas propriedades mecânicas na temperatura a qual estará sendo aplicado. Por exemplo, para aplicação em sistemas terapêuticos transdérmicos em geral são necessários filmes poliméricos com alta elasticidade a temperatura ambiente (facilitar a aplicação e adesão) e também a temperatura corpórea (conforto e durabilidade). Para sistemas implantáveis é essencial que o material apresente propriedades mecânicas adaptáveis ao local em que este estará inserido. (BHARKATIYA; NEMA; BHATNAGAR, 2010; COSSON, 2003; MEANEY, 1995; SHAH; RAHUL; PRABHAKAR, 2010).

Os testes de tensão informam sobre a resistência e elasticidade dos filmes, refletidos por parâmetros como tensão máxima, módulo de elasticidade e alongação máxima. As curvas de tensão versus deformações correspondentes aos filmes de EUDPEG e EUDPCL-T são mostrados na figura 10 e os valores dos parâmetros mecânicos associados são descritos tabela 2.

Figura 10 - Variação da deformação em função da tensão aplicada nos filmes de EUDPEG (●) e EUDPCL-T (■).



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

Tabela 2 - Valores de tensão máxima, deformação e módulo de elasticidade dos filmes de EUDPEG e EUDPCL-T.

Filme	Tensão máxima (MPa)	Deformação (%)	Módulo de Elasticidade (Mpa)
EUDPEG	$0,067 \pm 0,0091^a$	$9,09 \pm 2,953^a$	$1,45 \pm 0,089^a$
EUDPCL-T	$0,156 \pm 0,0148^b$	$74,79 \pm 14,978^b$	$0,86 \pm 0,159^b$

Legenda: n=3; valores médios com letras diferentes caracterizam diferenças significativas para $p < 0,01$.
Fonte: Elaboração do autor, 2013.

A tabela 2 mostra que o filme de EUDPCL-T apresenta a 37°C uma variação de deformação em função da tensão característico de material elastomérico, entretanto o filme de EUDPEG apresenta um comportamento plástico, com menor capacidade de deformação.

Os resultados apresentados na tabela 2 demonstram que todos os parâmetros mecânicos estudados apresentaram diferenças significativas entre os filmes. Os filmes de EUDPCL-T apresentaram uma maior resistência mecânica caracterizada pela maior tensão máxima suportada pelo corpo de prova (0,156 MPa) e um menor módulo de elasticidade refletindo assim em uma maior capacidade de deformação. Estes filmes apresentaram uma capacidade de deformação média próxima a 75% em relação ao tamanho inicial do corpo de

prova, propriedade extremamente interessante para produção de um dispositivo que será implantado na região lateral do joelho, local de constante movimentação muscular.

Filmes poliméricos puros de EUDRAGIT RS apresentam comportamento mecânico de um plástico, associado a sua característica semicristalina. São bons candidatos para produção de filmes, entretanto necessitam de plastificantes para melhorar suas propriedades mecânicas (ELGINDY; SAMY, 2009).

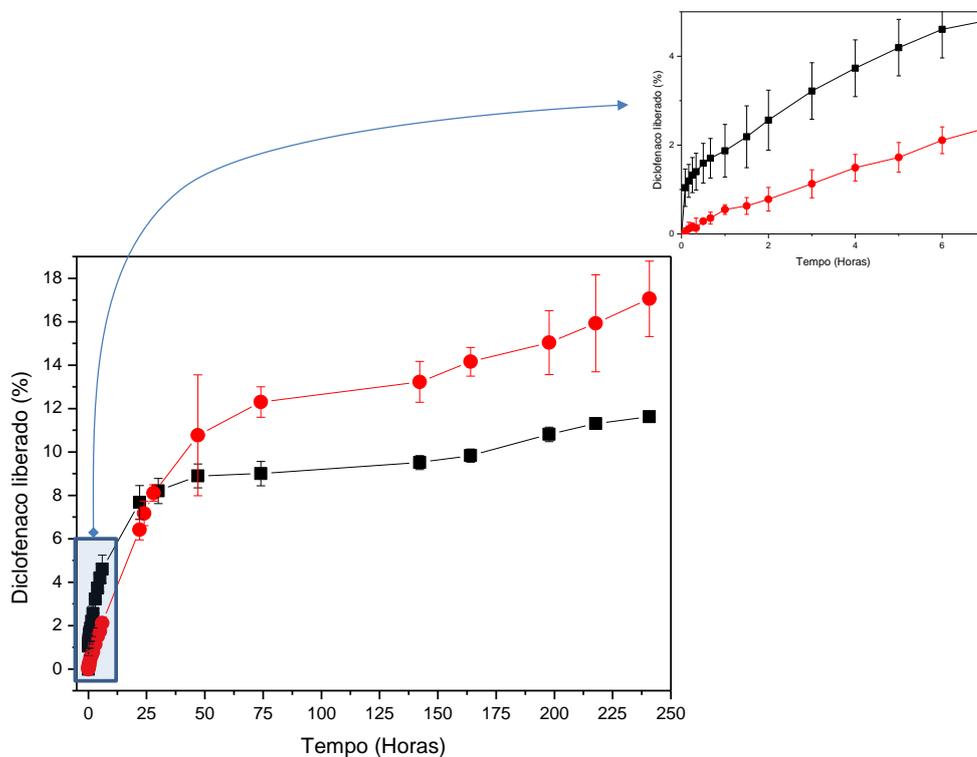
Estudos demonstram que o PEG 400 é um plastificante utilizado em matrizes de EUDRAGIT RS além de ser um ótimo agente solubilizante do diclofenaco de sódio, características que produziram um filme homogêneo, transparente e flexível (LIN; LEE; LIN, 1991).

Estudos demonstram que a PCL-T pode apresentar efeito plastificante sobre materiais poliméricos, fato associado à reduzida massa molar e ao grande número de hidroxilas em sua estrutura química que favorecem a intercalação entre as cadeias poliméricas e também a formação de ligações químicas entre estas. A estrutura química do EUDRAGIT RS 100 (figura 2) demonstra o grande número de carbonilas disponíveis para realizar ligações de hidrogênio com as hidroxilas da PCL-T (figura 3), fato que justificaria o significativo efeito plastificante que produziu elevada capacidade de deformação (KANIS; GENEROSO; SOLDI, 2007; MEIER et al., 2004).

7.2 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO DO DICLOFENACO DE SÓDIO

Na figura 11 estão apresentados os perfis de liberação durante um período de 11 dias do diclofenaco sódio a partir dos filmes utilizados para produzir os dispositivos implantáveis.

Figura 11 - Perfil de liberação do diclofenaco de sódio a partir dos dispositivos EUDPEG (■) e EUDPCL-T (●).



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

Os perfis de liberação demonstram duas fases de liberação para os dois filmes poliméricos. Uma fase acelerada que durou cerca de 24 horas a qual promoveu uma liberação média para ambos os materiais de 8% e uma fase de liberação lenta caracterizada pela inversão na velocidade de liberação entre os filmes.

Na primeira fase o filme EUDPEG apresentou maior velocidade de liberação que pode ser explicada pela elevada solubilidade do diclofenaco no PEG400 o qual também é extremamente solúvel em meio aquoso, fatores que favoreceram a difusão do diclofenaco existente na superfície do filme para o meio de eluição (WYPCH, 2004). Entretanto, o filme EUDPCL-T teve sua velocidade de liberação reduzida devido a menor solubilidade da PCL-T em meio aquoso e também da necessidade de solubilização do diclofenaco cristalizado na superfície do filme para futura difusão (KANIS; SOLDI, 2012).

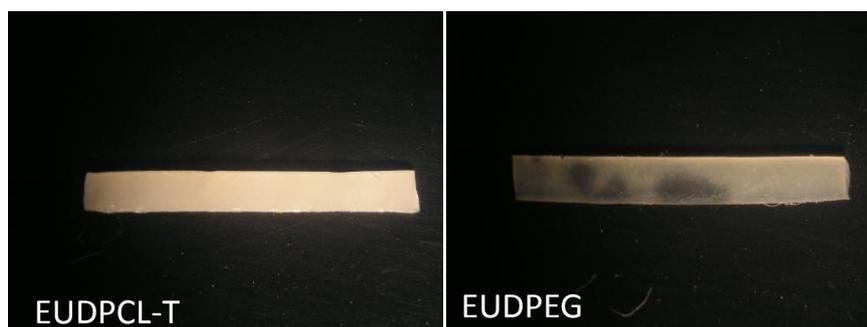
Na segunda fase, é observada uma redução na velocidade de liberação do diclofenaco a partir do filme EUDPEG, comportamento que pode estar associado a interações entre os componentes da formulação conforme discutido na página 10. As interações entre o diclofenaco e a matriz polimérica pode reduzir a velocidade de difusão do fármaco do interior

do filme para o meio de eluição. Entretanto, para o filme EUDPCL-T observa-se uma tendência de aumento da quantidade liberada por tempo quando comparado com EUDPEG. Kanis e Soldi (2012) demonstraram que a liberação de cloridrato de diltiazem de matrizes de polietileno co-metil-acrilato com PCL-T tem sua velocidade aumentada em temperatura de 37 °C devido à fusão deste material o que favorece a difusão do fármaco da matriz. Como os estudos foram conduzidos na temperatura corporal (37 °C) este fenômeno deve ter regido o processo de liberação destes filmes.

7.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS DISPOSITIVOS IMPLANTADOS

Na figura 12 estão apresentados os dispositivos poliméricos obtidos pelo corte dos filmes EUDPEG e EUDPCL-T.

Figura 12 - Dispositivos implantáveis de EUDPCL-T e EUDPEG 11 x 1,0 mm



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

A aplicação dos dispositivos implantáveis em posição medial aos tendões do bíceps femoral e lateral ao semitendinoso e junto à cápsula articular posterior do joelho não apresentou dificuldade técnica no modelo utilizado. Após 11 dias implantados, todos os dispositivos estavam na posição desejada.

A facilidade técnica para colocação dos implantes foi proporcionado pela anatomia da região, onde os tendões dos referidos músculos e a barreira óssea da fossa poplíteia marcam com segurança o local a ser implantado o dispositivo.

Na figura 13 está apresentado o dispositivo implantado na fossa poplíteia.

Figura 13 - Fotografia do dispositivo implantado no joelho após dissecação.



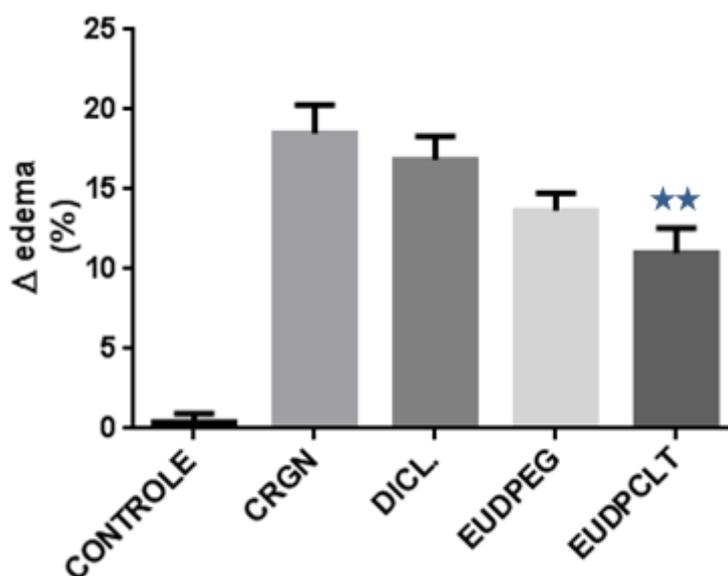
Fonte: Elaboração do autor, 2013.

A figura 13 mostra fotografia retirada do 11º dia do experimento da região posterior do joelho onde é possível observar o dispositivo implantado, localizado entre o músculo bíceps femoral, visto à esquerda na fotografia e o músculo semitendinoso visto à direita na fotografia, o músculo gastrocnêmio foi ressecado, a capsula articular não está visível, mas anatomicamente está localizada abaixo do dispositivo. Foi observado que o dispositivo foi encapsulado por uma fina membrana translúcida e brilhante e que a forma do dispositivo foi alterada.

Segundo Martins Sousa e outros (2008) o implante intramuscular de polimetilmetacrilato, um composto químico semelhante ao EUDRAGIT RS, em camundongo promove uma deposição de colágeno e infiltrados celular de macrófagos sobre o implante e não produzem inflamação crônica. É possível que a deposição de colágeno associado à infiltração de macrófagos no dispositivo implantado associado à retração da membrana observada modifique a forma original do implante EUDPEG E EUDPCL-T.

Na figura 14 esta apresentada a variação do edema após 6 horas da indução da artrite induzida por carragenina nos animais tratados durante 4 dias com diclofenaco de sódio por via oral e pelos dispositivos implantados.

Figura 14 – Avaliação da variação do edema induzido por carragenina em joelho de ratos Wistar do grupo DICL tratados por 4 dias com diclofenaco de sódio (30 mg/Kg/dia), grupo EUDPEG (implante contendo 3,6 mg), grupo EUDPCL-T (implante contendo 3,0 mg), e os grupos CRGN e CONTROLE, 6 horas após a indução da artrite. ($N \geq 6^{**}$ ≠ significativa em relação ao grupo CRGN para um $p < 0,05$).



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

A figura 14 demonstra que os grupos DICL e EUDPEG apresentaram tendência à redução do edema quando comparada ao grupo CRGN, porém sem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O grupo EUDPCL-T apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o grupo CRGN, também foi observado que o grupo EUDPEG e EUDPCL-T não apresentam diferença estatística entre eles, mas ambos são estatisticamente diferentes do grupo DICL.

É possível que a dose de diclofenaco de sódio administrada via oral e a quantidade de fármaco liberado pelo dispositivo EUDPEG, não tenha sido suficiente para reduzir de forma significativa o edema numa fase em que a artrite induzida por carragenina estava muito próxima de seu pico máximo.

Fenômeno similar foi observado por Sun Seek Min e outros, quando os autores compararam a distribuição da carga do joelho induzido à artrite utilizando 5 mg /Kg de morfina intraperitoneal, e não conseguiu um bloqueio completo da alteração da carga no joelho 4 horas após a indução da artrite. Porém após seis horas o efeito analgésico da morfina foi mais evidente e concluiu que a dose pode não ter sido suficiente ou que a perturbação

mecânica causada pelo edema na articulação afetada de alguma forma reduziu a carga de peso sobre a perna (MIN et al., 2001).

Estudos sobre a farmacocinética do diclofenaco de sódio sugerem que seu efeito é dependente da dose e que apresenta uma lenta cinética de equilíbrio entre a concentração plasmática e a concentração no líquido sinovial quando administrado em jejum, condição em que é rapidamente absorvido. O pico de concentração plasmática em humanos ocorre entre 2 e 3 horas após a administração. Em 2,5 horas após o pico, somente 10% da concentração máxima estará presente, e após 8 horas o fármaco mal será detectado no plasma. Porém no líquido sinovial o diclofenaco de sódio será detectado após 2 horas da administração oral em concentração inferior a do plasma. As concentrações do plasma e do líquido sinovial serão equivalentes em 4 horas, e permanecerá relativamente constante no líquido sinovial até 11 horas após a administração do fármaco. (BENSON; AIDA-BENSON; BRANDT, 1985; MIYATAKE et al., 2008; FOWLER et al., 1983; RADERMACHER, 1991; TORRES-LÓPEZ et al., 1997).

Este comportamento pode ser a explicação para o efeito anti-inflamatório e antinocepcivo prolongado do fármaco apesar da meia vida curta no plasma observado em estudos realizados com humanos e em modelos animais, entretanto são necessários no mínimo 2 administrações diárias para manter a concentração do diclofenaco de sódio no líquido sinovial para proporcionar atividade terapêutica (BENSON; AIDA-BENSON; BRANDT, 1985; MARTINS SOUSA et al., 2008; FOWLER et al., 1983).

Os ratos do grupo DICL tiveram a variação de edema determinado após 9 horas da administração do fármaco via oral, dentro do período de 11 horas onde a concentração do diclofenaco de sódio permanece constante no líquido sinovial. (BENSON; AIDA-BENSON; BRANDT, 1985). Estes resultados colaboram com a hipótese que a incapacidade da redução do edema pelo diclofenaco de sódio via oral está relacionado a não efetividade da dose alcançada no líquido sinovial.

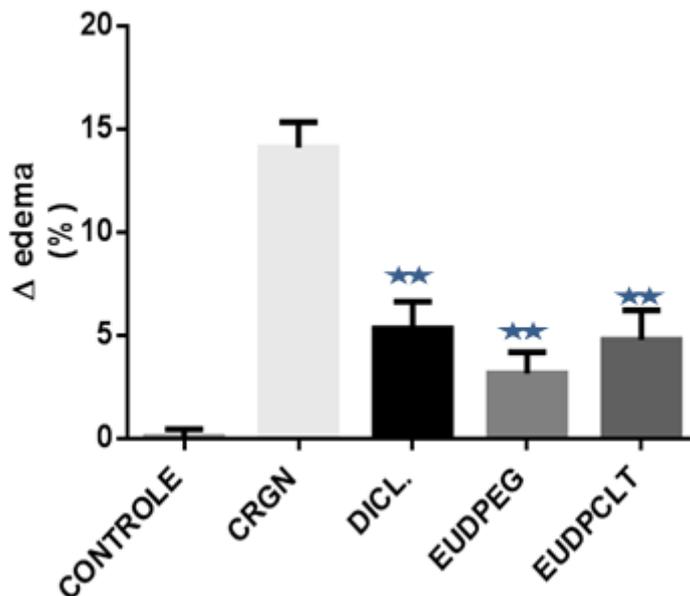
Os sistemas implantáveis podem proporcionar fluxo de fármacos para fora dos dispositivos a uma taxa constante, e desta forma proporcionar a manutenção da concentração do fármaco no líquido sinovial em níveis terapêuticos. (UHRICH et al., 1999).

Uma hipótese que pode explicar a maior atividade do dispositivo EUDPCL-T na redução do edema é a quantidade de ativo liberado pelo dispositivo. Os estudos *in vitro* demonstraram que o dispositivo EUDPCL-T no 4º dia do teste liberou em torno de 12,6 % enquanto o dispositivo EUDPEG liberou 9,1% do fármaco. Extrapolando este resultado obtido *in vitro* para *in vivo* significaria uma liberação 38 % maior de diclofenaco de sódio,

fato que poderia favorecer uma maior concentração do fármaco no líquido sinovial e consequentemente produzir maior efeito anti-inflamatório.

Na figura 15 está apresentada a variação do edema após 7 dias da indução da artrite induzida por carragenina observada nos animais tratados durante 11 dias com diclofenaco de sódio por via oral e pelos dispositivos implantados.

Figura 15 - Avaliação da variação do edema induzido por carragenina em joelho de ratos Wistar do grupo DICL tratados por 11 dias com diclofenaco de sódio (30 mg/Kg/dia), grupo EUDPEG (implante contendo 3,6 mg), grupo EUDPCL-T (implante contendo 3,0 mg), e os grupos CRGN e CONTROLE, 7 dias após a indução da artrite. ($N \geq 6$ ** \neq significativa em relação ao grupo CRGN para um $p < 0,05$).



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

Quando as medidas da circunferência dos joelhos foram tomadas no 7º dia após a indução da artrite, todos os grupos tratados apresentaram redução do edema estatisticamente significativa quando comparado com o grupo que recebeu somente carragenina.

Este modelo de artrite induzida tem pico máximo de edema 8 horas após a injeção, e progressivamente vai diminuindo. A resposta estatisticamente significante ao tratamento com diclofenaco de sódio, numa fase em que o processo inflamatório é menor quando comparado com as fases iniciais pode ser causada por uma melhor adequação da dose

do diclofenaco de sódio disponível para os modelos tratados, com o processo inflamatório vigente no 7º dia após a indução da artrite (MA; ZHANG, 2011; MIN et al., 2001).

Baseado nos resultados de liberação *in vitro* do diclofenaco de sódio e da concentração total nos dispositivos foi calculado a concentração máxima que poderia ser liberada/dia para cada dispositivo (foi considerado uma liberação linear) e comparado às respectivas doses via oral, tabela 3.

Tabela 3 - Doses em miligramas de diclofenaco de sódio administradas por via oral em ratos Wistar e doses liberadas/dia pelos dispositivos implantados calculadas teoricamente a partir dos estudos *in vitro*.

DISPOSITIVO	DICLOFENACO TOTAL NO DISPOSITIVO (mg)	DOSE/DIA (mg)	QUANTIDADE TOTAL ADMINISTRADA (mg)	
			4º dia	11º dia
			EUDPEG	3,0
EUDPCL-T	3,6	0,044	0,174	0,484
DICL. ORAL	-	7,5	30	82,5

Fonte: Elaboração do autor, 2013.

Como pode ser observado na tabela 3 se o comportamento da liberação do diclofenaco de sódio *in vivo e in vitro* for semelhante, a quantidade em miligramas liberadas pelos dispositivos EUDPCL-T e EUDPCL-T será 208 e 170 vezes menor que a dose oral administrada no grupo DICL respectivamente após 11 dias de tratamento. Entretanto, é de conhecimento que as quantidades liberadas por um dispositivo polimérico *in vitro* é muito maior que o observado *in vivo*, assim provavelmente a dose liberada justa articular nos ratos foram ainda inferiores a estes valores.

O efeito anti-inflamatório do diclofenaco de sódio liberado dos sistemas implantáveis com doses tão baixas pode ter sido favorecido pela liberação controlada do fármaco justa articular favorecendo a difusão para cápsula articular e desta para a membrana e líquido sinovial, onde existe afinidade conhecida com o diclofenaco de sódio e onde será o sítio de ação do fármaco (BENSON; AIDA-BENSON; BRANDT, 1985; FOWLER et al., 1983, RADERMACHER, 1991; OWEN; FRANCIS; ROBERTS, 1994; TORRES-LÓPEZ et al., 1997; MIYATAKE et al., 2008).

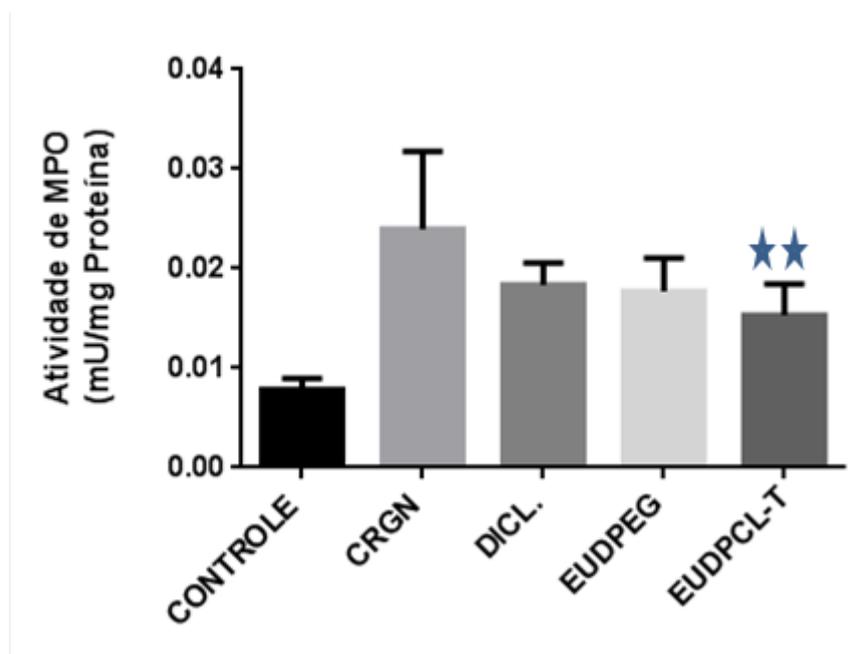
Vários estudos tem demonstrado que o comportamento farmacocinético do diclofenaco de sódio com meia vida curta é inconsistente com seu efeito terapêutico prolongado, e que a atividade anti-inflamatória e antinoceptiva do fármaco estão relacionadas às altas concentrações do fármaco e seus metabólitos ativos no líquido sinovial. Os metabólitos ativos do diclofenaco de sódio, livres e conjugados, apresentam perfis farmacológicos e de concentração similares ao fármaco original e com atividade reduzida nos sistemas de teste. O sistema implantável com liberação prolongada do fármaco em seu local de ação, onde apresenta clara tendência de manter maior concentração quando comparado ao plasma, pode ser um fator favorável para este tipo de administração de fármaco. (BENSON; AIDA-BENSON; BRANDT, 1985; FOWLER et al., 1983; MIYATAKE et al., 2008; OWEN; FRANCIS; ROBERTS, 1994; TORRES-LÓPEZ et al., 1997; RADERMACHER, 1991)

A concentração dos mediadores inflamatórios MPO e Nitritos presentes na articulação dos joelhos induzidos a artrite foram comparados através da análise de variância ANOVA, seguidos do teste de Tukey para comparação entre as médias.

A MPO é um marcador específico de neutrófilos, através de reação bioquímica com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisa a produção de ácido hipocloroso gerando produtos oxidantes de forte ação microbicida e bactericida que irão auxiliar na destruição de agentes estranhos por meio da liberação de espécies reativas de oxigênio e também podem estar envolvidos na progressão de lesões teciduais em processos inflamatórios crônicos. (GOULART, 2006; LARANJEIRA; SILVA, 2011; MONTANHER, 2006).

Na figura 16 está apresentada a variação de atividade da MPO observada nos animais tratados durante 4 dias com diclofenaco por via oral e pelos dispositivos implantados após 6 horas da indução da artrite por carragenina.

Figura 16 – Avaliação da variação da concentração de MPO em joelho de ratos Wistar do grupo DICL tratados por 4 dias com diclofenaco de sódio (30 mg/Kg/dia), grupo EUDPEG (implante contendo 3,6 mg), grupo EUDPCL-T (implante contendo 3,0 mg), e os grupos CRGN e CONTROLE, 6 horas após a indução da artrite. ($N \geq 6^{**} \neq$ significativa em relação ao grupo CRGN para um $p < 0,05$).



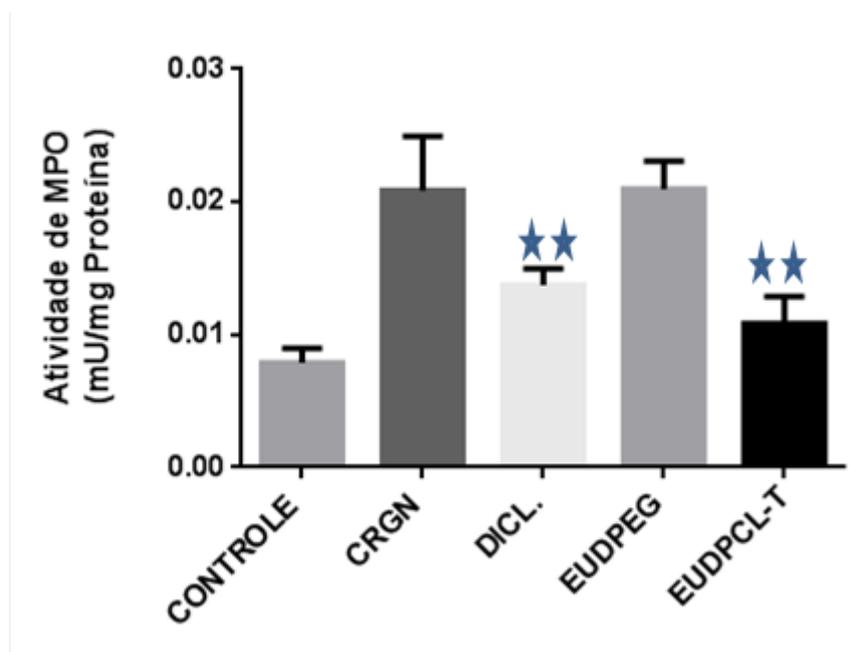
Fonte: Elaboração do autor, 2013.

Seis horas após a indução da artrite por carragenina a atividade de MPO mostrou uma tendência de menor atividade nos grupos DICL e EUDPEG quando comparados com o grupo CRGN, porém somente o grupo EUDPCL-T apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Estes resultados corroboram com os dados encontrados para o edema de joelho no mesmo período, onde os grupos DICL e EUDPEG também não conseguiram efeito estatisticamente significativo numa fase em que a artrite induzida por carragenina estava muito próxima do seu pico máximo, e o motivo neste caso pode ser o mesmo, ou seja, a dose de diclofenaco de sódio administrada via oral e liberada pelo EUDPEG foi insuficiente para diminuir a atividade do MPO de forma estatisticamente significativa após seis horas da indução da artrite, enquanto o EUDPCL-T, com maior coeficiente de liberação do fármaco foi estatisticamente significativo para diminuir a atividade de MPO.

Na figura 17 está apresentada a variação de atividade da MPO observada nos animais tratados durante 11 dias com diclofenaco por via oral e pelos dispositivos implantados após 7 dias da indução da artrite.

Figura 17 - Avaliação da variação da concentração de MPO em joelho de ratos Wistar do grupo DICL tratados por 11 dias com diclofenaco de sódio (30 mg/Kg/dia), grupo EUDPEG (implante contendo 3,6 mg), grupo EUDPCL-T (implante contendo 3,0 mg), e os grupos CRGN e CONTROLE, 7 dias após a indução da artrite. ($N \geq 6^{**}$ ≠ significativa em relação ao grupo CRGN para um $p < 0,05$).



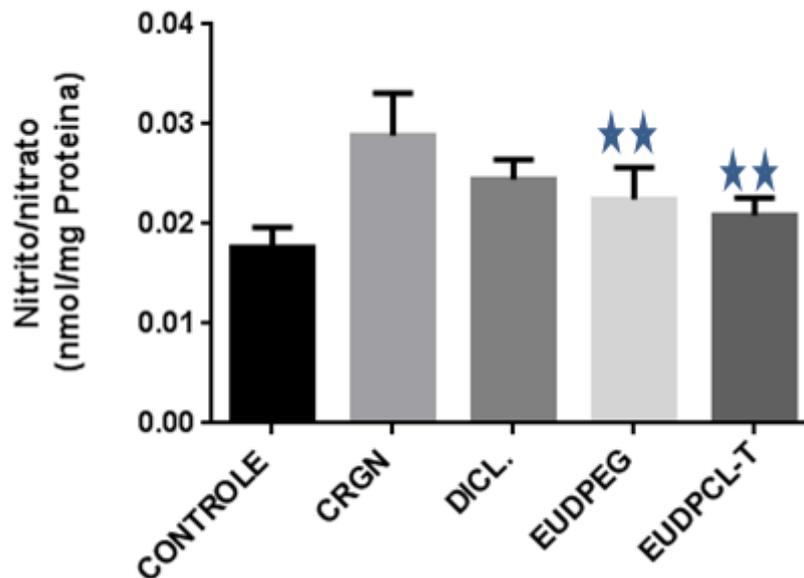
Fonte: Elaboração do autor, 2013.

Sete dias após a indução da artrite os grupos DICL e EUDPCL-T mostraram diferença estatisticamente significativa com o grupo CRGN na diminuição da atividade de MPO. O grupo EUDPEG não apresentou diferença do grupo CRGN.

A resposta do grupo EUDPEG pode ter sido causada pelo menor coeficiente de liberação do fármaco pelo EUDPEG. Através da figura 12 no 11º dia do experimento a liberação era de $\pm 12\%$ enquanto o EUDPCL-T já havia liberado $\pm 17\%$ no mesmo período.

Na figura 18 esta apresentada a variação de concentração dos nitrato/nitrito observada nos animais tratados durante 4 dias com diclofenaco por via oral e pelos dispositivos implantados após 6 horas da indução da artrite.

Figura 16 – Avaliação da concentração de nitritos/nitratos em joelho de ratos Wistar do grupo DICL tratados por 4 dias com diclofenaco de sódio (30 mg/Kg/dia), grupo EUDPEG (implante contendo 3,6 mg), grupo EUDPCL-T (implante contendo 3,0 mg), e os grupos CRGN e CONTROLE, 6 horas após a indução da artrite. ($N \geq 6^{**} \neq$ significativa em relação ao grupo CRGN para um $p < 0,05$).



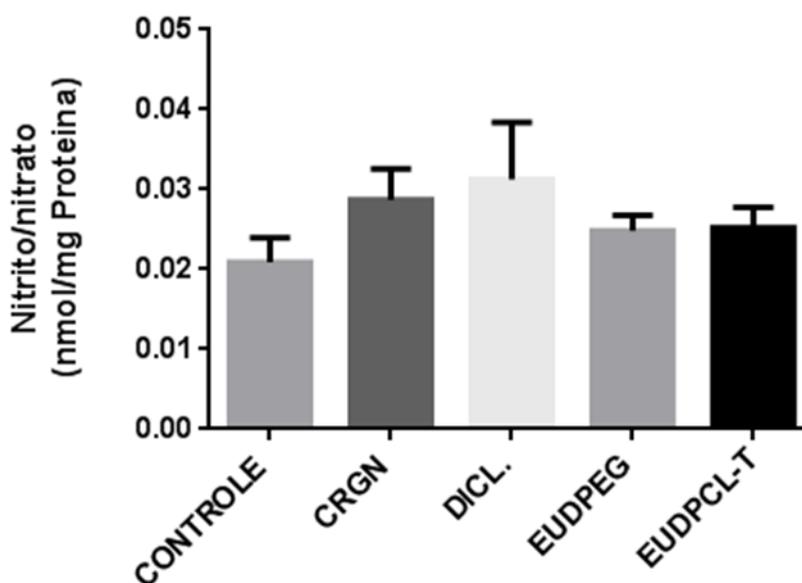
Fonte: Elaboração do autor, 2013.

A pesquisa de nitratos/nitritos no grupo que foi sacrificado seis horas após a indução da artrite mostrou no grupo DICL uma tendência de diminuição dos marcadores quando comparado com o grupo CRGN, porém sem diferença estatisticamente significativa. Os grupos EUDPEG e EUDPCL-T mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo CRGN ($p < 0,05$). Os dispositivos EUDPEG e EUDPCL-T não apresentam diferença estatística com o DICL.

Estes resultados corroboram com o que foi observado no edema dos joelhos e a atividade de MPO nos grupos sacrificado seis horas após a indução da artrite, a diferença ficou por conta do grupo EUDPEG que apresentou diferença estatisticamente significativa na dosagem de nitratos/nitritos enquanto que para as variáveis edema de joelho e MPO haviam mostrado somente tendência de diminuição.

Na figura 19 está apresentada a variação da concentração do Nitrato/nitrito observada nos animais tratados durante 11 dias com diclofenaco por via oral e pelo dispositivo implantado e após 7 dias da indução da artrite.

Figura 17 - Avaliação da concentração de nitratos/nitritos em joelho de ratos Wistar do grupo DICL tratados por 11 dias com diclofenaco de sódio (30 mg/Kg/dia), grupo EUDPEG (implante contendo 3,6 mg), grupo EUDPCL-T (implante contendo 3,0 mg), e os grupos CRGN e CONTROLE, 7 dias após a indução da artrite. ($N \geq 6^{**}$ ≠ significativa em relação ao grupo CRGN para um $p < 0,05$).



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

O óxido nítrico é reconhecido como um mediador e regulador de respostas inflamatórias, relacionado à vasodilatação, que ocorre nas fases iniciais do processo inflamatório. Seu papel nas respostas imunes começou a ser entendida na segunda metade da década de 1980 quando Stuehr e Marletta relataram que macrófagos produzem nitrito e nitrato em resposta a inflamação. (GOULART, 2006; KORHONEN et al., 2005, MONTANHER, 2006).

No sétimo dia após a indução da artrite, fase já tardia do processo inflamatório onde estes metabólitos já estão naturalmente em níveis baixos, não houve diferença na concentração de nitratos/nitritos entre os grupos estudados.

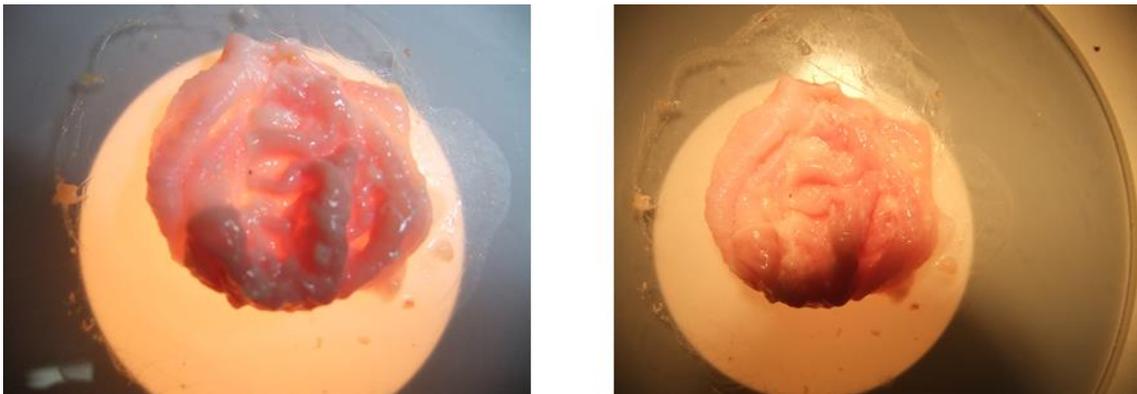
Nos Estados Unidos cerca de 107.000 pacientes são hospitalizados por ano devido a complicações gastro intestinais relacionadas ao uso de anti-inflamatórios. A capacidade ulcerogênica do diclofenaco de sódio e de outros anti-inflamatórios é bem conhecida na comunidade científica. Existem numerosos estudos de caso-controle e meta-análises mostrando incidência de complicações clinicamente significativas no trato gastrointestinal superior relacionadas com o uso de anti-inflamatórios. Estes estudos sugerem que o risco

aumenta na primeira semana de tratamento e que as complicações são dose dependente. (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008; LEE; CRYER, 2011; VANE; BOTTING, 1998, VANE; BOTTING, 1997).

Era esperado neste experimento que o efeito ulcerogênico do diclofenaco de sódio pudesse ser mensurado, e que os grupos tratados com dispositivos implantáveis por receberem doses muito menores do fármaco apresentasse diferença significativa quando comparado com o grupo tratado por via oral. Porém quando os estômagos foram dissecados não foram encontradas lesões gástricas mensuráveis pelo método proposto em nenhum dos 70 estômagos pesquisados.

Na figura 20 estão apresentadas fotografias dos estômagos dissecados após 11 dias de tratamento com diclofenaco de sódio via oral.

Figura 18 - Estômagos dos ratos aberto pela curvatura maior, visto em estereomicroscópio do grupo controle negativo no lado direito e do grupo DICL no lado esquerdo.



Fonte: Elaboração do autor, 2013.

Apesar de não serem observadas lesões gástricas neste modelo nas concentrações de diclofenaco administradas, não existe dúvida de que a concentração plasmática proporcionada pelos dispositivos são várias vezes inferior que as administradas via oral. Este fato poderá proporcionar um tratamento com menor risco sobre o sistema gástrico, renal e cardiovascular.

8 CONCLUSÃO

As matrizes EUDPEG apresentam transparência atribuída a miscibilidade do diclofenaco de sódio nos componentes poliméricos da matriz. Estas propriedades proporcionaram um comportamento mecânico plástico.

As matrizes de EUDPCL-T são opacas devido à cristalização do diclofenaco de sódio na matriz. Apresenta comportamento elastomérico associado a possíveis interações entre o EUDRAGIT RS e o PCL-T.

A liberação do diclofenaco de sódio dos dispositivos foi dependente da solubilidade do fármaco na matriz e também da presença dos plastificantes PEG 400 e PCL-T. O PEG 400 favoreceu uma liberação rápida na fase inicial e a PCL-T lenta, entretanto após 8 horas o processo se inverteu e o efeito da fusão da PCL-T da matriz favoreceu uma maior liberação do diclofenaco dos dispositivos EUDPCL-T.

A resposta ao tratamento com o sistema implantável EUDPCL-T foi capaz de diminuir o edema nos grupos tratados por 4 e 11 dias. Também foi significativa a diferença da atividade de MPO nestes grupos, e ainda foi eficaz para diminuir a concentração dos nitratos e nitritos no grupo com 4 dias de tratamento, ficando claro que no grupo EUDPCL-T a redução da inflamação foi estatisticamente significativa quando comparada com os outros grupos.

O tratamento por via oral foi eficaz na redução do edema e na redução da atividade da MPO quando comparados com os animais não tratados somente nos grupos com 11 dias de tratamento. Entretanto este não apresentou diferença estatística na diminuição da concentração de nitratos e nitritos.

O tratamento com o sistema implantável EUDUPEG foi eficaz na redução do edema no grupo com 11 dias de tratamento e na diminuição da concentração de nitratos e nitritos no grupo com 4 dias de tratamento. Porém este não apresentou diferença estatística na redução da atividade de MPO.

A dose diária de 7,5 mg de diclofenaco de sódio administrada por via oral em dose única por 11 dias assim como os dispositivos EUDPEG e EUDPCL-T implantados pelo mesmo período não causaram úlceras nos ratos Wistar neste modelo.

Os dispositivos implantáveis propostos foram capazes de promover o mesmo resultado anti-inflamatório em artrite induzida por carragenina quando comparado com o tratamento por via oral, porém com doses muito inferiores do mesmo fármaco. Estes resultados demonstram a potencialidade de dispositivos implantáveis para o futuro tratamento

da osteoartrite em busca da redução dos efeitos adversos e risco de toxicidade que o método convencional de tratamento apresenta.

Embora mais estudos sejam necessários, esta forma de administrar fármacos parece promissora e pode ser mais uma arma no arsenal terapêutico disponível ao médico.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Estudar o efeito de diferentes concentrações do fármaco nos dispositivos sobre a dor e a inflamação, com objetivo de definir menor dose efetiva.

Estudar o efeito do dispositivo sobre a manutenção da concentração do diclofenaco de sódio no líquido sinovial.

Estudar a possibilidade de uso de outros anti-inflamatórios nos dispositivos.

REFERÊNCIAS

- ASPDEN, R. M. Osteoarthritis: a problem of growth not decay? **Rheumatology**, [S.l.], v. 47, n. 10, p.1452–1460, may 2008.
- AYALA, A. H. P.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. C. Prevalencia y factores de riesgo de la osteoartritis. **Reumatología Clínica**, [S.l.], v. 3, suppl. 3, p. S6-S12, oct. 2007.
- BARSANTE, M. M. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 516, n. 3, p. 282-289, june 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299905005248>>. Acesso em: 17 jan. 2012.
- BENSON, M. D.; AIDA-BENSON, M.; BRANDT, K. D. Synovial Fluid Concentrations of Diclofenac in Patients With Rheumatoid Arthritis or Osteoarthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 15, n. 2. Suppl. 1, p. 65-67, nov. 1985.
- BERGSTRÖM, S. et al. The enzymatic conversion of essential fatty acids into prostaglandins: prostaglandins and related factors 34. *The Journal of Biological Chemistry*, [S.l.], v. 239, n. 11, p. PC4006-PC4008, nov. 1964. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/239/11/PC4006.full.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2012.
- BHARKATIYA, M.; NEMA, R. K.; BHATNAGAR, M. Development and characterization of transdermal patches of metoprolol tartrate. [S.l.], **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 3, n. 2, apr./june 2010.
- BOTTING, R. M. Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. **Pharmacological Reports**, [S.l.], v. 62, n. 3, p. 518-525, may/jun. 2010.
- BOLDRINI, C. **Avaliação do efeito do laser na formação óssea ao redor de Implantes dentários**: estudo biomecânico em ratos. 2010. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas)- Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, Barretos, 2010. Disponível em: <<http://www.feb.br/feb/cpg/BICcomlaserDissertacao20091122alteracoesaceitas.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2012.
- BRANDT, K.D.; DIEPPE, P.; RADIN, E. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. **Medical Clinics of North America**, [S.l.], v. 93, n. 1, jan. 2009.
- BUNIMOV, N.; LANEUVILLE, O. Cyclooxygenase inhibitors: instrumental drugs to understand cardiovascular homeostasis and arterial thrombosis. **Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets**, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 268-277, 2008. Disponível em: <<http://web.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=10&hid=105&sid=add4b6cb-6980-44af-b08e-80ff4d91eb81%40sessionmgr111>>. Acesso em: 1 fev. 2012.
- BUSIJA, L. et al. Osteoarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, [S.l.], v. 24, n. 6, p. 757-768, dec. 2010. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521694210000951>>. Acesso em: 28 fev. 2012.

CARMIGNAN, F.; BIDONE, J.; LEMOS-SENNA, E. Emprego dos polihidroxialcanoatos em sistemas de liberação controlada de fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 131-143, 2008. Disponível em: <http://www.latamjpharm.org/resumenes/27/1/LAJOP_27_1_8_1.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2012.

CARVALHO, C. A. et al. Aspectos macroscópicos e histológicos da mucosa gástrica de ratos wistar e sua utilização em modelo de úlceras gástricas. **Archives of Veterinary Science**, v. 16, n. 1, p. 44-53, 2011. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary/article/view/17926/14962>>. Acesso em: 17 jan. 2012.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, [S.l.], v. 48, n. 2, p. 137-158, mar./abr. 1998.

CHAHADE, W. H.; GIORGI, R. D. N.; SZAJUBOK, J. C. M. Antiinflamatórios não hormonais. **Einstein**, [S.l.], v. 6, supl. 1, p. 166-174, 2008. Disponível em: <<http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/918-Einstein%20Suplemento%20v6n1%20S166-174.pdf>>. Acesso em: 8 fev. 2012.

COIMBRA, I. B. et al. Consenso brasileiro para o tratamento da osteoartrite (artrose). **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, n. 6, p. 371-374, nov./dez. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0482-50042004000600009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 15 fev. 2012.

COLA-MIRANDA, M. et al. Antiulcerogenic activity of *Indigofera truxillensis* Kunth. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 6, n. 3, p. 1-9, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032006000300004>. Acesso em: 26 jan. 2012.

COSSON, M. Mechanical properties of synthetic implants used in the repair of prolapse and urinary incontinence in women: which is the ideal material? **International Urogynecology Journal**, v. 14, n. 3, p. 169-178, aug. 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00192-003-1066-z?LI=true>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

CREAMER, P.; HOCHBERG, M. C. Osteoarthritis. **The Lancet**, v. 350, n.16, p. 503-509, aug. 1997. Disponível em: <[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(97\)07226-7/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(97)07226-7/fulltext)>. Acesso em: 15 jan. 2012.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, [S.l.], v. 83, p. 824-832, apr. 2008. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/content/83/4/824.full.pdf+html>>. Acesso em: 17 fev. 2012.

CUNNINGHAM, L. S.; KELSEY, J. L. Epidemiology of Musculoskeletal Impairments and Associated Disability. **American Journal of Public Health**, v. 74, n. 6, p. 574-579, june 1984. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1651655/pdf/amjph00629-0046.pdf>>.

Acesso em: 2 fev. 2012.

DAS, S. K.; FAROOQI, A. Osteoarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, [S.l.], v. 22, n. 4, p. 657-675, aug. 2008. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521694208000739>>. Acesso em: 14 dez. 2011.

DASH, A. K.; CUDWORTH, G. C. Therapeutic Applications of Implantable Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 1–12, july 1998. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056871998000276>>. Acesso em: 26 jan. 2012.

DEVI, R. S. et al. Gastroprotective effect of Terminalia arjuna bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. **Chemico-Biological Interactions**, [S.l.], v. 167, n. 1, p. 71-83, apr. 2007. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279707000208>>. Acesso em: 17 fev. 2012.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmac.**, [S.l.], v. 24, n. 2, p. 89-102, fev. 1972. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-7158.1972.tb08940.x/pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

EDMONDS, S. Therapeutic targets for osteoarthritis. **Maturitas**, Ireland, v. 63, n. 3, p. 191-194, july 2009. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378512209001054>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

ELGINDY, N.; SAMY, W. Evaluation of the mechanical properties and drug release of cross-linked. Eudragit films containing metronidazole. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 376, p. 1-6, apr. 2009. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517309001707>>. Acesso em: 2 jan. 2013.

EVONIK INDUSTRIES. **Eudragit**. Disponível em:

<<http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/Pages/default.aspx>>. Acesso em: 11 mar. 2013.

FELSON, David T. et al. Osteoarthritis: new insights. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, n. 8, p. 637-639, oct. 2000. Disponível em:

<<http://www.annals.org/content/133/8/635.full.pdf+html?sid=86bf3c8d-29a3-46d5-9bd1-4e388f465512>>. Acesso em: 2 fev. 2012.

FEUCHT, C. L.; PATEL, D. R. Analgesics and anti-inflammatory medications in sports: use and abuse. **Pediatric Clinics of North America**, [S.l.], v. 57, n. 3, p. 751-774, june 2010.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003139551000026X>>. Acesso em: 8 fev. 2012.

FOWLER, R. D. et al. Plasma and Synovial Fluid Concentrations of Diclofenac Sodium and its Major Hydroxylated Metabolites During Long-Term Treatment of Rheumatoid Arthritis. **European Journal of Clinical Pharmacology**, [S.l.], v. 25, p. 389-394, 1983.

FREICHELS, H.; JÉRÔME, R.; JÉRÔME, C. Sugar-labeled and PEGylated (bio)degradable polymers intended for targeted drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1093-1106, aug. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711004504>>. Acesso em: 17 fev. 2012.

FRÍAS, G. et al. Assessing the efficacy of non-arthroscopic joint lavage in patients with osteoarthritis of the knee. **Reumatología Clínica**, Córdoba, v. 5, n. 5, p. 189-193, sep./oct. 2009. Disponível em: <<http://www.elsevier.es/sites/default/files/elsevier/pdf/373/373v05n05a13147219pdf001.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

GALVAN-VILLEGAS, F.; NAVARRETE, E. N. Efectos gastrointestinales graves por antiinflamatorios no esteroideos: un problema no resuelto. **Reumatología Clínica**, v. 2, n. 5, p. 261-71, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1699258X06730571>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

GENSKE, R. D. **Efeitos da terapia com laser de baixa potência (GaAs 830 e 904 nm) em osteoartrite induzida por adjuvantes de Freund em ratos Wistar**. 2005. 66 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)-Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, 2005. Disponível em: <<http://biblioteca.univap.br/dados/000001/0000014C.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

GOULART, S. **Estudo do mecanismo da ação antiinflamatória de extratos de *Solidago chilensis* Meyen no modelo da pleurisia induzida por diferentes agentes flogísticos, em camundongos**. 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/88743/236388.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 18 jan. 2012.

GUERINO, M. R. **Efeitos da fotoestimulação com laser no processo inflamatório crônico da cartilagem articular**. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica)-Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, 2001.

GUILLEMIN, F. et al. Prevalence of symptomatic hip and knee osteoarthritis: a two-phase population-based survey. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 19, p. 1314-1322, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21875676>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

HARRISON, M. H. M.; SCHAJOWICZ, F.; TRUETA, J. Osteoarthritis of the hip: a study of the nature and evolution of the disease. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 35b, n. 4, nov. 1953.

HELMICK, C. G. et al. Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States: part I. **Arthritis & Rheumatism**, [S.l.], v. 58, n. 1, p. 15–25, jan. 2008.

HUNTER, D. J. Lower extremity osteoarthritis management needs a paradigm shift. **British Journal of Sports Medicine**, [S.l.], v. 45, n. 4, p. 283–288, apr. 2011. Disponível em: <<http://bjsm.bmj.com/content/45/4/283.full>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

JUBELI, E. et al. E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 2, p. 194-206, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365911009369>>. Acesso em: 20 jan. 2012.

JUHAKOSKI, R. et al. Risk factors for the development of hip osteoarthritis: a population-based prospective study. **Rheumatology**, v. 48, p. 83-87, 2009.

KANIS, L. A.; GENEROSO, M.; SOLDI, V. Filmes de Poli(etileno-co-metil acrilato)/poli(caprolactona triol): Caracterização e Propriedades Mecânicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, [S.l.], v. 26, n. 5, 2007. Disponível em: <http://www.latamjpharm.org/trabajos/26/5/LAJOP_26_5_1_8_609A79M0T9.pdf>. Acesso em: 2 jan. 2013.

KANIS, L. A.; SOLDI, V. Poly(ethylene-co-methyl acrylate)/poly(caprolactone) triol blends for drug delivery systems: characterization and drug release. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 2, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000200012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 2 jan. 2013.

KASAMA, T. et al. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, [S.l.], v. 95, n.6, p. 2868–2876, june 1995. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/117993>>. Acesso em: 17 jan. 2012.

KEDAR, U. et al. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 714–729, dec. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963410001619>>. Acesso em: 25 jan. 2012.

KELGREEN, J. H.; LAWRENCE, J. S. Avaliação Radilógica da osteoartrite. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 16, n. 4, p. 494-502, 1957.

KOPEC, Jacek A. et al. Trends in physician-diagnosed osteoarthritis incidence in an administrative database in British Columbia, Canada, 1996-1997 through 2003-2004. **Arthritis & Rheumatism** (Arthritis Care & Research), v. 59, n. 7, p. 929-934, july 2008.

KORHONEN, R. et al. Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, [S.l.], v. 4, n. 4, p. 471-479, 2005.

KUSHIMA, H. Avaliação da atividade antiulcerogênica dos extratos e frações das folhas de *Davilla elliptica* St. Hil. E *Davilla nitida* (Vahl) Kubitzki (DILLENIACEAE). 2006.

107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2006. Disponível em: <http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bbo/33004064052P0/2006/kushima_h_me_botib.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2012.

LANGER, R. Drug delivery and targeting. **Nature**, [S.l.], v. 392, suppl. 6679, p. 5-10, apr. 1998.

LARANJEIRA, L. P. M.; SILVA, T. G. Avaliação da atividade do complexo de inclusão da β -lapachona em ciclodextrina em diferentes modelos de inflamação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UFPE, 19., 2011. Pernambuco. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://www.contabeis.ufpe.br/propesq/images/conic/2011/conic/pibic/20/11021175PP.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

LEE, I.; CRYER, B. Epidemiology and Role of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Causing Gastrointestinal Bleeding. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, [S.l.], v. 21, n. 4, p. 597-612, oct. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1052515711000699>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

LEE, J. S.; FEIJEN, J. Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], p. 1-11, oct. 2011.

LIN, S.Y.; LEE, C.J.; LIN, Y.Y. The Effect of Plasticizers on Compatibility, Mechanical Properties and Adhesion Strength of Drug Free Eudragit E Films. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 9, p. 1137-1143, sep. 1991. Disponível em: <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A%3A1015850301214>>. Acesso em: 15 jan. 2012.

LIU, J. et al. Biodegradation, biocompatibility, and drug delivery in poly(ω -pentadecalactone-co-p-dioxanone) copolyesters. **Biomaterials**, [S.l.], v. 32, n. 27, p. 6646-6654, sept. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211005783>>. Acesso em: 11 mar. 2012.

MA, C.; ZHANG, J. (Ed.). **Animal models of pain**. Saskatoon: Humana Press, 2011. (Neuromethods).

MACLAGAN, T. The treatment of rheumatism by salicin and salicylic acid. **The British Medical Journal**, [S.l.], v. 1, n. 803, p. 627, may 1876. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2296287/>>. Acesso em: 1 mar. 2012.

MARTINS SOUSA, E. et al. Resposta inflamatória e deposição de colágeno após implante intramuscular com polimetilmetacrilato em camundongos Balb/c. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, n 1, p. 13-19, 2008. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=289021804003>>. Acesso em: 16 fev. 2012.

McGONAGLE, D. Heberden's nodes and what Heberden could not see: the pivotal

role of ligaments in the pathogenesis of early nodal osteoarthritis and beyond. **Rheumatology**, v. 47, p. 1278–1285, apr. 2008.

MEANEY, D. F. Mechanical properties of implantable biomaterials. **Clinics In Podiatric Medicine And Surgery**, [S.l.], v. 12, n. 3, p. 363-84, jul. 1995.

MEIER, M. M. et al. Poly(caprolactone triol) as plasticizer agent for cellulose acetate films: influence of the preparation procedure and plasticizer content on the physico-chemical properties. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 15, n. 10, p. 593–600, Oct. 2004.

MENEGUZZO, D. T. **Fototerapia com laser em baixa intensidade em processo inflamatório agudo induzido por carragenina em pata de camundongos: estudos de dosimetria**. 2010. 120 f. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-20062011-155725/pt-br.php>>. Acesso em: 7 jan. 2012.

MIYATAKE, S. et al. Randomized clinical comparisons of diclofenac concentration in the soft tissues and blood plasma between topical and oral applications. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 125–129, 2008.

MIN, S. S. et al. A novel method for convenient assessment of arthritic pain in voluntarily walking rats. **Neuroscience Letters**, [S.l.], v. 308, p. 95-98, may 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394001019838>>. Acesso em: 18 fev. 2012.

MONTANHER, A. B. P. **Estudo do mecanismo de ação dos extratos de Passiflora edulis variação flavicapa Degener em modelos de inflamação aguda, em Camundongos**. 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. Disponível em: <[2012.http://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/89182/225204.pdf?sequence=1](http://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/89182/225204.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 18 mar. 2012.

MUKHERJEE, D.; NISSEN, S. E.; TOPOL, E. J. Risk of Cardiovascular Events Associated With Selective COX-2 Inhibitors. **The Journal of the American Medical Association**, [S.l.], v. 286, n. 8, p. 954-959, apr. 2010. Disponível em: <<http://jama.ama-assn.org/content/286/8/954.full>>. Acesso em: 11 mar. 2012.

MURAKI, S. et al. Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: the ROAD study. **Osteoarthritis and Cartilage**, [S.l.], v. 17, n. 9, p. 1137-1143, sep. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458409000946>>. Acesso em: 11 mar. 2012.

MURPHY, L. et al. Lifetime Risk of Symptomatic Knee Osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism** (Arthritis Care & Research), v. 59, n. 9, p. 1207-1213, sept. 2008.

NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CHRONIC CONDITIONS. **Osteoarthritis: National clinical guideline for care and management in adults**. London: Royal College of Physicians, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK48984/pdf/TOC.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2012.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE. **Osteoarthritis: the care and management of osteoarthritis in adults**. London: NICE, 2008. (Clinical guideline, 59). Disponível em: <www.nice.org.uk/Guidance/CG59>. Acesso em: 11 mar. 2012.

NEUGEBAUER, V. et al. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Molecular Pain**, v. 3, n. 8, p. 1-13, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.molecularpain.com/content/pdf/1744-8069-3-8.pdf>>. Acesso em: 21 fev. 2012.

OWEN, S. G.; FRANCIS, H. W.; ROBERTS, M. S. Disappearance kinetics of solutes from synovial fluid after intra-articular injection. **British Pharmacological Society**, [S.l.], v. 38, n. 4, p. 349-355, oct. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1364779/>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

PARK, J. H. et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 28-41, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X09003238>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: past, present and future. **Pharmacological Research**, [S.l.], v. 59, n. 5, p. 285-289, may 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661809000474>>. Acesso em: 18 fev. 2012.

PENNSYLVANIA STATE UNIVERSITY. **Biology 129**: review of rat muscles. Disponível em: <<http://www.personal.psu.edu/dys100/anatomy/rat/Show/lateralhindleg2.htm>>. Acesso em: 7 mar. 2012.

PIAO, H. et al. Oral delivery of diclofenac sodium using a novel solid-in-oil suspension. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 313, n. 1-2, p. 159-162, apr. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306001086>>. Acesso em: 17 jan. 2012.

POTTIE, P. et al. Obesity and osteoarthritis: more complex than predicted! **Annals of the rheumatic diseases**, [S.l.], v. 65, n. 11, p. 1403-1405, may 2010. Disponível em: <<http://ard.bmj.com/content/65/11/1403.full.html#related-urls>>. Acesso em: 18 fev. 2012.

RADERMACHER, J. Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. **Br. J. clin. Pharmac.**, [S.l.], v. 31, p. 537-541, 1991.

SCHNITZER, T. J. Update of ACR guidelines for osteoarthritis: role of the Coxibs. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 23 n. 4, p. 24-30, 2002.

SERSHEN, S.; WEST, J. Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 9, p. 1225-1235, nov. 2002.

SHAH, S. S.; RAHUL, J.; PRABHAKAR, P. Formulation and evaluation of transdermal patches of papaverine hydrochloride. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, n. 1, p. 79-86, 2010. Disponível em:

<<http://www.asiapharmaceutics.info/article.asp?issn=0973-8398;year=2010;volume=4;issue=1;spage=79;epage=86;aulast=Shah>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

SIGMA ALDRICH. **Polycaprolactone triol**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/200409?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 5 jan. 2013a.

SIGMA ALDRICH. **Poly(ethylene glycol)**. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/81170>>. Acesso em: 5 jan. 2013b.

SILVA, T. S. **Papel dos receptores histaminérgicos da medula espinhal na inflamação articular de ratos e sua possível contribuição como adjuvante para os efeitos da morfina**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

STRATE, L. L. et al. Use of Aspirin or Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Increases Risk for Diverticulitis and Diverticular Bleeding. **Gastroenterology**, [S.l.], v. 140, p. 1427-1433, 2011. Disponível em: <<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0016-5085/PIIS0016508511001405.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

STRUCTURE modification in osteoarthritis: time to update the guidelines. In: EUROPEAN CONGRESS OF RHEUMATOLOGY, 2009, Copenhagen. **Anais eletrônico...** Copenhagen: EULAR, 2009.

SWALES, C.; ATHANASOU, N. A. (i) The pathobiology of osteoarthritis. **Orthopaedics and Trauma**, [S.l.], v. 24, n. 6, p. 399-404, dec. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877132710001260>>. Acesso em: 11 mar. 2012.

SUN, H. et al. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, [S.l.], v. 27, n. 9, p. 1735-1740, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205008604>>. Acesso em: 6 fev. 2012.

SZELENYI, I.; THIEMER, K. Distention ulcer as a model for testing of drugs for ulcerogenic side effects. **Archives of Toxicology**, v. 41, p. 99-105, 1978.

TORRES-LÓPEZ, J. E. et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the Antinociceptive Effect of Diclofenac in the Rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S.l.], v. 282, n. 2, p. 685-690, abr. 1997. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/282/2/685.full.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2012.

TRANTAFYLLOU, K.; VLACHOGIANNAKOS, J.; LADAS, S. D. Gastrointestinal and liver side effects of drugs in elderly patients. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 2, p. 203-215, apr. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521691810000181>>. Acesso em: 5 jan. 2012.

UHRICH, K. E. et al. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. **Chemical Reviews**, Washington, D. C., v. 99, p. 3181-3198, 1999.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **The American Journal of Medicine**, [S.l.], v. 104, n. 3, supl. 1, p. 2-8, mar. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934397002039>>. Acesso em: 1 fev. 2012.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of Action of Aspirin-Like Drugs. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, [S.l.], v. 26, n. 6, supl. 1, p. 2-10, june 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049017297800467>>. Acesso em: 21 jan. 2012.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, [S.l.], v. 231, n. 25, p. 232-235, june 1971.

VANE, J. R. Introduction: mechanism of action of NSAIDs. **British Journal of Rheumatology**, [S.l.], v. 35, supl. 1, p. 1-3, apr. 1996. Disponível em: <http://rheumatology.oxfordjournals.org/content/35/suppl_1/1.full.pdf+html>. Acesso em: 1 mar. 2012.

VENKATARAMAN, S. et al. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 14-15, p. 1228-1246, nov. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X11001906>>. Acesso em: 1 fev. 2012.

WILLIAMS, F. M. K.; SPECTOR, T. D. Osteoarthritis. **Medicine**, [S.l.], v. 34, n. 9, p. 364-368, sep. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135730390600017X>>. Acesso em: 15 dez. 2011.

WILSON, B. et al. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 144-152, feb. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963409000859>>. Acesso em: 5 jan. 2012.

XIE, W. et al. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2692-2696, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51304/>>. Acesso em: 6 fev. 2012.

ZHANG, Y.; JORDAN, J. M. Epidemiology of Osteoarthritis. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 26, n. 3, p. 355-369, aug. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749069010000261>>. Acesso em: 15 fev. 2012.

ZHANG, W. et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part I: Critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. **OsteoArthritis and Cartilage**, v. 15, n. 9, p. 981-1000, 2007a.

Disponível em:

<http://www.oarsi.org/pdfs/oarsi_recommendations_for_management_of_hip_and_knee_oa.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2012.

ZHANG, W. et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. **OsteoArthritis and Cartilage**, v. 16, n. 2, p. 137-162, 2007b. Disponível em:

<<http://www.mendeley.com/research/oarsi-recommendations-for-the-management-of-hip-and-knee-osteoarthritis-part-ii-oarsi-evidencebased-expert-consensus-guidelines-1/>>. Acesso em: 2 fev. 2012.

ZHANG, W. et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. **OsteoArthritis and Cartilage**, v. 18, n. 2, p. 476-499, 2010.