

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR**

**Estudo da relação das espécies reativas de oxigênio, glutamato e medicação antioxidante  
com situações de dor crônica, dor aguda ou ausência de dor em seres humanos**

Túlio Vinícius de Oliveira Campos

Belo Horizonte

2015

TULIO VINÍCIUS DE OLIVEIRA CAMPOS

**Estudo da relação das espécies reativas de oxigênio, glutamato e medicação antioxidante com situações de dor crônica, dor aguda ou ausência de dor em seres humanos**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em medicina molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Gomez

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Percope de Andrade

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2015

## RESUMO

**Introdução:** Estudos recentes convergem para a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e do glutamato (GLU) na modulação da dor. O presente estudo tem como objetivo avaliar os níveis de EROs em células mononucleares do sangue e líquido nas situações de dor crônica, aguda ou ausência de dor. Desejou-se ainda estudar variações dos níveis líquidos de GLU nas três situações. Por fim, estudou-se a resposta clínica à medicação antioxidante na dor crônica e sua influência na produção de EROs por células mononucleares do sangue. As hipóteses a serem testadas são de que existe um aumento das espécies reativas de oxigênio em pacientes com dor crônica, aumento do glutamato líquido em pacientes com dor aguda e resposta analgésica em pacientes tratados com medicação antioxidante.

**Métodos:** Quarenta pacientes com doença articular e candidatos ao tratamento cirúrgico foram alocados em três grupos: dor crônica (n=15), dor aguda (n=12) e ausência de dor (n=13). A dor foi avaliada pela escala visual analógica (EVA) e índice WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Index of Osteoarthritis). Para determinação das EROs foi utilizado o indicador DCHF-DA. Os níveis de glutamato foram estimados pelo ensaio enzimático em que o glutamato presente no líquido sofre oxidação pela enzima glutamato desidrogenase (GDH). Para análise estatística foi utilizado o software *Prism 5 for Windows*. Em outro protocolo, a medicação antioxidante (ArtroTabs®) foi oferecida a 14 pacientes portadores de gonartrose por 3 meses. Foram avaliados: EVA, WOMAC e produção de EROs por células mononucleares do sangue antes e após o tratamento.

**Resultados:** Não houve diferença na fluorescência máxima e coeficiente de inclinação da curva obtida pelo DCHF-DA para as amostras de sangue e líquido nos grupos dor crônica, dor aguda e ausência de dor. A comparação da média dos níveis de glutamato líquido revelou diferença estatisticamente significativa entre o grupo de dor aguda e os demais. Os pacientes que receberam a medicação antioxidante por três meses apresentaram melhora da EVA e do índice WOMAC, todavia não houve alteração correspondente nos níveis de EROs.

**Conclusões:** Os níveis líquidos de GLU são mais elevados em pacientes com dor aguda. A medicação ArtroTabs® possivelmente reduz a dor em pacientes com dor crônica.

**Descritores:** Estresse oxidativo, ácido glutâmico, osteoartrite

## ABSTRACT

**Introduction:** Investigation of chronic pain mechanisms and analgesia constitute a promising research field. Recent studies attribute to reactive oxygen species (ROS) and glutamate (GLU) a central role in pain modulation. Our study aims to evaluate the relationship among serum and cerebrospinal fluid (CSF) ROS, CSF GLU, chronic/acute or no pain situations. In addition, we assessed the treatment of chronic pain by an antioxidant medication and influences on serum levels of ROS.

**Methods:** Forty patients were distributed according to pain symptoms: chronic (n = 15), acute (n = 12) and no pain (n = 13). Pain was assessed by visual analogue scale (VAS) and WOMAC index (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index). ROS was measured by DCHF-DA essay. Statistical analysis employed *Prism 5 software for Windows*. Fourteen patients with knee osteoarthritis and chronic pain have taken antioxidant medication for three months. VAS, WOMAC and ROS serum levels were registered before and after treatment.

**Results:** Analysis of maximum fluorescence and DCHF-DA curve inclination for peripheral blood and cerebrospinal fluid samples did not reveal difference among chronic, acute and no pain groups. Comparison of glutamate levels in CSF samples showed a statistically significant difference between acute pain and the other groups. Patients who took an antioxidant medication for three months showed improvement in VAS and WOMAC index, but there was no correspondence in ROS levels. Linear correlation analysis suggested a better response in VAS for patients with long lasting pain complains.

**Conclusions:** Higher cerebrospinal fluid GLU levels were identified in acute pain group. The antioxidant medication reduced pain in chronic group.

## Folha de aprovação

Nome: CAMPOS, Tulio Vinícius de Oliveira

Título: Estudo de aspectos da relação entre espécies reativas de oxigênio, glutamato, medicação antioxidante e situações clínicas de dor crônica, dor aguda ou ausência de dor em seres humanos

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em medicina molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de mestre

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora

Prof. Dr Célio José de Castro Júnior

Instituição: Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Misericórdia de BH

Parecer: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Dr Guilherme Moreira Abreu e Silva

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Parecer: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr Marco Antônio Percoppe de Andrade (Co-orientador)

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Parecer: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr Marcus Vinícius Gomez (Orientador)

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Parecer: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

A minha esposa, Ana Paula, com amor e gratidão por sua compreensão e carinho  
perenes

Aos meus pais, Emerson e Jane por terem construído o alicerce de toda minha  
educação sem medir esforços

Aos professores Marco Antônio Percope de Andrade e Marcus Vinícius Gomez  
por serem incansáveis pesquisadores e apaixonados pela ciência

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ser o guia de todos os meus atos e ter permitido a conclusão de mais essa etapa

A minha família, em especial meu irmão Bruno pelo companheirismo.

Aos meus avós pelo carinho e por me mostrar que o conhecimento pode ser obtido na observação das coisas mais simples

Aos amigos que foram importantes cada um ao seu modo durante vários momentos em minha vida: Daniel Antônio, Klaus Morales, Gustavo Toledo e Sérgio Jacobovitz

Aos professores que me introduziram na ciência básica e me mostraram sua importância na compreensão dos achados clínicos: Dr Márcio Flávio Dutra Moraes, Dr André Ricardo Massensini e Dra Maria Carolina Doretto. Obrigado por me fazer sentir em casa nos cinco anos que frequentei o Núcleo de Neurociências.

Ao mestre e amigo Cláudio que participou com entusiasmo e dedicação de todas as etapas do trabalho. Você é um exemplo de humildade, luta e honestidade. Levarei para sempre as lições mais importantes aprendidas nestes dois anos de convivência e que não estão escritas nos artigos

Aos colegas do laboratório do Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte/MG pelos momentos de convivência científica e social em especial a Dra Caroline Volpe que me ajudou nos primeiros experimentos com ROS em 2012 e a Dra Nancy Scardua Binda pelos experimentos com o Glutamato

Ao ex-aluno de iniciação científica e médico Rafael Medeiros pelo empenho na coleta das amostras e entrevista dos pacientes. Espero que essa experiência sirva para estimular o seu raciocínio científico e que em breve esteja construindo o seu próprio trabalho

Aos ex-residentes, agora ortopedistas Antônio Augusto e Frederico Pimenta pela ajuda na triagem, direcionamento dos pacientes e auxílio nos experimentos. Destaco ainda a participação dos demais residentes que estiveram no Hospital das Clínicas da UFMG no período de 2013 a 2014, que contribuíram para o sucesso do trabalho

Agradeço ao HC-UFMG, Hospital Risoleta Tolentino Neves e ao IEP da Santa Casa de Misericórdia de Minas Gerais pelo apoio institucional.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: ácido ascórbico

ANOVA: One-way analysis of variance

DCHF-DA: 2',7' - dichlorofluorescein diacetate

DCHF: 2',7' - dichlorofluorescein

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DM: diabetes mellitus

EROs: espécies reativas de oxigênio

EVA: escala visual analógica para dor

GPx: glutathione peroxidase

LCA: ligamento cruzado anterior

n = número de indivíduos/ amostra

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

rNMDA: receptor ionotrópico ativado pelo ácido glutâmico (glutamato)/aspartato

NO: óxido nítrico

ns: não significativo

OA: osteoartrite

PBMNC: células mononucleares

PBN: N-tert-butyl nitron

PBS: tampão fosfato salino

PKC: proteína quinase C

SO: superóxido

SOD: superóxido dismutase

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEMPOL: 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl

u.f.: unidade de fluorescência



## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1:** Modelo utilizado no trabalho para avaliação da escala visual analógica (EVA).....22

**Figura 2:** Representação gráfica da curva de fluorescência de um paciente do estudo.....24

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Caracterização dos pacientes envolvidos no primeiro estudo.....28

**Tabela 2:** Dados epidemiológicos dos pacientes incluídos no estudo sobre ação clínica do polivitamínico ArtroTabs.....31

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Valores máximos de fluorescência utilizando DCHF-DA.....	29
<b>Gráfico 2:</b> Valores máximos de fluorescência no liquor utilizando DCHF-DA.....	30
<b>Gráfico 3:</b> Valores de fluorescência no liquor utilizando GDH .....	31
<b>Gráfico 4:</b> Valores da escala visual analógica de dor (EVA) pré e pós tratamento com ArtroTabs®.....	32
<b>Gráfico 5:</b> Valores do questionário WOMAC pré e pós tratamento com ArtroTabs®.....	32
<b>Gráfico 6:</b> Correlação entre o tempo de sintomas pré-tratamento e o resultado da EVA pós-tratamento com ArtroTabs® .....	33

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e sistema antioxidante.....	2
1.2 Osteoartrite (OA), EROs, glutamato e dor .....	3
2. OBJETIVOS .....	6
3. MÉTODOS .....	8
3.1 Relação entre as espécies reativas de oxigênio no sangue periférico e no líquor em pacientes com dor aguda, crônica e sem dor .....	9
<b>3.1.1 Casuística</b> .....	9
<b>3.1.2 Avaliação da dor</b> .....	10
<b>3.1.3 Obtenção de células mononucleares e dosagem de ROS no sangue e líquor</b> .....	10
<b>3.1.4 Análise estatística</b> .....	12
3.2 Níveis de glutamato no líquor de pacientes sem dor, com dor aguda e crônica .....	13
<b>3.2.1 Casuística</b> .....	13
3.2.2 Determinação dos níveis de glutamato no líquor.....	13
3.3 Avaliação da resposta clínica ao tratamento com complexo polivitamínico antioxidante ArtroTabs ® e correlação com EROs.....	14
4 RESULTADOS.....	15
5 DISCUSSÃO.....	22
6 CONCLUSÕES.....	27
7 PERSPECTIVAS .....	29
8 REFERÊNCIAS .....	31
9 ANEXOS .....	34
Anexo 1: Aprovação pelo comitê de ética.....	35
Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) .....	36
Anexo 3: Índice de WOMAC adaptado e validado para a língua portuguesa por Fernandes, 2003..	39
Anexo 4: Termo de consentimento livre e esclarecido – ArtroTabs .....	41

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e sistema antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são substâncias produzidas de forma natural ou por alguma disfunção biológica e são fundamentais nas reações bioquímicas dos seres com metabolismo aeróbico. Caracterizam-se pela presença de um elétron desemparelhado no átomo de oxigênio. No organismo estão envolvidas no processo de produção de energia, fagocitose, crescimento celular, sinalização e síntese de algumas substâncias. Seu excesso pode levar à peroxidação de lipídios das membranas celulares, disfunção de enzimas, desregulação no metabolismo de carboidratos e do DNA.(Barreiros, David e David, 2006)

Os antioxidantes podem agir como enzimas, a exemplo da glutathione peroxidase (GPx), catalase e superóxido dismutase (SOD) ou não, a exemplo da glutathione, peptídeos de histidina e proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina).(Barreiros, David e David, 2006)

Além dos antioxidantes produzidos pelo organismo, existem aqueles provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (provitamina A), ácido ascórbico (AA - vitamina C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides. O interesse no estudo dos antioxidantes advém, principalmente, das recentes descobertas sobre a participação dos radicais livres em várias doenças.(Barreiros, David e David, 2006)

O ácido ascórbico é incorporado nas células por transportadores de sódio (sodium vitamin C transporters – SVCTs) e glicose (glucose transporters – GLUTs 1 e 3). No cérebro a interação entre neurônios e astrócitos regula os níveis de AA uma vez que essa molécula participa na proteção antioxidante, síntese de catecolaminas e peptídeos, formação da mielina, funcionamento das sinapses, proteção contra a neurotoxicidade pelo glutamato e diferenciação celular. Vale destacar que a molécula do AA é hidrofílica e sua passagem pela membrana hematoencefálica depende de transportadores. Esse fato foi comprovado por estudos com carbono 14 em ratos sem SVCTs. A ação do AA no cérebro ocorre predominantemente no hipocampo, participando da neurotransmissão com óxido nítrico. A incorporação do AA na forma oxidada ocorre pelos receptores GLUT, como a forma oxidada tem livre passagem a célula reduz o AA com objetivo de manter a substância no meio intracelular. (Nualart *et al.*, 2014)

## 1.2 Osteoartrite (OA), EROs, glutamato e dor

A osteoartrite (OA) é um grupo de doenças que acomete as estruturas da articulação incluindo cartilagem, osso subcondral, ligamentos e músculos periarticulares. A causa da OA é controversa, entretanto pode-se afirmar que uma miríade de fatores converge para um denominador comum que é a degeneração da cartilagem articular e exposição do osso subcondral. (Cole e Harner, 1999)

O tratamento conservador da OA tem caráter paliativo, não consegue impedir a progressão da doença e está relacionado a elevada taxa de maus resultados a longo prazo. A dor crônica é o sintoma mais proeminente da OA e sua regulação é complexa, ocorrendo por meio de nociceptores no osso subcondral, cápsula articular, membrana sinovial, ligamentos e periosteio. A lesão articular tem como consequência a produção de mediadores inflamatórios (ex: TNF, interleucinas, substância P), sinalizadores (ex:  $\beta$ -catenina) e proteases que podem modular a dor na periferia (neurônios do corno dorsal da medula e nociceptores) ou centralmente (estímulos que atingem o tálamo pelo trato espinotalâmico e são interpretados no córtex). (Lee *et al.*, 2013)

A inibição farmacológica do ânion superóxido (SO) e peroxinitrito (PN) pode prevenir e reverter as características patológicas associadas à dor neuropática e inflamatória. As substâncias N-tert-butyl nitron (PBN) e 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPOL) são consideradas antioxidantes inespecíficos e estudos já comprovaram sua eficácia na dor neuropática, visceral e inflamatória. O ânion superóxido ( $O_2^-$ ), produzido pela enzima NADPH oxidase da membrana celular e pelas mitocôndrias, combina-se com o óxido nítrico (NO) e dá origem ao ânion peroxinitrito. A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável por remover o  $O_2^-$  produzido pelas vias citadas anteriormente. (Salvemini *et al.*, 2011)

A proteína quinase C (PKC) é ativada na dor crônica e aguda, regulada pelas espécies nitrooxidativas (peroxinitrito e superóxido), podendo essa ativação ser periférica ou central. Periféricamente ela está relacionada a vias de sinalização dependentes de proteína G, centralmente ela ocorre em células da glia e neurônios a partir da estimulação glutamatérgica. A PKC estimula a migração de NADPH para a membrana celular e aumenta a produção de  $O_2^-$  (Salvemini *et al.*, 2011)

O  $O_2^-$  e o NO participam da modulação central da dor crônica. Sabe-se que o  $O_2^-$  ativa proteínas, incluindo a PKC que está envolvida no processo de sensibilização dos neurônios espinhais. Trabalho com animais submetidos a ligadura cirúrgica da raiz de L5

induzindo uma situação de dor neuropática mostrou que o  $O_2^-$  e o NO atuam por vias bioquímicas independentes nesta situação. Os autores utilizaram TEMPOL (conhecido “scavenger” de  $O_2^-$ ) e uma substância conhecida como L-NAME (inibidor não seletivo da NO sintetase) e verificaram que ambos são capazes de reduzir a hiperalgesia avaliada pelo teste de dor com monofilamentos de Von Frey. A utilização de um catalisador para a decomposição do peroxinitrito (5,10,15,20-tetrakis (N-methyl-4-pyridyl) porphyrinato iron III (FeTMPyP) não foi capaz de reverter a hiperalgesia induzida pelo NO ou  $O_2^-$ , comprovando que o peroxinitrito não é o produto comum que justifica a hiperalgesia nestes casos. Neste trabalho foi demonstrado ainda que a hiperalgesia relacionada ao  $O_2^-$  depende da ativação da PKC. O NO é conhecido como um mensageiro retrógrado, pois é produzido no neurônio pós-sináptico e estimula a liberação do glutamato pelo neurônio pré-sináptico via GMPC. O  $O_2^-$  atua principalmente nos neurônios pós-sinápticos do corno posterior da medula. Neste trabalho os autores concluíram que apesar de contribuírem para a ocorrência da dor neuropática, o  $O_2^-$  e o NO atuam no nível pós e pré-sináptico respectivamente. (Kim *et al.*, 2009)

Wang et al. reportaram que o SO participa da mediação da dor na inflamação. Os autores mostraram que um análogo da enzima superóxido desmutase (SOD) foi capaz de reduzir a dor relacionada à inflamação em um modelo animal. (Wang *et al.*, 2004)

Inibidores da oxido nítrico sintase foram relacionados como alternativas para tratamento da dor neuropática e inflamatória. Tal et al. injetaram um antioxidante sistêmico (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl -TEMPOL) em ratos e observaram redução na hiperalgesia induzida pelo calor em um modelo animal de dor neuropática. (Tal, 1996)

Wylde et al. avaliaram a incidência de dor pós-artroplastia do quadril e joelho e sugeriram a existência de um processo de sensibilização que predisporia, em determinados pacientes, o desenvolvimento de dor crônica, mesmo após o tratamento cirúrgico. (Wylde *et al.*, 2011)

Sabe-se que a dor aguda ocorre a partir do estímulo de nociceptores periféricos que transmitem a mensagem ao cérebro. A dor crônica por sua vez está relacionada à sensibilização periférica ou central dos nociceptores. O termo sensibilização refere-se à redução do limiar para dor ou aumento da resposta ao estímulo doloroso. A sensibilização periférica refere-se a alteração das características dos receptores periféricos, por fenômenos como a inflamação. A sensibilização central envolve mudança nas características das células responsáveis pela transdução de sinal da dor, em especial os neurônios do corno posterior da medula espinhal. (Wylde *et al.*, 2011)



A sensibilização periférica está ligada ao desenvolvimento de sensibilização central. Todavia, após o estímulo inicial a sensibilização central pode ser mantida sem o componente periférico, envolvendo os receptores de *N-methyl-D-aspartate* (NMDAR) e vários mediadores locais, tais como as EROs como  $O_2^-$ , NO e peroxinitrito. (Wylde *et al.*, 2011)

Alterações na transmissão glutamatérgica e modulação de canais iônicos como o TRPV1 (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1) estão relacionados à sensibilização central e à dor neuropática. Algumas proteínas, tais como a PKC e NMDAR, que são proteínas envolvidas no desempenho da transmissão glutamatérgica têm sua função alterada pelo peroxinitrito após a tradução em neurônios. (Salvemini *et al.*, 2011)

## **2. OBJETIVOS**

Este estudo tem como objetivo principal avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por células mononucleares do sangue periférico e líquido em um grupo de pacientes com dor crônica; um grupo com dor aguda; e um grupo sem dor.

Acrescenta-se no escopo do estudo a inferência dos níveis de glutamato nas três categorias de pacientes e sua correlação com os níveis plasmáticos e líquóricos de EROs.

São objetivos secundários: estabelecer valores de referência para a produção de EROs no líquido de seres humanos por células mononucleares utilizando o indicador fluorescente 2',7' - diclorofluoresceína diacetato (DCHF-DA).

No segundo estudo avaliou-se a sintomatologia algica, índice funcional WOMAC e níveis de EROs no sangue periférico de pacientes submetidos a tratamento medicamentoso com complexo vitamínico antioxidante (ArthroTabs) por 3 meses.

### **3. MÉTODOS**

O estudo é composto de três etapas. Na primeira, compararam-se os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio por células mononucleares isoladas no sangue periférico e no líquido de pacientes sem dor, com dor aguda e dor crônica. Na segunda, foram comparados os níveis de glutamato no líquido de pacientes sem dor, com dor aguda e dor crônica. Na terceira, foi estudada a resposta clínica da dor crônica à medicação antioxidante e sua correlação com as espécies reativas de oxigênio no sangue periférico. Para fins didáticos, a metodologia será dividida em três blocos que se referem a cada etapa separadamente.

O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte em 30 de março de 2012, protocolo 003/2012 (anexo 1).

### **3.1 Relação entre as espécies reativas de oxigênio no sangue periférico e no líquido em pacientes com dor aguda, crônica e sem dor**

#### **3.1.1 Pacientes**

Quarenta pacientes do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais foram alocados em um dos três grupos: dor crônica (n=15), dor aguda (n=12) e ausência de dor (n=13).

Os pacientes foram orientados sobre o objetivo do trabalho e as implicações de sua participação. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram incluídos no estudo (anexo 2 - TCLE).

O grupo de pacientes com dor crônica foi constituído por indivíduos com dor por período superior a dois anos, idade maior que 50 anos e quadro de gonartrose refratária ao tratamento conservador com indicação de artroplastia total do joelho. O grupo de dor aguda era composto por portadores de fratura do tornozelo com indicação de tratamento cirúrgico, sem história progressiva de dor crônica ou artrose. O grupo sem dor foi formado por candidatos a reconstrução cirúrgica do ligamento cruzado anterior (LCA) todos eles, apesar da lesão ligamentar, sem queixa álgica no momento da coleta.

Foram excluídos pacientes com diagnóstico de doença reumatológica, diabetes mellitus, tabagistas, aqueles com dor crônica que não era provocada pelo quadro de gonartrose ou pacientes com lesão do LCA com qualquer queixa álgica.

Os critérios de inclusão no trabalho foram definidos a partir da necessidade de se obter amostras de sangue periférico e líquido do mesmo paciente, ter três grupos definidos

quanto às características da dor, além de se afastarem fatores que poderiam interferir nos valores das EROs.

### 3.1.2 Avaliação da dor

A dor foi avaliada pela escala visual analógica (EVA) e o índice WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Index of Osteoarthritis).

A EVA mensura a dor referida pelo paciente identificando-se sua intensidade em uma régua ilustrada em que 0 corresponde a ausência de dor e 10 à pior dor possível. Trata-se de estratégia sensível e reprodutível para avaliação da dor. O modelo utilizado neste trabalho está reproduzido abaixo.



**Figura 1:** Modelo utilizado no trabalho para avaliação da escala visual analógica (EVA). Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfghUAA/dor-quinto-sinal-vital>

O questionário de WOMAC foi aplicado no período pré-operatório de acordo com modelo validado para a língua portuguesa (anexo 3).(Fernandes, 2003)

### 3.1.3 Obtenção de células mononucleares e dosagem de EROs no sangue e liquor

Foram obtidas amostras de 4mL de sangue periférico de todos os pacientes incluídos no estudo. A punção foi feita na veia mediana do antebraço escolhido pelo paciente. As amostras foram armazenadas em frasco heparinizado para transporte até o laboratório do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

O líquor era obtido no momento da punção lombar para raquianestesia. O volume colhido foi de 1 mL obtido por gotejamento gravitacional em frasco estéril. Após coleta, o líquor foi armazenado em caixa de isopor com gelo para transporte imediato até o laboratório.

As células mononucleares foram isoladas a partir do sangue periférico de acordo com a técnica de Ficoll Hipaque adaptada de Bicalho (1981). Em um tubo de ensaio siliconizado eram adicionados 4.0 mL de sangue periférico heparinizado sobre 6.0 mL de

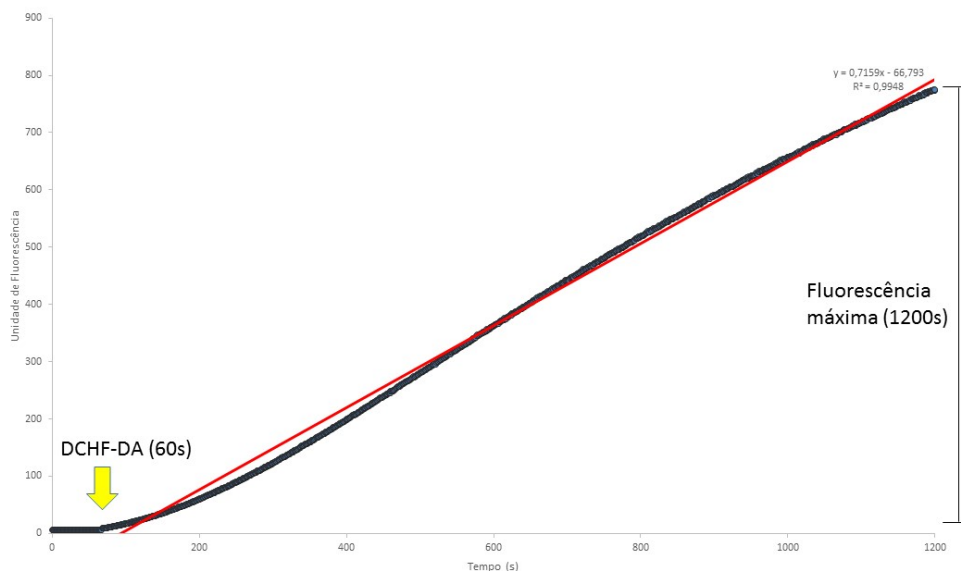
gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden), com densidade 1.007 g/mL. Essa transferência era feita lentamente, com auxílio de pipeta de Pasteur, fazendo-se escoar um filete de sangue na parede do tubo de modo a evitar que o sangue se misturasse com a solução gradiente para que ao final formasse um sistema de duas fases distintas. Em seguida, o tubo foi, centrifugado à temperatura ambiente, a 370 rcf (relative centrifugal force) por 20 minutos, originando um "anel", no centro do tubo constituído por células mononucleares. Este anel foi coletado com auxílio da pipeta de Pasteur, sendo transferido para um segundo tubo e lavado por duas vezes em PBS (tampão fosfato) por 10 minutos a 160 rcf. Logo após, as células mononucleares foram adicionadas em 1mL de HEPES glicosado (composição: 140mM NaCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 4,17mM NaHCO<sub>3</sub>, 5mM Glicose, 5,37mM KCl, 0,44mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,26mM CaCl<sub>2</sub>, 0,34mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,41mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM - HEPES). A contagem das células mononucleares foi feita no microscópio com objetiva de 40x, com auxílio de uma câmara de Neubauer. O número de células/ml expresso foi ajustado ao cálculo pela fórmula: células/ml= número de células x diluição (1:100) x 10<sup>4</sup> /4. A viabilidade celular foi determinada pelo teste de exclusão por incorporação de Azul de Trypan à 1%. As células contadas em câmara de Neubauer que incorporaram o Azul de Trypan foram consideradas mortas sendo apenas consideradas viáveis para o estudo as amostras com viabilidade superior a 90%. (Bicalho, Gontijo e Nogueira-Machado, 1981)

Após isolamento as células mononucleares foram transferidas para cubeta de espectrofluorímetro para início das leituras de fluorescência. A concentração de células era fixada em 1 x 10<sup>6</sup> células/mL, para um volume final de 2 mL por cubeta. As leituras de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301-PC. O comprimento de onda de excitação foi configurado em 503 nm, e o de emissão em 523 nm. Na análise do sangue periférico, os dados de fluorescência foram coletados por um período de 1200 segundos, com taxa de aquisição de uma leitura por segundo. A temperatura era controlada em 37°C durante todo o tempo de registro com auxílio de sistema de aquecimento e circulação de água pela cubeta do fluorímetro. A leitura foi feita sob agitação constante com auxílio de barra e agitador magnético. A adição de 5µL de DCHF-DA ao sistema ocorria após 60 segundos de registro de autofluorescência.

O método para dosagem de ROS no líquido foi padronizado no IEP da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em trabalho prévio. Consiste na adição de 5µL da amostra de líquido a 2 mL de solução PBS e leitura em espectrofluorímetro utilizado no experimento

anterior. Após estabelecer a linha de base por 30 segundos era adicionado DCHF-DA. A fluorescência foi registrada continuamente por 8 minutos. (Diniz *et al.*, 2014)

A análise das curvas de fluorescência foi feita a partir de dois parâmetros: variação máxima de fluorescência obtida e coeficiente de inclinação da curva de ascensão da fluorescência. O primeiro parâmetro fornece uma estimativa dos níveis de EROs no interior das células mononucleares. Nas condições de pH e temperatura utilizadas, a intensidade máxima da fluorescência relaciona-se diretamente com os valores de EROs após 20 minutos de centrifugação. O segundo parâmetro teria como objetivo estudar a cinética da curva de fluorescência de acordo com o padrão de dor. Dessa forma, poderiam ser identificadas eventuais diferenças na cinética das reações bioquímicas que resultam na fluorescência do DCF. (Chatchanok *et al.*, 2005) (Figura 3)



**Figura 2:** Representação gráfica da curva de fluorescência de um paciente do estudo (ATJ 1). Linha vermelha representa a reta de tendência da curva com coeficiente de inclinação de 0,71 e concordância  $R^2$  0,99. A seta amarela indica o momento da adição do DCHF-DA que ocorria após 60 segundos de leitura da autofluorescência. A fluorescência máxima foi determinada pela subtração da média dos valores da da fluorescência nos últimos 10 segundos de leitura da fluorescência de base (1190 a 1200 s).

### 3.1.4 Análise estatística

Os dados foram coletados e armazenados em arquivos do Microsoft Excel (.xlsx) ou bloco de notas (.txt). Foram avaliadas variáveis clínicas categóricas e numéricas com o software *Prism 5 for Windows*. A normalidade de distribuição das variáveis numéricas foi



avaliada da pelo teste Shapiro-Wilk. As variáveis com distribuição normal foram comparadas utilizando o teste ANOVA e o post hoc de Bonferroni e as variáveis com distribuição não-normal foram comparadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o post hoc de Dunn.

As variáveis categóricas foram comparadas utilizando o teste Qui Quadrado.

### **3.2 Níveis de glutamato no líquido de pacientes sem dor, com dor aguda e com dor crônica**

#### **3.2.1 Pacientes**

Realizou-se a dosagem dos níveis de glutamato no líquido coletado dos pacientes na primeira etapa. Por isso, o número de pacientes em cada grupo foi mantido: dor crônica (n=15), dor aguda (n=12) e ausência de dor (n=13).

#### **3.2.2 Determinação dos níveis de glutamato no líquido**

Para dosar o neurotransmissor, foi realizado o ensaio enzimático em que o glutamato presente no líquido sofre oxidação pela enzima glutamato desidrogenase (GDH). O NADP<sup>+</sup> é o aceptor do elétron desprendido que ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 360nm, emite luz no comprimento de onda de 450nm, que é detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro. Dessa maneira pode-se quantificar o neurotransmissor excitatório liberado. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína. (Nicholls, Sihra e Sanchez-Prieto, 1987; Romano-Silva *et al.*, 1993)

A adição dos reagentes para o registro de dados no espectrofluorímetro ocorreu na seguinte ordem:

Início	0 s
NADP 1 mM	90 s
GDH 5µL (1 U/µL)	150 s
Amostra de líquido 50 µL	300 s
Padrão de Glutamato 1 mM	800 s
Término do registro	900 s

A análise estatística seguiu os princípios básicos descritos no item 3.1.4, o valor considerado para comparação foi a fluorescência obtida após adição da amostra de líquido.

### **3.3 Avaliação da resposta clínica ao tratamento com complexo polivitamínico antioxidante ArtroTabs® e correlação com EROs**

Quatorze pacientes portadores de gonartrose foram submetidos a tratamento clínico com a medicação ArtroTabs® (composição: magnésio, ácido ascórbico, niacina, vitamina E, zinco, ácido pantotênico, manganês, riboflavina, piridoxina, tiamina, cobre, selênio, cianocobalamina). Na teoria a medicação é um suplemento alimentar que fornece vitaminas antioxidantes - principalmente o cobre que é componente central na enzima superóxido dismutase (SOD). Os pacientes foram informados sobre os objetivos do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE ArtroTabs – Anexo 4).

Os pacientes tiveram a dor avaliada pela EVA e índice WOMAC (ver item 2.1.2) antes do início do tratamento e após 3 meses de ingestão diária da medicação (1 comprimido ao dia). Foi obtida amostra de 4mL de sangue periférico na data da primeira avaliação, antes do tratamento medicamentoso e no final do terceiro mês de tratamento. Não foi obtida amostra de líquido já que os pacientes não foram submetidos a tratamento cirúrgico e dessa forma haveria uma invasão desnecessária e potencialmente nociva ao sistema nervoso central do paciente.

A análise estatística seguiu os mesmos princípios descritos no item 2.1.4.

## **4 RESULTADOS**

### 3.3 Comparação dos níveis de EROs em células mononucleares do sangue periférico e liquor em pacientes com dor crônica, dor aguda e sem dor

Nesta etapa foram avaliados 50 pacientes distribuídos de acordo com a duração e a presença ou não da dor. Foram excluídos 10 pacientes submetidos à primeira avaliação no ambulatório que concordaram com a inclusão no estudo, mas que não puderam ser submetidos a raquianestesia por questões técnicas (ex: cirurgia prévia na coluna lombar (n=2), punção liquórica traumática (n=3) ou pacientes que no momento da anestesia admitiram tabagismo esporádico (n=2) ou história pregressa de diabetes mellitus controlado com mudança nos hábitos de vida (n=3).

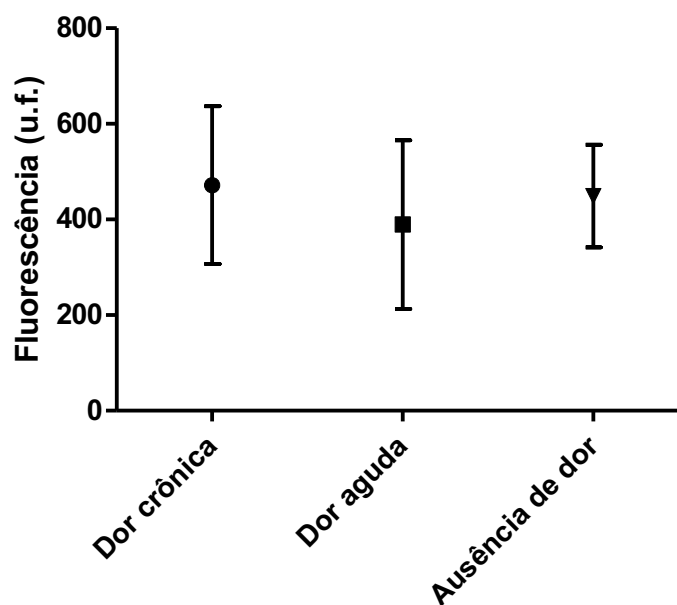
A tabela 1 mostra os dados clínicos dos 40 pacientes incluídos no estudo.

**Tabela 1:** Caracterização dos pacientes envolvidos no primeiro estudo

	Dor crônica	Dor aguda	Sem dor	p
N	15	12	13	-
Idade <sup>a</sup>	66 (7)	33 (12)	27(10)	P<0,0001
EVA <sup>b</sup>	9	5	2	P=0,0002
WOMAC <sup>c</sup>	57	0	5	P<0,0001
Sexo (M:F)	2:13	7:5	12:1	
Tempo de sintomas(dias) <sup>d</sup>	3970	5	598 <sup>e</sup>	P<0,0001

<sup>a</sup> média (desvio padrão), Bonferroni mostrou diferença significativa de idade entre o grupo dor crônica e os demais; <sup>b</sup> mediana; <sup>c</sup> Bonferroni mostrou diferença significativa entre o grupo dor crônica e os demais; <sup>d</sup> Bonferroni mostrou diferença significativa entre o grupo dor crônica e os demais; <sup>e</sup> tempo decorrido entre a lesão e o tratamento cirúrgico

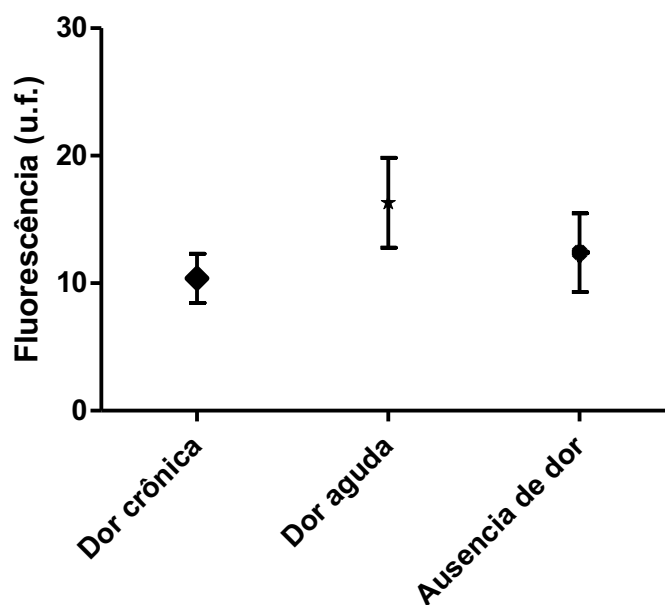
A comparação da fluorescência máxima obtida pelo DCHF-DA para as amostras de sangue periférico não revelou diferença significativa entre os grupos. As médias dos valores e desvio padrão foram: grupo com dor crônica: 471±171; grupo com dor aguda: 389±176; grupo sem dor: 448±107 (valores expressos em unidades de fluorescência). Comparação feita pelo teste ANOVA com p=0,24. (Gráfico 1)



**Gráfico 1:** Valores máximos de fluorescência utilizando DCHF-DA. Grupos com distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Comparação feita utilizando ANOVA,  $p=0,24$ . ( $n=40$ )

A comparação do coeficiente de inclinação da curva obtida pelo DCHF-DA para as amostras de sangue não revelou diferença significativa entre os grupos. As médias dos valores e desvio padrão foram: grupo com dor crônica:  $0,44 \pm 0,16$ ; grupo com dor aguda:  $0,41 \pm 0,11$ ; grupo sem dor:  $0,35 \pm 0,17$ . Comparação feita pelo teste ANOVA com  $p=0,34$ .

A comparação da fluorescência máxima obtida pelo DCHF-DA para as amostras de líquido não revelou diferença significativa entre os grupos. As médias dos valores e desvio padrão por grupo foram para dor crônica:  $10,3 \pm 6,9$ ; dor aguda:  $16,3 \pm 11,7$ ; sem dor:  $12,4 \pm 10,6$  (valores expressos em unidades de fluorescência). Comparação feita pelo teste ANOVA com  $p=0,20$ . (Gráfico 2)

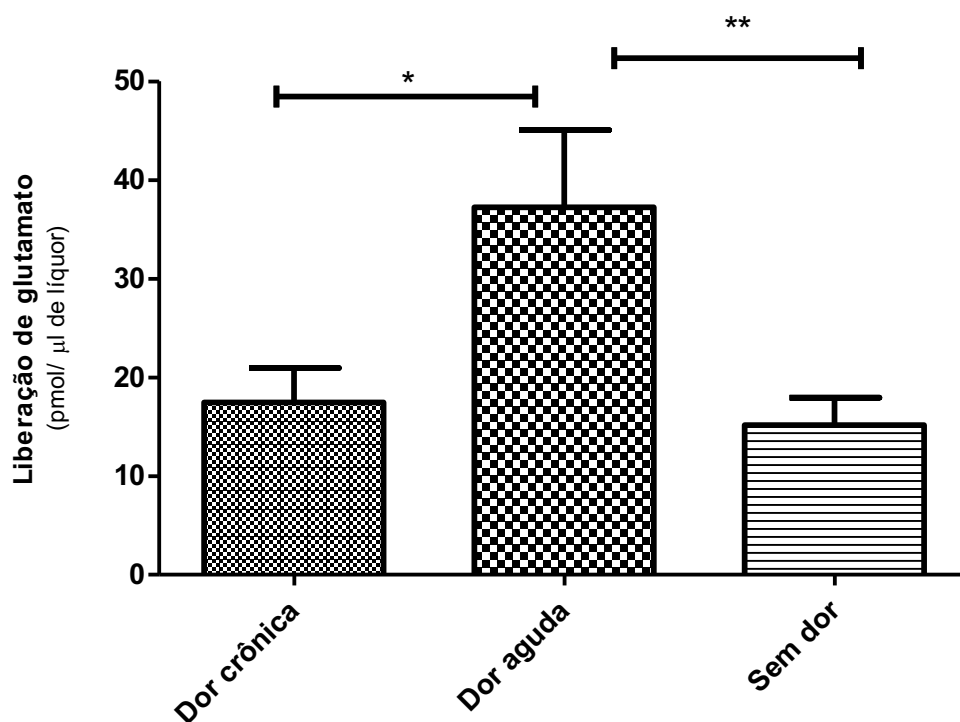


**Gráfico 2:** Valores máximos de fluorescência no líquido utilizando DCHF-DA. Grupos com distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Comparação feita utilizando ANOVA,  $p=0,20$ . ( $n=40$ )

A comparação do coeficiente de inclinação da curva obtida pelo DCHF-DA para as amostras de líquido não revelou diferença significativa entre os grupos. As médias dos valores e desvio padrão foram: grupo com dor crônica:  $0,02 \pm 0,01$ ; grupo com dor aguda:  $0,03 \pm 0,02$ ; grupo sem dor:  $0,03 \pm 0,02$ . Comparação feita pelo teste Kruskal-Wallis com  $p=0,51$ .

### **3.4 Comparação dos níveis de glutamato no líquido de pacientes com dor crônica, dor aguda e sem dor**

A comparação da média dos níveis de glutamato nas amostras de líquido dos três grupos estudados revelou diferença estatisticamente significativa entre o grupo de dor aguda (fratura do tornozelo) e os outros dois grupos estudados. A média e o desvio padrão foram respectivamente de  $37,2 \pm 15,6$  para o grupo de dor aguda; de  $17,4 \pm 11,5$  para o grupo de dor crônica; e de  $15,1 \pm 6,8$  para o grupo sem dor. A comparação entre os grupos foi feita pelo teste ANOVA,  $p=0,01$ . O teste de Bonferroni foi utilizado para comparação entre os grupos. (Gráfico 3)



**Gráfico 3:** Valores de fluorescência no líquido utilizando GDH. Comparação feita utilizando ANOVA, e teste *post hoc* Bonferroni,  $p=0,01$  ( $n=40$ )

### 3.5 Avaliação da resposta clínica ao tratamento com complexo polivitamínico antioxidante ArtroTabs® e correlação com as EROs no sangue periférico

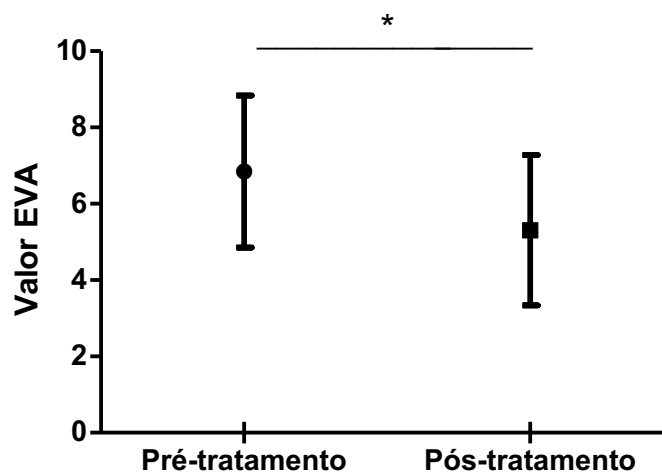
A caracterização dos 14 pacientes que constituíram a população desta etapa do estudo está resumida na tabela 2.

**Tabela 2:** Dados epidemiológicos dos pacientes incluídos no estudo sobre ação clínica do polivitamínico ArtroTabs

	ARTROTABS
n	13
Idade <sup>a</sup>	61 (8)
Sexo (M:F)	2:11
Tempo de sintomas(dias)	2639

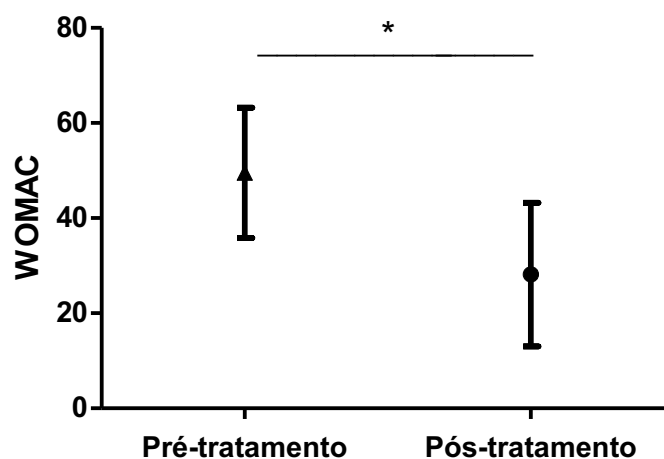
Na avaliação da dor pela EVA antes do tratamento com o ArtroTabs®, o valor da mediana foi de 7. Após três meses de tratamento, o valor da mediana era 5. A opção por

expressar esses dados em mediana deve-se à característica da régua utilizada para determinação da EVA que apresentava apenas números inteiros. A comparação dos grupos pelo teste T resultou em  $p=0,035$ . (Gráfico 4)



**Gráfico 4:** Valores da escala visual analógica de dor (EVA) pré e pós tratamento com ArtroTabs®. Comparação feita utilizando teste T,  $p=0,03$  ( $n=14$ ). Valores de EVA expressos em mediana $\pm$ 1/3º quartil.

O valor da média para o índice WOMAC de avaliação funcional antes do tratamento com o ArtroTabs® foi de  $49,5\pm 13,7$ . Após três meses de tratamento, o valor da média foi reduzido para  $28,1\pm 15,0$ . A comparação dos grupos pelo teste T resultou em  $p=0,002$ . (Gráfico 5)

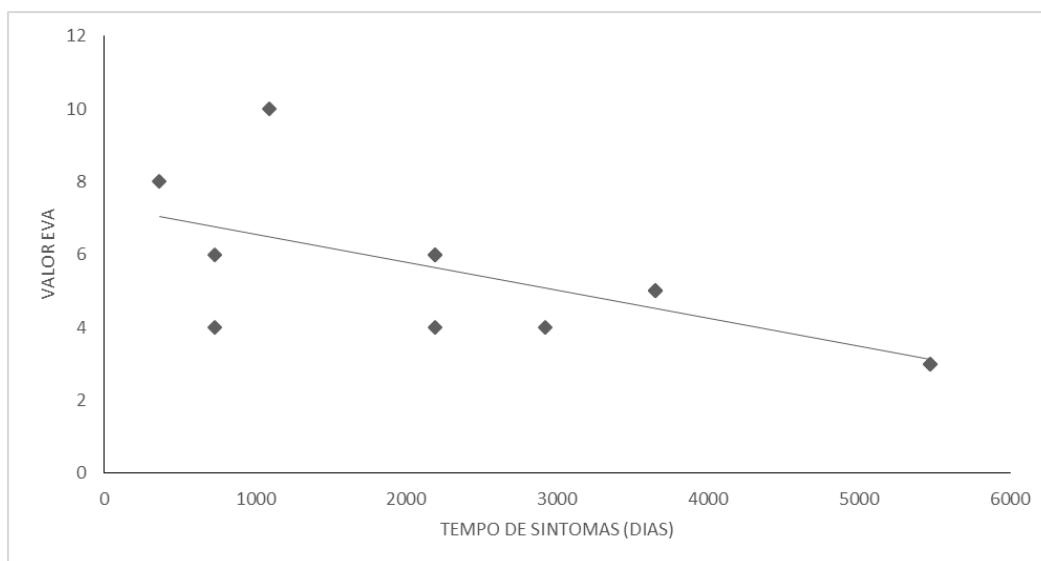


**Gráfico 5:** Valores do questionário WOMAC pré e pós tratamento com ArtroTabs®. Comparação feita utilizando teste T,  $p=0,02$  ( $n=14$ ). Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão



O valor médio da fluorescência máxima utilizando a sonda DCHF-DA antes do tratamento com ArtroTabs® foi de  $390,8 \pm 187,4$ . Após três meses de tratamento, o valor da média foi de  $469,3 \pm 206,8$ . A comparação dos grupos pelo teste T resultou em  $p=0,32$ .

A análise de correlação linear entre os valores da EVA após três meses de tratamento com o ArtroTabs® e o tempo de sintomas foi estatisticamente significativa pelo teste de Pearson ( $p=0,014$ ), coeficiente de correlação  $-0,26$ . (Gráfico 6) Houve correlação também entre os valores para a EVA e o escore WOMAC ( $p=0,002$ ).



**Gráfico 6:** Correlação entre o tempo de sintomas pré-tratamento e o resultado da EVA pós-tratamento com ArtroTabs®. Correlação de Pearson,  $p=0,014$  ( $n=14$ ). Valores absolutos.

## **5 DISCUSSÃO**

O presente estudo teve como objetivos: avaliar a relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) no sangue periférico e no líquido de indivíduos sem dor e com dor aguda e crônica; estudar a relação entre os níveis de glutamato no líquido e a presença de dor em seres humanos; relacionar a resposta clínica em pacientes tratados com medicações antioxidantes e os níveis de EROs no sangue periférico e, por fim, estudar a relação entre a persistência da dor em pacientes submetidos a artroplastia total do joelho e os níveis de EROs.

Após avaliação de 65 pacientes, conseguiu-se cumprir três dos quatro objetivos estabelecidos. Apenas o último, que buscava estabelecer correlação entre a persistência da dor no pós-operatório tardio e a elevação das EROs, não foi cumprido. Os excelentes resultados da artroplastia total de joelho e o pequeno número de pacientes avaliados (n=15) poderiam justificar esse insucesso na avaliação da persistência da dor após artroplastia.

A definição das afecções que seriam consideradas modelo para dor crônica, aguda ou ausência de dor foi feita a partir da casuística habitual do Hospital das Clínicas e do Hospital Risoleta Tolentino Neves, ambos vinculados a Universidade Federal de Minas Gerais. A escolha da gonartrose como modelo de dor crônica foi baseada na alta prevalência da doença na população geral, necessidade de tratamento cirúrgico nos casos avançados e grande demanda espontânea no Hospital das Clínicas. As fraturas do tornozelo foram eleitas como modelo de dor aguda devido a sua prevalência e ocorrência em pacientes que geralmente são mais jovens e que raramente são diabéticos ou apresentam múltiplas comorbidades. No início do trabalho foi tentado selecionar pacientes vítimas de trauma com idade mais avançada (ex: portadores de fraturas do fêmur proximal), todavia a logística para tratar esses pacientes com múltiplas comorbidades no Hospital das Clínicas não é favorável, há escassez de leitos de centro de terapia intensiva para o pós-operatório e a associação de doenças que podem interferir nos resultados das análises fluorimétricas é frequente. O grupo sem dor foi composto por portadores de lesão do LCA que é prevalente no Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG e que geralmente acomete indivíduos jovens do sexo masculino. A avaliação da média de idade reflete a epidemiologia esperada para as afecções eleitas para o estudo, ou seja, a idade dos pacientes com dor crônica e gonartrose é superior à dos pacientes com diagnóstico de dor aguda ou sem dor. Em relação à distribuição por gênero, a gonartrose é mais comum no feminino, enquanto as afecções traumáticas como ruptura do LCA e fratura do tornozelo são mais comuns no masculino.

O grupo com dor crônica apresentou maiores valores para o teste de WOMAC e EVA em comparação aos grupos sem dor (LCA) e com dor aguda (fratura). A dor no grupo com fratura do tornozelo foi intermediária entre os grupos, porém não foi considerada

diferente em relação ao grupo sem dor. A justificativa para esse dado pode ser encontrada no momento que foi realizada a entrevista, ou seja, no pré-operatório imediato. Nesta ocasião os pacientes já estavam com o membro imobilizado com uma tala gessada, por isso, a dor reportada tende a ser menor que a sentida no momento do trauma. A entrevista no momento do trauma não foi factível uma vez que os pacientes foram transferidos de outras instituições via central de leitos de urgência da secretaria municipal de saúde de Belo Horizonte. A diferença no tempo de sintomatologia algica reforça que o objetivo de obter grupos com dor aguda e crônica foi atingido. Em relação ao grupo sem dor, o tempo de sintomas considerado foi a média de tempo entre a lesão do LCA e o tratamento cirúrgico. Com relação à diferença na epidemiologia de gênero entre os grupos deste estudo, tal fato não foi considerado relevante uma vez que estudos em animais não identificaram variação nos níveis de EROs em diferentes gêneros.(Olsson *et al.*, 2009)

Não se conseguiu identificar diferença na produção de EROs por células mononucleares do soro e líquido utilizando a sonda DCHF-DA nas subpopulações estudadas (dor crônica, dor aguda e ausência de dor. O indicador fluorescente 2' 7' - diclorofluoresceína diacetato (DCHF-DA, Sigma) é uma molécula que atravessa membranas celulares por difusão passiva. Uma vez no interior da célula, a DCHF-DA sofre desacetilação por enzimas esterases não específicas gerando o composto DCHF. A DCHF desacetilada perde então a propriedade de se difundir para fora da célula e ficando assim confinada no espaço intracelular. Após a desacetilação, a DCHF sofre oxidação por espécies reativas de oxigênio (EROs) formando o composto DCF, cuja intensidade de fluorescência é maior que a do seu par (DCHF) não oxidado. A determinação dos níveis de EROs se dá em função do tempo. No caso do ensaio com DCHF-DA, as EROs mais envolvidas na oxidação do DCHF são H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e peroxidases intracelulares, porém o peroxinitrito e radicais hidroxila também foram apontados. (Chatchanok *et al.*, 2005)

As EROs envolvidas no processo de modulação da dor são múltiplas e o ensaio com DCHF-DA avalia principalmente a existência de peroxidases e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, existe um universo amplo de EROs que podem participar do processo de modulação da dor e que não são contempladas pelo método. Um estudo avaliou a resposta clínica à viscosuplementação e sua relação com a atividade da superóxido dismutase (SOD). Apesar da melhora nos índices WOMAC e EVA, não foi identificada alteração proporcional na atividade da SOD. Os autores mantêm a hipótese de regulação da dor e destruição articular pelo estresse oxidativo e estimam que houve incapacidade do método para avaliar essa

alteração. (*Ostalowska et al., 2013*) No presente estudo identificou-se que a modulação da dor não está relacionada às peroxidases e  $H_2O_2$ , por isso outros agentes devem ser investigados no futuro.

O presente estudo estabeleceu os valores de referência para a produção de EROs por células mononucleares no líquido de seres humanos a partir da sonda DCHF-DA. Esta técnica já havia sido empregada em animais e conseguiu-se boa reprodutibilidade dos resultados com o líquido humano. Por outro lado, não foi possível identificar diferenças significativas entre os grupos com dor crônica, dor aguda e sem dor por esse método. É provável que a monitorização de outras EROs no líquido ou sangue periférico de seres humanos seja a chave para corroborar a relação entre EROs e diferentes tipos de dor, já comprovada em estudos animais. Com relação à punção lombar, volume de 8 a 15mL pode ser obtido na punção lombar diagnóstica com segurança. Os valores médios obtidos pela técnica para o líquido foram menores que os do sangue periférico, pois acredita-se que neste caso a oxidação da sonda ocorra no ambiente extracelular. (*Ellenby et al., 2006*)

O protocolo que avaliou a variação do glutamato no líquido de pacientes com dor crônica, dor aguda e sem dor revelou um aumento dos níveis de glutamato nos indivíduos com dor aguda em relação aos demais grupos. Recente estudo em animais evidenciou que um agonista de receptor de glutamato pode atuar como modulador da dor nociceptiva em animais. Outros estudos têm destacado a participação do glutamato como neurotransmissor excitatório, na modulação da dor nas terminações periféricas. A opção por estudar o glutamato no líquido foi feita a partir dos resultados não significativos na comparação entre os níveis de EROs central e periférico na dor crônica, dor aguda e ausência de dor. A relação entre EROs, glutamato e dor já foi amplamente discutida e a identificação de diferença nos níveis centrais de glutamato no mesmo líquido submetido a análise com DCHF-DA sugere que o método utilizado para estudar estresse oxidativo nos pacientes não foi adequado. Possivelmente, outros pontos das vias metabólicas que não são contemplados pelo DCHF-DA estão alterados. (*Miller et al., 2011; Bardoni, 2013; G et al., 2014*)

O estudo dos resultados clínicos com a medicação antioxidante ArtroTabs® e sua correlação com as EROs em nível periférico permitiu testar de forma independente e sem interferência da indústria farmacêutica a eficácia clínica desta classe de medicamentos. A impossibilidade ética de avaliar os níveis centrais de EROs nesta etapa é um ponto negativo do trabalho. Neste protocolo conseguiu-se reproduzir, com seres humanos, o resultado positivo do tratamento com antioxidantes sobre a dor crônica já encontrado em animais. A proximidade dos níveis de EROs no sangue periférico antes e após o tratamento pode ser

devida à ineficácia do DCHF-DA em avaliar a presença das EROs mais atuantes na modulação da dor ou ainda à ação predominantemente central dessas medicações. É importante destacar a correlação encontrada entre eficácia da medicação em reduzir a dor pela EVA e o tempo de sintomas: pacientes com sintomas dolorosos há mais tempo beneficiam-se mais da medicação. Esse achado contradiz a expectativa do fabricante que recomenda seu uso precocemente na doença articular degenerativa. Esse achado corrobora a participação das EROs na dor crônica, pois a maior cronicidade da dor favorece a resposta clínica a medicação.

## **6 CONCLUSÕES**

1. A comparação da fluorescência máxima e da inclinação da curva obtida pelo DCHF-DA para as amostras de sangue periférico não revelou diferença significativa entre pacientes com dor crônica, dor aguda e sem dor
2. A comparação da fluorescência máxima e inclinação da curva obtida pelo DCHF-DA para as amostras de liquor não revelou diferença significativa entre os grupos com dor crônica, com dor aguda e com ausência de dor
3. Existe aumento dos níveis de glutamato nas amostras dos pacientes com dor aguda quando comparados aos pacientes com dor crônica e àqueles sem dor
4. A medicação antioxidante ArtroTabs® foi capaz de melhorar o índice WOMAC e a resposta na EVA de dor, todavia esses achados não foram acompanhados por modificação nos níveis periféricos de EROs segundo metodologia que emprega o DCHF-DA
5. Houve correlação positiva entre a melhora da dor avaliada pela EVA e o tempo de sintomas em pacientes submetidos a três meses de tratamento com o ArtroTabs®





No seguimento deste estudo pretende-se comparar a produção de EROs nos pacientes com melhora da dor com aqueles que permaneceram com sintomas após o tratamento clínico e cirúrgico da artrose. A utilização de outros marcadores para a flutuação das EROs seria também um desdobramento, pois dessa forma outros pontos da cadeia regulatória da produção de EROs poderiam ser avaliados. A padronização e treinamento em técnicas para avaliar as EROs em tecidos (ex: membrana sinovial) ou fluidos (ex: líquido sinovial) e sua correlação com os níveis sistêmicos e centrais de EROs constituem projetos futuros. Finalmente, existe a intenção de testar a ação de outros fármacos que atuam no estresse oxidativo e suas implicações para o metabolismo de EROs em seres humanos. Como possíveis alvos pode-se citar a Curcumina (fitoterápico antioxidante) e medicações que atuam no receptor TRPV1.

## **8 REFERÊNCIAS**

BARDONI, R. Role of presynaptic glutamate receptors in pain transmission at the spinal cord level. **Curr Neuropharmacol**, v. 11, n. 5, p. 477-83, Sep 2013. ISSN 1570-159X (Print) 1570-159x.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006. ISSN 0100-4042. Disponível em: <  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422006000100021&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100021&nrm=iso) >.

CHATCHANOK, L. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiat Phys Chem Oxf Engl** 1993, v. 72, n. 2, p. 323-331, 01/01 2005. ISSN 0969-806X. Disponível em: <  
[http://pubget.com/paper/pgtmp\\_8f32246ec17ce24aeb8cca0ba3b1fd6f/spectrofluorometric-determination-of-intracellular-levels-of-reactive-oxygen-species-in-drug-sensitive-and-drug-resistant-cancer-cells-using-the-2-7-dichlorofluorescein-diacetate-assay](http://pubget.com/paper/pgtmp_8f32246ec17ce24aeb8cca0ba3b1fd6f/spectrofluorometric-determination-of-intracellular-levels-of-reactive-oxygen-species-in-drug-sensitive-and-drug-resistant-cancer-cells-using-the-2-7-dichlorofluorescein-diacetate-assay) >. Disponível em: <  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.06.011> >.

COLE, B. J.; HARNER, C. D. Degenerative arthritis of the knee in active patients: evaluation and management. **J Am Acad Orthop Surg**, v. 7, n. 6, p. 389-402, Nov-Dec 1999. ISSN 1067-151X (Print) 1067-151x.

DINIZ, D. M. et al. Effects of the calcium channel blockers Phalpalbeta and omega-conotoxin MVIIA on capsaicin and acetic acid-induced visceral nociception in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 126, p. 97-102, Nov 2014. ISSN 0091-3057.

ELLENBY, M. S. et al. Videos in clinical medicine. Lumbar puncture. **N Engl J Med**, v. 355, n. 13, p. e12, Sep 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005943> >.

FERNANDES, M. Tradução e validação do questionário de qualidade de vida específico para osteoartrose WOMAC (Western Ontario McMaster Universities) para a língua portuguesa. **São Paulo: Universidade Federal de São Paulo**, 2003.

G, S. et al. Can Metabotropic Glutamate Receptor 7 (mGluR 7) be a Novel Target for Analgesia? **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 9, p. Hc16-8, Sep 2014. ISSN 2249-782X (Print) 0973-709x.

KIM, H. Y. et al. Superoxide signaling in pain is independent of nitric oxide signaling. **Neuroreport**, v. 20, n. 16, p. 1424-8, Oct 2009. ISSN 1473-558X. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794317> >.

LEE, A. S. et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. **Gene**, v. 527, n. 2, p. 440-7, Sep 25 2013. ISSN 0378-1119.

MILLER, K. E. et al. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacol Ther**, v. 130, n. 3, p. 283-309, Jun 2011. ISSN 0163-7258.

NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. **J Neurochem**, v. 49, n. 1, p. 50-7, Jul 1987. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2884279> >.

NUALART, F. et al. Vitamin C Transporters, Recycling and the Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts. **J Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 5, p. 209, May 2014. ISSN 2157-7633. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25110615> >.

OLSSON, M. et al. Variation in levels of reactive oxygen species is explained by maternal identity, sex and body-size-corrected clutch size in a lizard. **Naturwissenschaften**, v. 96, n. 1, p. 25-9, Jan 2009. ISSN 0028-1042 (Print) 0028-1042.

OSTALOWSKA, A. et al. Assessment of knee function and biochemical parameters of articular fluid and peripheral blood in gonarthrosis patients following intra-articular administration of hyaluronic acid. **Pol Orthop Traumatol**, v. 78, p. 173-81, 2013. ISSN 0009-479x.

ROMANO-SILVA, M. A. et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca<sup>2+</sup> entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. **Biochem J**, v. 296 ( Pt 2), p. 313-9, Dec 1993. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504921> >.

SALVEMINI, D. et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 951-66, Sep 2011. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277369> >.

TAL, M. A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful peripheral neuropathy. **Neuroreport**, v. 7, n. 8, p. 1382-4, May 31 1996. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965.

WANG, Z. Q. et al. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 309, n. 3, p. 869-78, Jun 2004. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565.

WYLDE, V. et al. Persistent pain after joint replacement: prevalence, sensory qualities, and postoperative determinants. **Pain**, v. 152, n. 3, p. 566-72, Mar 2011. ISSN 0304-3959.

## **9 ANEXOS**

## Anexo 1: Aprovação pelo comitê de ética



**Registro CEP: 003/2012** (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

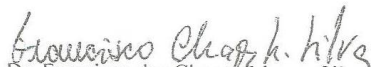
Belo Horizonte, 03 de abril de 2012.

Ilmo. Sr.  
Dr. Marcus Vinícius Gomez  
Pesquisador Responsável

### Parecer:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em reunião do dia 30 de março de 2012 analisou e **APROVOU** o protocolo de pesquisa “**Investigação do papel das espécies reativas de oxigênio em pacientes portadores de dor crônica e dor aguda.**” registrado, neste CEP sob número 003/2012, no qual V. Sa. figura como pesquisador responsável.

Atenciosamente,

  
Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva  
Coordenador do CEP

### OBS.:

Após o início da pesquisa, o pesquisador responsável deverá enviar ao CEP relatórios semestrais e final, nos seguintes prazos: para o primeiro semestre, até 31 de julho; para o segundo semestre, até 31 de dezembro.

## **Anexo 2: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)**

Título da Pesquisa: Investigação do papel das espécies reativas de oxigênio e do glutamato em pacientes portadores de dor crônica, dor aguda e sem dor

Nome do (a) Pesquisador (a): Túlio Vinícius de Oliveira Campos

Nome do (a) Pesquisador (a) Responsável: Túlio Vinícius de Oliveira Campos

Nome do (a) Orientador (a): Marcus Vinicius Gomez

**Natureza da pesquisa:** o Sr (Sra.) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade estudar a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e do glutamato no processo de geração e perpetuação da dor.

**Participantes da pesquisa:** Pacientes portadores de dor crônica, dor aguda ou sem dor e candidatos a tratamento cirúrgico no HC-UFGM

**1. Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo a sr (sra) permitirá que o (a) pesquisador realize uma análise bioquímica do líquido (líquido da medula) obtido no momento da raquianestesia que precede o seu procedimento cirúrgico. Além disso, permite a dosagem das EROs no sangue periférico (amostra de 4mL obtida no momento do procedimento cirúrgico). A sra (sr.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa pelo telefone do pesquisador do projeto ou pessoalmente no ambulatório de Cirurgia do Joelho do Hospital das Clínicas da UFGM.

**2. Sobre as entrevistas:** Serão realizadas consultas médicas no pré-operatório, 7º, 15º, 30º, 90º dia de pós-operatório no Hospital das Clínicas da UFGM para avaliar a sua evolução clínica.

**3. Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os riscos envolvidos nessa pesquisa são aqueles relacionados ao procedimento cirúrgico: infecção pós-operatória, fraturas periprotéticas, trombose venosa profunda, sangramento e riscos relacionados à anestesia. De acordo com a complicação, serão tomadas as medidas específicas de tratamento sem que o paciente tenha que arcar com despesas médico-hospitalares. Neste estudo, não haverá acréscimo de morbidade aos seus participantes, ou seja você cumprirá todas as etapas a que são submetidos os pacientes candidatos a artroplastia de joelho, reconstrução ligamentar ou osteossíntese de fratura. Existe a possibilidade de infecção pós-operatória que pode variar de desde uma infecção superficial até uma osteomielite. Visando diminuir as chances de sua ocorrência, prescreveremos antibiótico durante a cirurgia



e nos primeiros dias que sucedem o procedimento. Caso ocorra uma infecção mais grave, o paciente deverá ser tratado na própria instituição de acordo com o protocolo específico. Casos com infecção refratária ao tratamento com antibióticos sistêmicos serão tratados com retirada do implante e posterior antibioticoterapia orientada por cultura; Em caso de complicações anestésicas será feita abordagem de acordo com a rotina do serviço. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

O tratamento de complicações relacionadas a participação na presente pesquisa será integralmente financiado pelos investigadores responsáveis.

**4. Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o pesquisador e o orientador terão conhecimento dos dados.

**5. Benefícios:** Com a cirurgia proposta esperamos que possa haver uma diminuição do quadro de dor pré-operatória seja ela aguda ou crônica. Esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a o papel das espécies reativas de oxigênio e do glutamato na gênese e perpetuação da dor crônica, de forma que o conhecimento que será construído possa ser aplicado com o intuito de beneficiar os pacientes com quadro clínico semelhante. Os pesquisadores envolvidos se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

**6. Pagamento:** a sra (sr.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Não forneceremos vale-transporte, vale-refeição ou pagamento em dinheiro para os pacientes participantes.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

#### **Consentimento Livre e Esclarecido**

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa

---

Nome do Participante da Pesquisa

---

Assinatura do Participante da Pesquisa

---

Assinatura do Pesquisador

---

Assinatura do Orientador

TELEFONES

Pesquisador Responsável: Túlio Vinícius de Oliveira Campos – (31) 91390320

Rua Satélite, 15, Apto 402 – Caiçara, Belo Horizonte/ MG – CEP: 30.770-380

Orientador: Marcus Vinícius Gomez

Av. Alfredo Balena, 110 – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais;

CEP: 30.130-100 - Belo Horizonte - MG

**Anexo 3: Índice de WOMAC adaptado e validado para a língua portuguesa por Fernandes, 2003**

<b>Categoria 1- Severidade da dor (durante o último mês) para</b>					
	Nenhuma	Pouca	Moderada	Severa	Extrema
Andar					
Subir escadas					
Dor noturna					
Dor ao repouso					
Carregar peso					
Rigidez matinal					
Rigidez protocinética					
<b>Categoria 2- Nível de dificuldade para executar as seguintes funções</b>					
	Nenhuma	Pouca	Moderada	Severa	Extrema
Descer escadas					
Levantar da cadeira					
Ficar em pé					
Curvar-se na direção do chão					
Andar no plano					
Entrar/ sair do carro					
Fazer compras					
Colocar as meias					

Levantar-se da cama					
Tirar as meias					
Deitar-se na cama					
Entrar/ sair do banho					
Sentar					
Sentar/ levantar do vaso sanitário					
Tarefas domésticas leves					
Tarefas domésticas pesadas					
<p>Contagem dos pontos e cálculo do escore:</p> <p>Resposta: 0 - “nenhuma”, 1 - “pouca”, 2 - “moderada”, 3 - “severa”, 4 - “extrema”.</p> <p>Total de pontos:</p> <p>Escore (total de pontos multiplicado por 100/96 ou 1,041666):</p>					

#### **Anexo 4: Termo de consentimento livre e esclarecido – ArtroTabs**

Título da Pesquisa: Investigação do papel das espécies reativas de oxigênio em pacientes portadores de dor crônica, efeitos de suplemento alimentar antioxidante

Nome do (a) Pesquisador (a): Túlio Vinícius de Oliveira Campos

Nome do (a) Pesquisador (a) Responsável: Túlio Vinícius de Oliveira Campos

Nome do (a) Orientador (a): Marcus Vinicius Gomez

**Natureza da pesquisa:** o Sr (Sra.) está sendo convidada (o) a participar desta pesquisa que tem como finalidade estudar a participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no processo de geração e perpetuação da dor crônica e os efeitos clínicos e bioquímicos do tratamento com a medicação antioxidante ArtroTabs®

**Participantes da pesquisa:** Pacientes portadores de artrose dos joelhos, dor crônica e sem indicação de tratamento cirúrgico do ambulatório de cirurgia do joelho do HC-UFG

1. **Envolvimento na pesquisa:** ao participar deste estudo a sra (sr) permitirá que o (a) pesquisador realize uma análise bioquímica do seu sangue periférico (amostra de 4mL) antes e depois do tratamento clínico com a medicação ArtroTabs® (composição: magnésio, ácido ascórbico, niacina, vitamina E, zinco, ácido pantotênico, manganês, riboflavina, piridoxina, tiamina, cobre, selênio, cianocobalamina). A ação teórica da medicação seria como suplemento alimentar que fornece vitaminas antioxidantes e principalmente o cobre que é componente central na enzima superóxido dismutase (SOD) reduzindo a dor e inflamação característicos da artrose do joelho. A sra (sr.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa pelo telefone do pesquisador do projeto ou pessoalmente no ambulatório de Cirurgia do Joelho do Hospital das Clínicas da UFG.
2. **Sobre as entrevistas:** Serão realizadas consultas médicas antes do início e no final do terceiro mês de tratamento para avaliar a sua evolução clínica e os níveis das espécies reativas de oxigênio (EROs).
3. **Riscos e desconforto:** a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os riscos envolvidos nessa pesquisa são aqueles relacionados a ingestão da medicação que já é comercializada no Brasil para o tratamento da dor relacionada a artrose. Trata-se de medicação considerada segura e com baixa incidência de efeitos colaterais. Os

procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

O tratamento de complicações relacionadas a participação na presente pesquisa será integralmente financiado pelos investigadores responsáveis.

4. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o pesquisador e o orientador terão conhecimento dos dados.
5. **Benefícios:** Com o uso da medicação, esperamos que possa haver uma diminuição do quadro de dor articular. Esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a o papel das espécies reativas de oxigênio na gênese e perpetuação da dor crônica, de forma que o conhecimento que será construído possa ser aplicado com o intuito de beneficiar os pacientes com quadro clínico semelhante. Os pesquisadores envolvidos se comprometem a divulgar os resultados obtidos.
6. **Pagamento:** a sra (sr.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Não forneceremos vale-transporte, vale-refeição ou pagamento em dinheiro para os pacientes participantes.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

### **Consentimento Livre e Esclarecido**

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa

---

Nome do Participante da Pesquisa

---

Assinatura do Participante da Pesquisa

---

Assinatura do Pesquisador

---

Assinatura do Orientador

**TELEFONES**

**Pesquisador Responsável:** Túlio Vinícius de Oliveira Campos – (31) 91390320  
Rua Satélite, 15, Apto 402 – Caiçara, Belo Horizonte/ MG – CEP: 30.770-380

**Orientador:** Marcus Vinícius Gomez

Av. Alfredo Balena, 110 – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de  
Minas Gerais; CEP: 30.130-100 - Belo Horizonte - MG