

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE MEDICINA**

**TALVANE DA SILVA GOMES NETO**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA S+CETAMINA NO TRATAMENTO DA  
CISTITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

**SÃO LUÍS  
2018**

**TALVANE DA SILVA GOMES NETO**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA S+CETAMINA NO TRATAMENTO DA  
CISTITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina, da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de bacharel em Medicina.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes

Co-orientadora: Profa. Me. Tereza Cristina Monteiro de Melo Prazeres

**SÃO LUÍS  
2018**

da Silva Gomes Neto, Talvane.

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA S+CETAMINA NO TRATAMENTO DA CISTITE EXPERIMENTAL EM RATOS / Talvane da Silva Gomes Neto. – São Luís, 2018.

37 f.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Co-orientadora: Profa. Me. Tereza Cristina Monteiro de Melo Prazeres.

Monografia (Graduação) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Ciclofosfamina. 2. Cistite. 3. Inflamação. 4. S+Cetamina. I.

Título.

## **Ficha de Avaliação**

**Aluno:** TALVANE DA SILVA GOMES NETO

**Trabalho de Conclusão de Curso:** AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA  
S+CETAMINA NO TRATAMENTO DA CISTITE EXPERIMENTAL EM RATOS

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### **Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes (Orientadora)

---

Profa. Dra. Adriana Lima dos Reis Costa – Universidade Federal do Maranhão

---

Profa. Dra. Lilaleia Gonçalves França – Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Fernando César Vilhena Moreira Lima – Faculdade Santa Terezinha

**SÃO LUÍS**

**2018**

**Dedico este trabalho...**

*Ao meu saudoso avô Talvane, por ter vivido e sofrido junto comigo o sonho de conquistar esta graduação, pelo seu apoio e torcida incondicionais e por me inspirar valores como honestidade, caráter, amor à família e ao próximo.*

*À minha amada família, pelo amor e infinita compreensão com os quais sempre me afagaram nestes anos distante de casa.*

*À minha querida Elisa Saminez, minha companheira de todas as horas, por ser meu porto seguro nas maiores tormentas da minha vida.*

*“Homens que são ocupados na restauração da saúde de outros homens participam de uma certa divindade, desde que preservar e renovar é quase tão nobre quanto criar”.*

**Voltaire**

## AGRADECIMENTO

À Deus, primeiramente, pelo dom da vida, por seu infinito amor e misericórdia, por ter me proporcionado chegar até aqui;

À minha orientadora, Profa. Doutora Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, por ter me dado a oportunidade de integrar o Laboratório de Estudo Experimental da Dor (LEED), pela paciência, dedicação, respeito e por tudo o que me ensinou quando fui seu aluno de iniciação científica;

À minha co-orientadora, Profa. Me. Tereza Cristina Monteiro de Melo Prazeres, por sua ajuda inestimável e companheirismo nessas inúmeras horas de pesquisa.

Ao Laboratório de Estudo Experimental da Dor e aos mestres que lá encontrei, por sempre estarem dispostos a ensinar e contribuir na minha formação e pela amizade;

Aos meus colegas, contemporâneos de iniciação científica, Dhynael França, Larisse Brito, Thiemy Tsuru, Nathalia Lima e Danilo Ericeira, por dividirem comigo os desafios do dia-a-dia de um laboratório de pesquisa;

À Universidade Federal do Maranhão, pela oportunidade de cursar a graduação que eu tanto almejei;

À minha família e aos amigos pelo apoio e paciência em todas as vezes que estive ausente, por contribuírem diretamente na minha caminhada todos esses anos.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CAM	Concentração Alveolar Mínima
CCAC	Conselho Canadense de Cuidado do Animal em Ciência
CEUA	Comissão de Ética em Uso Animal
CI	Cistite Intersticial
CPPS	Síndrome da Dor Pélvica Crônica
CYP	Ciclofosfamida
D.P	Desvio Padrão
i.p	Intraperitoneal
NDMA	N-Metil-D-Aspartato
RPM	Rotações Por Minuto
SBD	Síndrome da Bexiga Dolorosa

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 01	Avaliação do limiar nociceptivo em ratos tratados com S+Cetamina e solução salina administrados 1 hora após a indução de cistite por ciclofosfamida (CYP)	24
Gráfico 02	Efeito da S+Cetamina sobre o peso das bexigas dos ratos com cistite intersticial induzida pela ciclofosfamida (CYP) e tratados com S+Cetamina e solução salina por via venosa	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Parâmetros comportamentais observados nos animais com cistite induzida por ciclofosfamida e tratados com S+Cetamina pelas vias vesical e venosa	25
-----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 01	Distribuição dos animais com cistite intersticial induzida por ciclofosfamida	19
Figura 02	Anestesia geral inalatória por vaporização	20
Figura 03	Avaliação de dor espontânea e hiperalgesia medida através do teste de von Frey	21
Figura 04	Desenho esquemático do protocolo experimental	22
Figura 05	Coleta de bexiga para pesagem	22

## RESUMO

**Introdução:** O manejo da dor crônica na cistite intersticial (CI) continua sendo um problema devido ao diagnóstico ocorrer, somente anos depois do aparecimento dos sintomas, retardando o início do tratamento. Além disso, a baixa eficácia das opções terapêuticas disponíveis, que incluem terapia oral ou instilação vesical de substâncias, o longo tempo de tratamento e a tolerância e dependência química aos opioides dificultam a padronização do tratamento deste tipo de dor visceral. Existem muitos estudos relacionados à atividade analgésica da cetamina, um antagonista do receptor NMDA, em modelos experimentais de dor, porém poucos avaliaram este efeito em modelos de dor visceral. **Objetivo:** Desenvolver um modelo experimental de cistite induzida por ciclofosfamida em ratos e avaliar os efeitos analgésico e anti-inflamatório da S+Cetamina neste tipo de dor visceral. **Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar distribuídos em quatro grupos (n=6): o grupo no qual não foi induzida cistite (Controle), o grupo que foi induzida cistite através da injeção intraperitoneal de ciclofosfamida, porém não recebeu tratamento (Cistite sem tratamento), o grupo com cistite e que recebeu S+Cetamina por via intravenosa (S+Cetamina venosa) e o grupo com cistite e que recebeu solução salina por via intravenosa (Salina venosa). As avaliações quanto à presença de sinais comportamentais de dor foram realizadas antes da indução de cistite e durante as 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> horas após a indução da cistite. A dor evocada foi avaliada pela aplicação do transdutor no abdome inferior do animal entre a uretra e a cauda e na pata traseira direita como região controle. A severidade da inflamação foi avaliada através da pesagem da bexiga dos animais. **Resultados:** A S+Cetamina por via endovenosa, tem maior ação analgésica, com maior limiar nociceptivo durante a primeira hora de observação, quando comparada com os outros grupos. **Conclusão:** A S+Cetamina tem papel importante na modulação da resposta inflamatória da cistite induzida por ciclofosfamida em ratos e apresenta maior efeito analgésico quando utilizada pela via venosa.

**Palavras-chaves:** Cistite, dor visceral, ciclofosfamida, S+Cetamina.

**SUMÁRIO**

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>18</b>
3.1 Amostra.....	18
3.2 Desenho do estudo experimental.....	18
3.3 Avaliação comportamental.....	20
3.4 Avaliação da alodinia mecânica (teste de von Frey).....	21
3.5 Coleta de dados e análise.....	21
3.6 Análise estatística.....	23
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Efeito do tratamento com S+Cetamina pela via venosa sobre o limiar nociceptivo.....	24
4.2 Efeito do tratamento com S+Cetamina administrada pela via venosa sobre a abertura ocular, frequência respiratória, piloereção e postura corporal dos animais.....	25
4.3 Efeito do tratamento com S+Cetamina sobre o peso da bexiga.....	26
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>30</b>
<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>31</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>34</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

A cistite intersticial ou síndrome da bexiga dolorosa (CI/SBD) é uma condição que se manifesta clinicamente por aumento da frequência e urgência urinárias, dor pélvica associada ao enchimento da bexiga e diminuição da capacidade vesical (CAYAN et al, 2002). Caracteriza-se por inflamação, rigidez da parede vesical e dor visceral, sendo a dor o achado clínico mais importante (BOUCHER, 2000). Estes sintomas geralmente aparecem de forma aguda, embora o diagnóstico ocorra muitas vezes somente anos depois do início do quadro (DRISCOLL e TEICHMAN, 2001).

A CI/SBD é mais prevalente em mulheres. Estima-se que a prevalência de SBD/CI atinja 1 a 3 milhões de mulheres nos Estados Unidos (BERRY et al, 2011). Muitos pacientes convivem com a frequência e urgência urinária aumentadas, associadas a constante desconforto pélvico diário, chegando a mais de vinte micções ao dia, que são exacerbadas por circunstâncias de estresse. Os efeitos da SBD/CI na qualidade de vida e função psicossocial são insidiosos, prejudicando o bem-estar geral, repercutindo na produtividade, nas relações interpessoais e na saúde em geral.

Apesar da SBD/CI se apresentar como uma doença inflamatória local da bexiga, muitos pacientes não respondem às terapias locais, sugerindo que existam fatores sistêmicos associados, visto que há elevada prevalência de comorbidades associadas como a fibromialgia e a síndrome do intestino irritável, que também se apresentam como síndromes crônicas dolorosas, sem causa identificável (NOVI et al, 2005; CLAUW, 2015).

Atualmente, ainda não se conhece a causa exata da CI, por conta disso não existe terapêutica específica e plenamente eficaz para esta doença, entretanto a combinação de tratamentos incluindo dietas, medicamentos e intervenções pode melhorar os sintomas. A eficácia no tratamento da SBD/CI ainda não foi padronizada apesar de terem sido descritas mais de 180 tipos de terapias diferentes, principalmente empíricas e sintomáticas, como amitriptilina, hidroxizine e cimetidine (FALL et al, 2008). Na prática clínica, o manejo da dor crônica na cistite intersticial continua sendo um problema devido ao diagnóstico

ocorrer anos depois do início dos sintomas, à baixa eficácia dos tratamentos disponíveis que incluem terapia oral ou instilação vesical de substâncias, longo tempo de tratamento, tolerância e dependência química aos opioides (WANTUCH et al, 2007; NICKEL et al, 2012).

A participação do sistema de transmissão glutaminérgica através dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) diretamente na cascata da inflamação e consequente dor já está bem estabelecida na literatura (PETRENKO et al, 2003; MCNEARNEY et al, 2010).

Com base nos estudos experimentais, a utilização de fármacos com propriedades antagonistas do receptor N-methyl-D-aspartato (NMDA) pode ser uma promessa para o tratamento da dor, tanto de vísceras normais quanto sensibilizadas (ELLIOTT et al, 1995; MEEN et al, 2002; KUIKEN et al, 2004; TENA et al, 2012). A cetamina, que é um antagonista não competitivo dos receptores NMDA e que também interage com os receptores muscarínicos, nicotínicos, colinérgicos e opioides, inibe a liberação neuronal de noradrenalina, dopamina e serotonina (IVANI et al, 2003). A cetamina ainda apresenta efeitos anti-inflamatórios bem descritos, como a inibição da adesão dos neutrófilos, diminuição da síntese de citocinas inflamatórias, interfere no funcionamento da enzima cicloxigenase 2 (COX-2), interage com os canais de íons cálcio e potássio (POULIOT et al, 2002; MCCALLION et al, 2004; CHIANG et al, 2008).

A dificuldade de realização de estudos em humanos por razões técnicas ou éticas levou à necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais de cistite que apresentem semelhança com a fisiopatologia da doença humana. Existem vários modelos de indução de cistite em ratos descritos na literatura (WESTROPP et al, 2002). A ciclofosfamida (CYS) tem sido muito utilizada para a indução da cistite intersticial em modelos animais (CHUNG et al, 2010; JUSZCZAK et al, 2010). A ciclofosfamida é um agente antitumoral metabolizado em acroleína no fígado que se acumula na urina, causando estresse e morte celular, produzindo efeitos tóxicos responsáveis pela indução da cistite, resultando em dor visceral (COX, 1979; BOUCHER et al, 2000). A indução é feita através da instilação intraperitoneal de ciclofosfamida, apresenta rápida

evolução e pode ser monitorizada através de parâmetros comportamentais e achados histológicos como demonstrou Bon et al (2003).

Neste contexto, a investigação dos mecanismos fisiopatológicos e a busca por alternativas terapêuticas para a CI são essenciais. Diante da necessidade e importância de estudos pré-clínicos, bem como da dificuldade de execução de um modelo de cistite em humanos, o presente estudo tem como objetivo avaliar a ação anti-inflamatória da S+Cetamina em modelo experimental de cistite em ratos.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito analgésico de S+Cetamina na dor visceral e sua possível ação anti-inflamatória na bexiga em um modelo de cistite induzida por ciclofosfamida em ratos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Caracterizar a resposta analgésica da S+Cetamina no tratamento dos animais com cistite induzida por ciclofosfamida;

2. Avaliar o efeito da S+Cetamina sobre o processo inflamatório vesical através do peso da bexiga nos animais com cistite induzida por ciclofosfamida.

### **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostra**

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, fêmeas, adultas, pesando entre 230 e 280g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Estes animais foram aclimatados e submetidos a condições controladas de umidade, luz artificial em ciclos de 12 horas claro/escuro, em um ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2$ o C), com livre consumo de ração Nuvilab CR-1® e água.

Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e do Canadian Council on Animal Care in Science-CCAC (CARE, 2010). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da UFMA (CEUA) sob o protocolo no 23115.007977/2013-99. Uma semana antes de iniciar o protocolo experimental, os animais foram adaptados aos aparelhos e testes comportamentais diariamente.

#### **3.2 Desenho Experimental do Estudo**

Foi utilizada como medicação indutora da cistite, para o modelo de dor visceral, a ciclofosfamida (Genuxal®) na apresentação de frasco/ampola-200mg, na dose de 150mg/Kg via intraperitoneal (i.p) (WANTUCH et al, 2007; WANG et al, 2008; SILVA JUNIOR et al, 2013).

Os ratos foram distribuídos em quatro grupos de seis animais: o grupo no qual não foi induzida cistite (Controle), o grupo no qual foi induzida cistite, porém não recebeu tratamento (CST), o grupo com cistite e que recebeu S+Cetamina por via intravenosa (S+Cetamina venosa) e o grupo com cistite e que recebeu solução salina por via intravenosa (Salina venosa). Os animais do grupo controle foram utilizados como parâmetro de comparação; os animais do grupo cistite sem tratamento foram empregados para simular todos os procedimentos realizados nos animais, como anestesia, injeção intraperitoneal,

testes comportamentais, porém não foram tratados com a aplicação de S+Cetamina. (Figura 5).

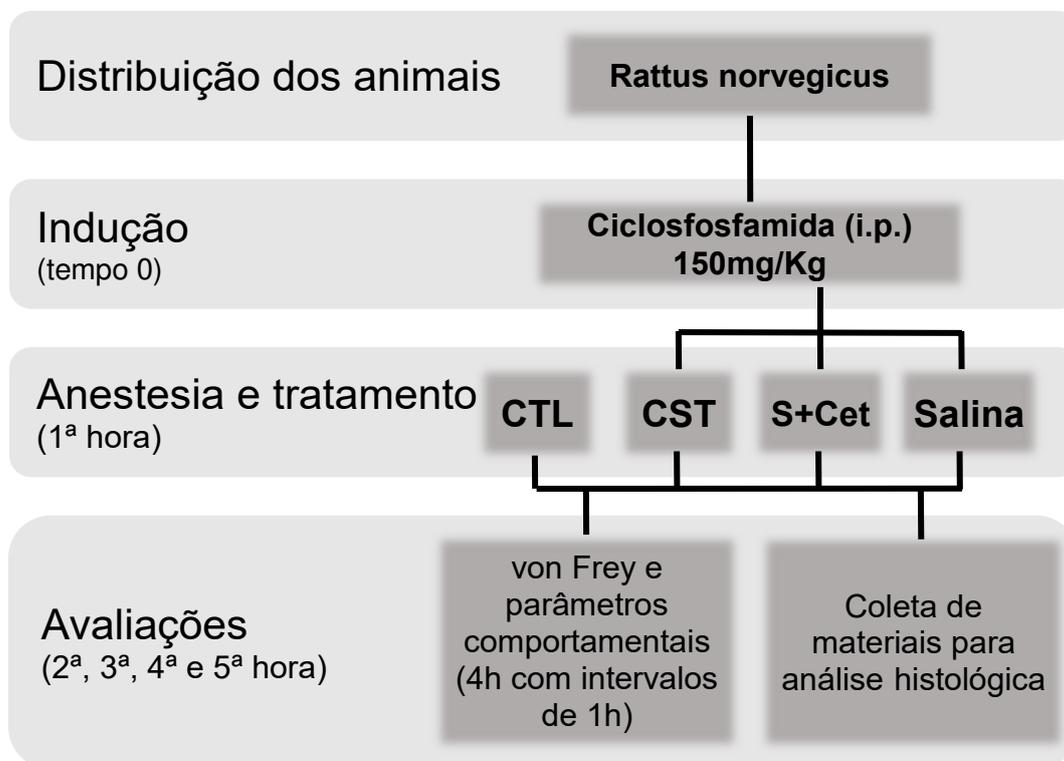


Figura 1: Cistite intersticial induzida por ciclofosfamida em ratos. O grupo controle no qual não foi induzida cistite (CTL), o grupo que foi induzida cistite, porém não recebeu tratamento (CST), o grupo com cistite e que recebeu S+Cetamina por via intravenosa (S+cet), o grupo com cistite e que recebeu solução salina por via intravenosa (Salina).

Após 60 minutos da injeção de 150mg/Kg de ciclofosfamida via i.p., os animais foram anestesiados via inalatória com isoflurano a 1% (Isoflurano® - BioChimico®), com 1,5 CAM (Concentração Alveolar Mínima) para serem submetidos à administração dos fármacos. O nível de anestesia foi mantido pela ausência de resposta motora à aplicação de estímulo doloroso e ausência do reflexo córneo palpebral (OLIVAR e LAIRD, 1999).

Nos animais de grupo cetamina venosa foi administrado, por acesso venoso na pata esquerda com Scalp 27G, 1mL/kg do volume da solução de S+Cetamina (Ketamina-S(+)) 50mg/mL - Cristália). O mesmo volume de solução salina foi infundida nos animais do grupo salina venosa (OLIVAR e LAIRD, 1999).



Figura 2. Anestesia geral inalatória por vaporização. Fonte: Arquivo pessoal

### 3.3 Avaliação Comportamental

Os comportamentos dolorosos espontâneos foram avaliados simultaneamente aos comportamentos evocados no mesmo rato, sendo observadas características como piloereção, mobilidade, abertura ocular, frequência respiratória e lambeduras. Esta avaliação foi feita de forma cega por dois observadores. As avaliações quanto à presença de sinais comportamentais de dor espontânea foram realizadas durante as 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> horas após a indução conforme descrito previamente (BON et al, 2003).

Foi utilizada uma escala modificada arbitrária de 0 a 10 para cada parâmetro comportamental, totalizando o escore total de 0 a 30 (BOUCHER, 2000). A frequência respiratória foi avaliada de forma que a cada diminuição de 10 ciclos/min, o escore era reduzido em um ponto. Para abertura e fechamento ocular, foi feita uma escala com o seguinte escore: 0 – abertura completa, que corresponde a normalidade; 10 – para fechamento completo; 5 – para olhos semiabertos e 2 e 7 – para duas posições intermediárias, entre olhos abertos e semiabertos, e olhos fechados e semi-fechados, respectivamente. Quanto à postura corporal, se o animal adotasse uma postura de tentativa de lambem o dorso com o corpo todo alinhado ou o abdome inferior, era atribuído escore 10.

Quando não houvesse mudança na postura por um período de 15 minutos o escore seria 0.

### 3.4 Avaliação da Alodinia Mecânica (TESTE DE VON FREY)

A alodinia mecânica foi avaliada com um analgesímetro digital (modelo Insigth, São Paulo, Brasil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em grama força (gf). A precisão do aparelho é de 0,1 g. O aparelho foi calibrado para registrar uma força máxima de 150 gf, mantendo a precisão de 0,1 gf até a força de 80 gf. A dor evocada foi avaliada pela aplicação do transdutor no abdome inferior do animal entre a uretra e a cauda e na pata traseira direita como região controle conforme descrição prévia (Figura 1) (GUERIOS et al, 2008; STUDENY et al, 2008; TENA et al, 2012).

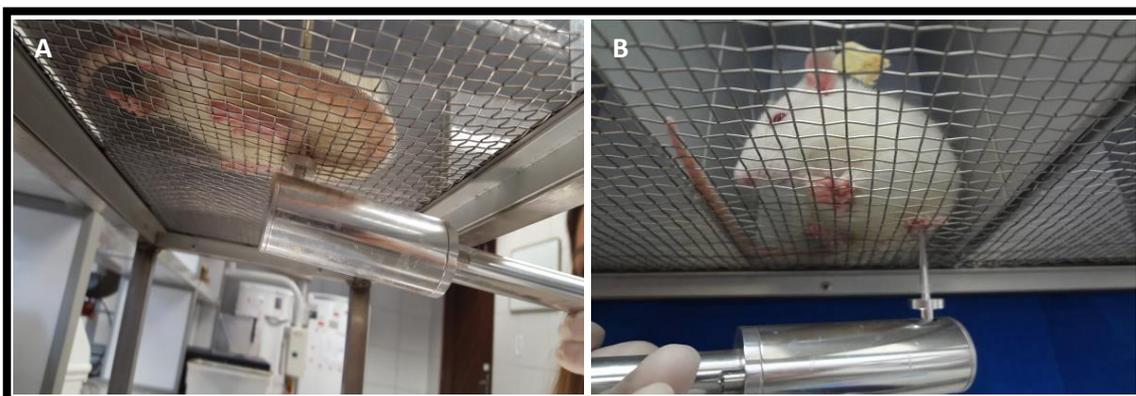


Figura 3. Avaliação de dor espontânea e hiperalgesia medida pelos filamentos de von Frey após a injeção intraperitoneal de ciclofosfamida. Fonte: Arquivo pessoal

### 3.5 Coleta de Dados e Análise

Após 5 horas da indução da cistite e após 4h do tratamento com S+Cetamina, os animais foram novamente submetidos à anestesia inalatória por vaporização com isoflurano a 1% e CAM de 1,5 para a coleta de material considerando o tempo de 5 horas suficiente para a caracterização do modelo de cistite aguda por ciclofosfamida (Figura 4) (SILVA JUNIOR et al, 2013). Em seguida, os animais foram submetidos à laparotomia exploradora por incisão

abdominal mediana, para coleta de amostra tecidual representada pela bexiga (Figura 5).

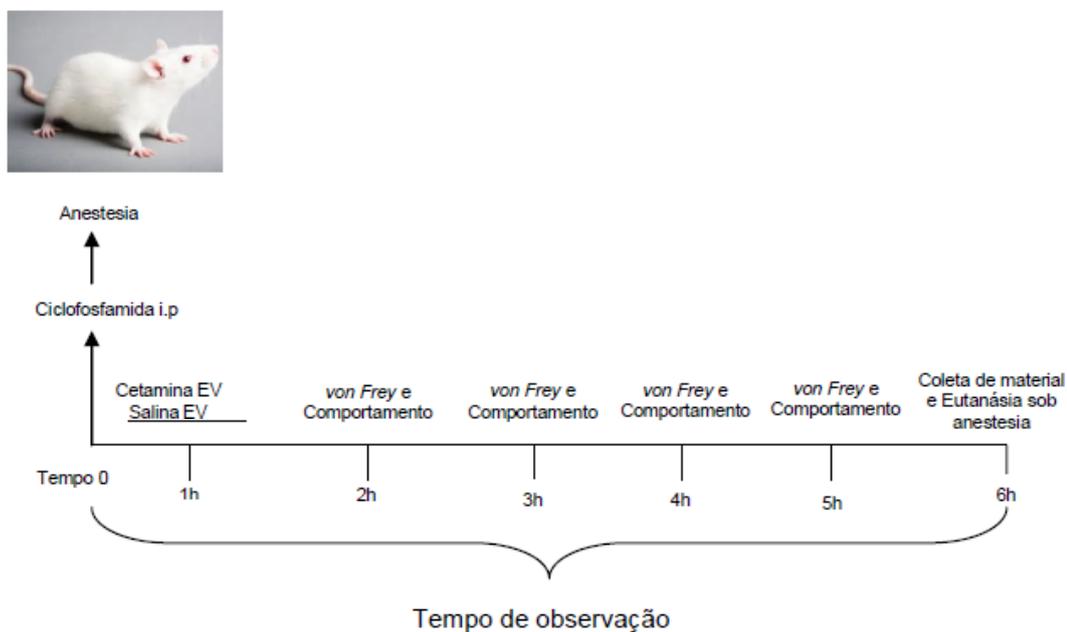


Figura 4: Desenho esquemático do protocolo experimental

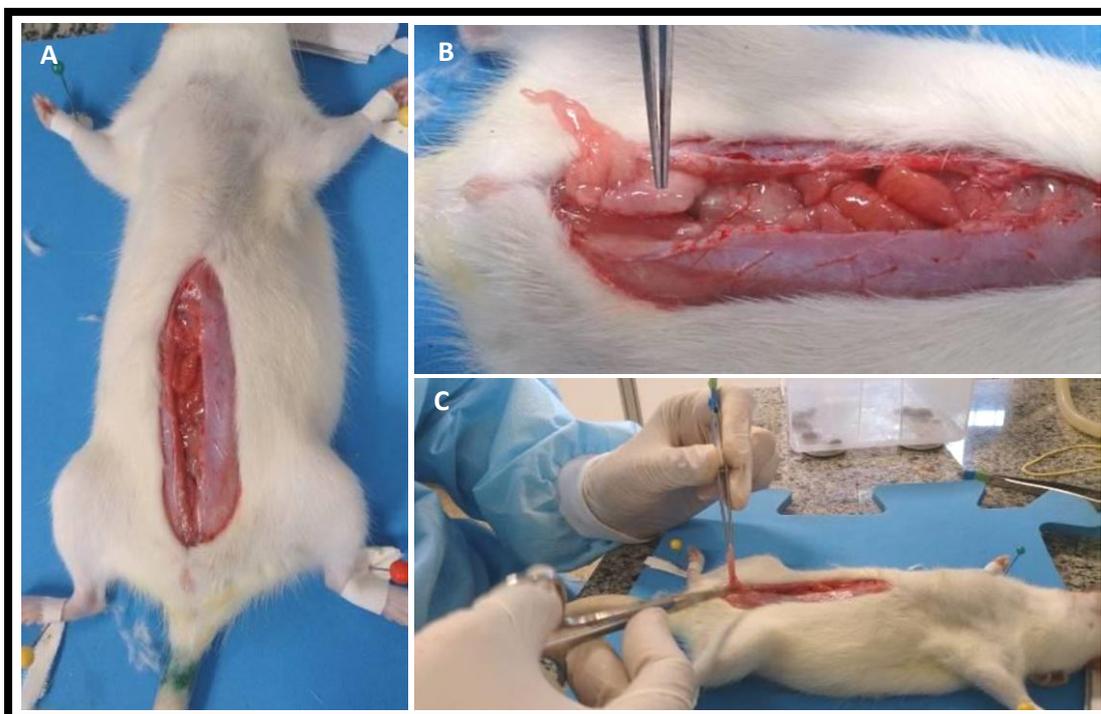


Figura 5. Coleta da bexiga para pesagem. (A) Abertura da cavidade abdominal. (B) Identificação, avaliação macroscópica. (C) Exérese da bexiga. Fonte: Arquivo pessoal.

A bexiga foi identificada e seccionada na região do colo vesical, então pesada em balança de precisão (Toledo Prix AS 220 R2 - 220g x 0,0001g). Após a coleta do material, os animais ainda anestesiados foram sacrificados por deslocamento cervical (JUSZCZAK et al, 2010).

### **3.6 Análise Estatística**

Após a verificação da normalidade, os resultados foram analisados e comparados utilizando-se o ANOVA com ajuste de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas dos dados não paramétricos, e teste T de Student quando somente dois grupos foram comparados.

Avaliações estatísticas foram realizadas utilizando o software “Graph pad Instal®” (GraphPad Prism, San Diego, CA). Todos os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão, e valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito do Tratamento Com S+Cetamina pela via Venosa sobre o Limiar Nociceptivo.

Ao avaliar o efeito analgésico através do teste de von Frey, observou-se que a S+Cetamina por via venosa tem maior ação analgésica elevando o limiar nociceptivo dos animais na primeira hora de observação após a administração, quando comparada aos demais grupos, porém sem significância estatística. Durante a terceira hora, observou-se o aumento do limiar nociceptivo no grupo que recebeu S+Cetamina venosa ( $32,1 \pm 2,4$ ) quando comparada ao grupo que recebeu salina venosa ( $12,1 \pm 2,0$ ), com p valor de 0,0002). Após quatro horas da administração da S+Cetamina, não se observou mais diferença entre os animais, quando se avalia o limiar nociceptivo (Gráfico 1).

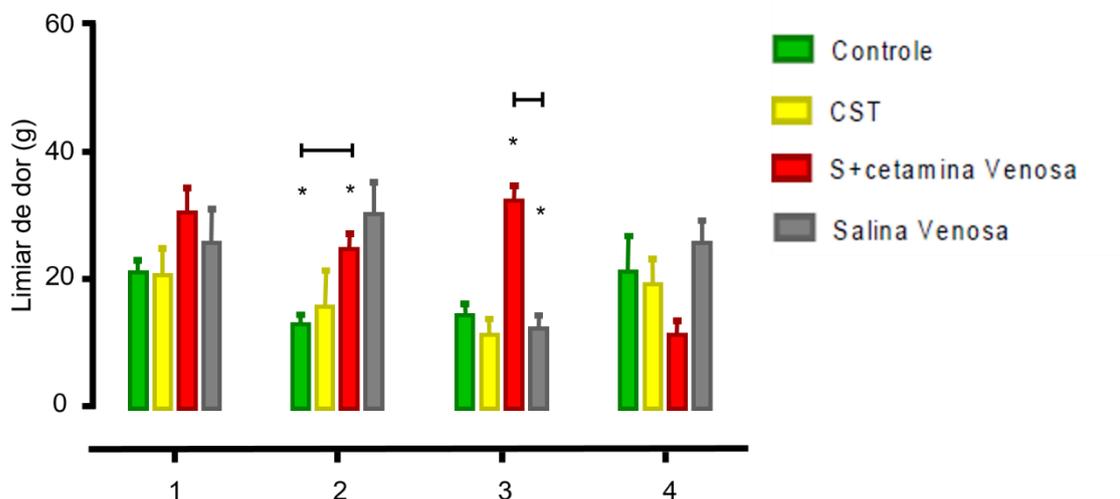


Gráfico 1- Avaliação do limiar nociceptivo pelo teste de von Frey durante quatro horas, em ratos tratados com S+Cetamina (0,5mg/Kg por via intravenosa) e solução salina (NaCl 0,9% 1ml/Kg por via venosa), administrados 1 hora após a indução da cistite por CYP. Os dados estão representados por barras verticais e erro padrão. \* indica diferença significativa entre os grupos dos animais do estudo (T student e  $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Efeito do Tratamento com S+Cetamina Administrada pela via Venosa sobre a Abertura Ocular, Frequência Respiratória, Piloereção e Postura Corporal dos Animais.

Nos animais do grupo CLT, nos quais não foi induzida a cistite por ciclofosfamida, não foram observados parâmetros sugestivos de quadro doloroso, nenhum animal apresentou piloereção ou lambertura do abdome.

Ao observar a abertura ocular dos animais, foi possível evidenciar que não houve diferença entre os animais ( $p=0,07$ ). A avaliação dos animais tratados permite evidenciar que os animais que receberam S+Cetamina por via venosa apresentaram maior abertura ocular quando comparados aos animais que receberam salina venosa, porém sem diferença significativa.

Não foram detectadas alterações significativas na frequência respiratória ( $p=0,24$ ), na postura corporal ( $p=0,41$ ) e na presença de pelos eriçados ( $p=0,41$ ) dos animais avaliados, embora se observe um discreto aumento da frequência respiratória após a primeira hora do tratamento, nos animais que receberam S+Cetamina; mais expressivo no grupo que recebeu por via venosa, porém sem significado estatístico.

	<u>Parâmetros observados</u>					
	Abertura Ocular (% eventos) $p = 0,07$			Frequência respiratória (IRPM) $\bar{X}$ $p = 0,24$	Pelos eriçados (% animais) $p = 0,41$	Lambertura do abdome (% animais) $p = 0,41$
	Aberto	Semiaberto	Fechado			
Controle	66,8	27,2	0,0	62,6	0	0
CST	74,0	22,2	3,7	63,2	40	30
S+Cetamina venosa	73,3	26,6	0,0	70,3	11,1	66,6
Salina venosa	66,6	28,5	4,7	62,2	12,5	12,5

Tabela 1: Parâmetros comportamentais observados nos animais com cistite intersticial induzida por ciclofosfamida e tratados com S+Cetamina (0,5mg/Kg) e solução salina (1mL/Kg) administrados por via venosa.

Os animais tratados com S+Cetamina pela via vesical venosa apresentaram menor frequência de piloereção, mantendo comportamento ativo na terceira e quarta hora em relação ao grupo controle (Tabela 1).

#### 4.3 Efeito do Tratamento com S+Cetamina sobre o Peso da Bexiga

Ao avaliar o peso das bexigas 6 horas após a indução da cistite, comparando o grupo de animais tratados com S+Cetamina com os demais grupos de animais, se observou que não houve diferença estatisticamente significativa.

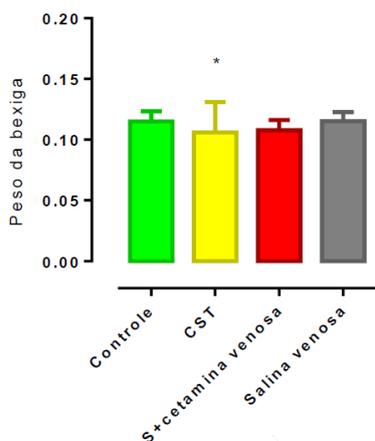


Gráfico 2. Efeito da S+Cetamina sobre o peso das bexigas dos ratos com cistite intersticial induzida pela ciclofosfamida (CYP) e tratados com S+Cetamina e solução salina por via venosa.

## 5 - DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado um aumento do limiar nociceptivo nos animais tratados com S+Cetamina por via venosa, quando comparado com o grupo que recebeu apenas salina venosa. Entretanto, após 180 minutos de observação, não foi possível detectar diferença no limiar nociceptivo entre os grupos do estudo. Tal efeito pode ser associado à metabolização da S+Cetamina que possui meia-vida plasmática de 186 minutos conforme demonstrado por alguns autores (DE OLIVEIRA et al, 2004).

A inflamação da bexiga está associada a uma maior sensibilidade mecânica devido à convergência dos “inputs” viscerais e somáticos no sistema nervoso. Este fenômeno é conhecido como hipersensibilidade visceral e pode ser avaliado por meio de estimulação mecânica com filamentos de von Frey, cuja redução do limiar mecânico é interpretada como indicativo de dor visceral, como foi desenvolvido neste estudo (CERVERO e LAIRD, 2004; RUDICK et al, 2007). A hipersensibilidade referida é proporcional à intensidade do comportamento de dor visceral expressa pelos animais.

Os receptores NMDA tem um importante papel na nocicepção e hiperalgesia visceral e estão expressos nas camadas muscular e mucosa no trato urinário inferior (MEEN et al, 2002; CERVERO e LAIRD, 2004). Embora o tratamento da dor visceral seja substancialmente diferente da dor proveniente de tecido somático, existe evidência convincente de que os receptores NMDA espinhais e periféricos também estejam envolvidos no processo da dor nociceptiva visceral conforme estudos na literatura (CERVERO e LAIRD, 1999; MEEN et al, 2002). Foi demonstrada neste estudo, a ação analgésica da S+Cetamina sobre o limiar nociceptivo dos animais com cistite, destacando-se a ação sistêmica que parece mais importante, desde o início do experimento. Porém, não é possível descartar um provável efeito local deste fármaco em receptores NMDA na bexiga.

Embora nenhum animal do grupo controle tenha apresentado pelos eriçados e ocorrência de postura corporal específica de comportamento doloroso, este achado não teve significância estatística quando comparados aos

animais com cistite induzida por CYP. A administração intraperitoneal de CYP induz alterações acentuadas no comportamento dos animais que são compatíveis com a sensação de dor, portanto a utilização deste modelo experimental é útil para avaliar as mudanças comportamentais características de dor em animais, as quais incluem o fechamento dos olhos, a diminuição da frequência respiratória e a presença de posturas específicas ou de imobilidade dentre outros conforme demonstrou Boucher et al (2000).

Os animais tratados com S+Cetamina por via venosa não apresentaram maior frequência de piloereção quando comparados ao grupo cistite sem tratamento, mantendo comportamento ativo na terceira e quarta horas em relação ao grupo controle. Em estudo realizado por JUSZCZAK et al (2010) foi evidenciado que após a injeção de ciclofosfamida, os animais apresentaram piloereção, postura de imobilidade com a cabeça alinhada com o eixo do corpo, enquanto que nenhum dos ratos do controle e os ratos com cistite crônica apresentavam esta posição. Ao observar a abertura ocular, frequência respiratória e postura corporal dos animais evidenciou-se que não houve diferença entre os animais tratados com S+Cetamina venosa, quando comparados aos animais do grupo controle e CST. No entanto, WANTUCH et al (2007) evidenciaram em camundongos, durante 4 horas de observação, a presença de comportamentos dolorosos espontâneos e evocados, além de demonstrar que a morfina, o cetorolaco e a duloxetina foram eficazes em reduzir a dor espontânea e a hiperalgesia referida (dor evocada). Tal efeito não foi demonstrado neste trabalho. Talvez por serem parâmetros de interpretação subjetiva do avaliador, e, portanto, serem suscetíveis a um viés de observação.

O peso da bexiga dos animais reflete, de modo indireto, a inflamação aguda (edema, congestão vascular e infiltrado celular). Entretanto, no estudo em análise, não foi possível observar diferença de peso da bexiga entre os grupos de animais. Estes dados são coerentes com os resultados de um estudo que observou Camundongos *Mus musculus* por um período de 6 e 12 horas após a indução com CYP, tratados com fitoterápico que não encontrou alteração na mensuração dos pesos da bexiga (SILVA JUNIOR et al, 2013).

Pouco se conhece sobre a administração da cetamina por outras vias e até o momento, não foi encontrada na literatura científica nenhuma referência à administração da S+Cetamina por via vesical em um modelo experimental de cistite. Verificou-se que a instilação vesical da S+Cetamina parece ser mais lesiva ao urotélio, no entanto apresenta uma ação imunomoduladora que precisa ser melhor detalhada, tanto a ação pró-inflamatória como anti-inflamatória.

Como limitações deste estudo podem ser citados alguns pontos: o tempo curto de observação, que restringiu o experimento à fase aguda do experimento; o uso de uma única dose de S+Cetamina, que limita as conclusões em relação as infusões contínuas e baixas doses hiperalgésicas utilizadas clinicamente; a utilização de outras vias de administração da S+Cetamina, como, por exemplo, a via intravesical; a falta de análise histopatológica das peças de bexiga para a avaliação das alterações histológicas provocadas pela inflamação, sendo necessários novos estudos que abordem tais questões nesse modelo de dor visceral.

## **6- CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, é possível confirmar o efeito analgésico da S+Cetamina por via venosa no tratamento da cistite induzida por ciclofosfamida.

A avaliação da intensidade do processo inflamatório através do peso da bexiga mostrou-se um método ruim para tal finalidade, uma vez que não foi capaz de apontar diferença significativa entre as amostras.

**7 – ANEXOS****ANEXO 1 - FICHA PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL****EXPERIMENTO:**

Data:

**Identificação:****Peso:****Grupo:****Terapêutica experimental:**

1. Fármaco/dose:

Volume:

Administração:

Horário:

2. Fármaco/dose:

Volume:

Administração:

Horário:

**Parâmetros Comportamentais:**

Horário	1h	2h	3h	4h
Frequência Respiratória				
Abertura e fechamento Ocular				
Postura Corporal/Piloereção				
von Frey Abdome				
von Frey Pata				

## ANEXO 2 - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

 <b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>	
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL</b>	<b>Nº do parecer: 11</b>
<b>PROJETO DE PESQUISA</b>	<b>Registro da CEUA: 11/13</b> <b>Nº do Protocolo: 23115.007977/2013-99</b> <b>Data de entrada no CEUA: 14/06/13</b> <b>Parecer: Aprovado</b>

### I – Identificação

<b>Título do projeto:</b> <b>AVALIAÇÃO DA DOR VISCERAL EM MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS</b>		
<b>Identificação da equipe executora:</b> Tereza Cristina Monteiro de Melo Prazeres, Maria do Socorro Cartágenes, João Batista Santos Garcia		
<b>Instituição onde será realizado:</b> UFMA		
<b>Área temática: Não se aplica</b>	<b>Multicêntrico: Não</b>	<b>Data de recebimento:</b> 14/06/2013
<b>Cooperação estrangeira:</b>		<b>Data de devolução:</b> 15/07/2013

### II – Objetivos:

#### Objetivo geral:

Avaliar o efeito analgésico de S+ cetamina na dor visceral e sua possível ação antiinflamatória na bexiga em um modelo de cistite em ratos.

### III – Sumário do projeto:

Cistite Intersticial é uma síndrome dolorosa pélvico-perineal de etiologia desconhecida, caracterizada por frequência e urgência urinárias, inflamação, rigidez da parede vesical e dor visceral, sendo a dor, o achado clínico mais importante da cistite intersticial<sup>1</sup>. Este tipo de dor é frequentemente resistente ao tratamento com simples analgésicos ou agentes tradicionais, mas pode ser sensível a outras classes de drogas que normalmente não produzem efeito na transmissão dolorosa, como os antidepressivos. A ciclofosfamida é um agente antitumoral metabolizado em acroleína no rim e acumula na bexiga produzindo efeitos tóxicos, resultando em dor visceral. Cetamina é um fármaco- hipnótico com elevado poder analgésico, antagonista dos receptores NMDA, receptores opióides, canais de cálcio voltagem dependentes receptores colinérgicos e vias inibitórias descendentes monoaminérgicas, que foi muito utilizada na prática da anestesia, mas os efeitos psicomiméticos tornaram-se um fator limitante ao seu emprego em larga escala. Porém a partir da década de 90 foi introduzido o seu isômero levógiro na prática clínica com a vantagem de provocar menos efeitos colaterais. Principalmente quando utilizada em pequenas doses caracteristicamente sub-anestésicas. Atualmente existe somente a via oral como opção disponível aprovada para tratar dor associada a cistite intersticial. Embora outras terapias sejam utilizadas, de acordo com a associação nacional de cistite estas terapias promovem apenas alívio imediato. A terapia eficaz da dor visceral na cistite tem sido uns dos principais desafios terapêuticos. Na busca para uma nova alternativa terapêutica, esse estudo propõe uma ação sistêmica e local da S+cetamina, cujo principal mecanismo de ação é ser antagonista do receptor NMDA. Considerando a dificuldade de execução de um modelo de cistite em humanos para avaliar a eficácia da S+cetamina, este estudo vem avaliar a ação analgésica desse fármaco em modelo experimental de cistite em ratos.

**IV – Comentário do relator frente à resolução 779 de 26 de agosto de 2010 e complementares em particular sobre:**

O atual projeto trata-se de projeto de dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde (UFMA) de Tereza Cristina Monteiro de Melo Prazeres, o qual será orientado pelo Prof Dr. João Batista Santos Garcia (UFMA). O objetivo geral do projeto é avaliar o efeito analgésico de S+ cetamina na dor visceral e sua possível ação antiinflamatória na bexiga em um modelo de cistite em ratos.

O projeto será realizado nas dependências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), No Laboratório Experimental para Estudos da Dor (LEED). A sua vigência será de 24 meses a iniciar após a aprovação desta comissão, o que é coerente por se tratar de projeto de mestrado. O valor do projeto está orçado em cerca de cinco mil reais e não tem financiamento próprio, mas os pesquisadores afirmaram que o mesmo será arcado com recursos da Liga Acadêmica de Dor, coordenada pelo orientador do projeto.

O projeto está conciso e coerente quanto aos seus objetivos. Os animais serão anestesiados corretamente para realização dos procedimentos com anestésicos descritos na literatura que não interfiram no tratamento com cetamina a ser testado. Os métodos a serem utilizados, tanto em relação à indução da cistite, quanto ao tratamento e avaliações de dor, estão claros e são baseados em artigos publicados em revistas conceituadas. O projeto utilizará trinta ratos da linhagem Wistar, com 230-280 gramas, provenientes do Biotério Central da UFMA. Os animais serão distribuídos igualmente e aleatoriamente em cinco grupos de seis animais. Haverá um grupo controle no qual não será induzida cistite (C), um grupo com cistite tratado com solução salina venosa (CI-salina venosa), um grupo com cistite tratado com solução salina intravesical (CI-salina intravesical), um grupo com cistite tratado com S+ cetamina venosa (CI- cetamina venosa) e um último grupo com cistite, tratado com S+ cetamina intravesical (CI- cetamina intravesical). Foi informado que os animais serão oriundos do Biotério Central da UFMA, mas é recomendável que seja acrescentado um ofício do Diretor do Biotério garantido a viabilidade do fornecimento ou então, outra fonte onde os animais possam ser adquiridos. É necessária a indicação, no projeto, sobre o Biotério de Experimentação no qual os animais serão acondicionados e tratados. Não há informações sobre o destino das carcaças dos animais coletados, o que seria recomendado ser acrescentado.

**V – Pendências**

Não há pendências

**VI – Recomendações:**

- Anexar um documento do Biotério da UFMA concordando em ceder os animais necessários para a pesquisa;
- Incluir o destino das carcaças dos animais
- Estas recomendações não inviabilizam o início da execução dos experimentos.

**VII – Parecer consubstanciado da CEUA**

O projeto intitulado **AVALIAÇÃO DA DOR VISCERAL EM MODELO EXPERIMENTAL EM RATOS** foi considerado **APROVADO** pela CEUA/UFMA.

São Luís, \_20\_/\_12/\_/13\_

Profa Dra Lucilene Amorim Silva

Presidente da CEUA / UFMA

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERRY, S. H.; ELLIOTT, M. N.; SUTTORP, M.; BOGART, L. M.; STOTO, M. A.; EGGERS, P.; NYBERG, L.; CLEMENS, J. Q. Prevalence of symptoms of bladder pain syndrome/interstitial cystitis among adult females in the United States. *J Urol*, v. 186, n. 2, p. 540-4, 2011.

BON, K.; LICHTENSTEIGER, C. A.; WILSON, S. G.; MOGIL, J. S. Characterization of Cyclophosphamide Cystitis, a Model of Visceral and Referred Pain, in the Mouse: Species and Strain Differences. *The Journal of Urology*, v. 170, n. 3, p. 1008-1012, 2003.

BOUCHER, M.; MEEN, M.; CODRON, J. P.; COUDORE, F.; KEMENY, J. L.; ESCHALIER, A. Cyclophosphamide-induced cystitis in freely-moving conscious rats: behavioral approach to a new model of visceral pain. *J Urol*, v. 164, n. 1, p. 203-8, 2000.

ÇAYAN, S.; CHERMANSKY, C.; SCHLOTE, N.; SEKIDO, N.; NUNES, L.; DAHIYA, R.; TANAGHO, E. A. The bladder acellular matrix graft in a rat chemical cystitis model: functional and histologic evaluation. *J Urol*, v. 168, n. 2, p. 798-804, 2002

CERVERO, F.; LAIRD, J. M. Understanding the signaling and transmission of visceral nociceptive events. *J Neurobiol*, v. 61, n. 1, p. 45-54, 2004.

CERVERO, F.; LAIRD, J. M. A. Visceral pain. *The Lancet*, v. 353, n. 9170, p. 2145-2148, 1999.

CLAUW, D. J. Fibromyalgia and related conditions. *Mayo Clin Proc*, v. 90, n. 5, p. 680-92, 2015.

CLEMENS, J. Q.; MEENAN, R. T.; ROSETTI, M. C.; GAO, S. Y.; CALHOUN, E. A. Prevalence and incidence of interstitial cystitis in a managed care population. *J Urol*, v. 173, n. 1, p. 98-102; discussion 102, 2005.

CHIANG, N.; SCHWAB, J. M.; FREDMAN, G.; KASUGA, K.; GELMAN, S.; SERHAN, C. N. Anesthetics impact the resolution of inflammation. *PLoS One*, v. 3, n. 4, p.1-16, 1879e, 2008.

CHUNG, S. ; KANG, D. O.; YAMZON, J.; WARBURTON, D.; KOH, C. J. O-GlcNAc mediated glycosylation down-regulation in mice with cyclophosphamide induced cystitis. *J Urol*, v. 183, n. 1, p. 351-6, 2010.

COX, P. J. Cyclophosphamide cystitis—Identification of acrolein as the causative agent. *Biochemical Pharmacology*, v. 28, n. 13, p. 2045-2049, 1979.

DE OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GARCIA, J. B. S. Cetamina e analgesia preemptiva. *Rev Bras Anesthesiol*, v. 54, n. 5, p. 739-752, 2004.

DRISCOLL, A.; TEICHMAN, J. M. How do patients with interstitial cystitis present? *J Urol*, v. 166, n. 6, p. 2118-20, 2001.

ELLIOTT, K.; KEST, B.; MAN, A.; KAO, B.; INTURRISI, C. E. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, mu and kappa opioid tolerance, and perspectives on new analgesic drug development. *Neuropsychopharmacology*, v. 13, n. 4, p. 347-56, 1995.

FALL, M.; OBERPENNING, F.; PEEKER, R. Treatment of bladder pain syndrome/interstitial cystitis 2008: can we make evidence-based decisions? *Eur Urol*, v. 54, n. 1, p. 65-75, 2008.

IVANI, G.; VERCELLINO, C.; TONETTI, F. Ketamine: a new look to an old drug. *Minerva Anesthesiol*, v. 69, n. 5, p. 468-71, 2003.

JUSZCZAK, K.; GIL, K.; WYCZOLKOWSKI, M.; THOR, P.J. Functional, histological structure and mastocytes alterations in rat urinary bladders following acute and chronic cyclophosphamide treatment. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 61, n. 4, p. 477-482, 2010.

KUIKEN, S.; BERG, S Th VD.; TYTGAT, GN J.; BOECKXSTAENS, GE E. Oral S(+)-Ketamine Does Not Change Visceral Perception in Health. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 49, n. 11-12, p. 1745-1751, 2004.

MEEN, M.; COUDORE-CIVIALE, M. A.; PARRY, L.; ESCHALIER, A.; BOUCHER, M. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in nociception in the cyclophosphamide-induced vesical pain model in the conscious rat. *Eur J Pain*, v. 6, n. 4, p. 307-14, 2002.

MCCALLION, K.; HARKIN, D. W.; GARDINER, K. R. Role of adenosine in immunomodulation: review of the literature. *Crit Care Med*, v. 32, n. 1, p. 273-7, 2004.

MCNEARNEY, T. A.; MA, Y.; CHEN, Y.; TAGLIALATELA, G.; YIN, H.; ZHANG, W. R.; WESTLUND, K. N. A peripheral neuroimmune link: glutamate agonists upregulate NMDA NR1 receptor mRNA and protein, vimentin, TNF-alpha, and RANTES in cultured human synoviocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 298, n. 3, p. R584-98, 2010.

NICKEL, J. C.; JAIN, P.; SHORE, N.; ANDERSON, J.; GIESING, D.; LEE, H.; KIM, G.; DANIEL, K.; WHITE, S.; LARRIVEE-ELKINS, C.; LEKSTROM-HIMES, J.; CIMA, M. Continuous intravesical lidocaine treatment for interstitial cystitis/bladder pain syndrome: safety and efficacy of a new drug delivery device. *Sci Transl Med*, v. 4, n. 143, p. 143ra100, 2012.

NOVI, J. M.; JERONIS, S.; SRINIVAS, S.; SRINIVASAN, R.; MORGAN, M. A. ARYA, L. A. Risk of irritable bowel syndrome and depression in women with interstitial cystitis: A case-control study. *The Journal of Urology*, v. 174, n. 3, p. 937-940, 2005.

PETRENKO, A. B.; YAMAKURA, T.; BABA, H.; SHIMOJI, K. The Role of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. *Anesthesia & Analgesia*, p. 1108-1116, 2003.

POULIOT, M.; FISET, M. E.; MASSE, M.; NACCACHE, P. H.; BORGEAT, P. Adenosine up-regulates cyclooxygenase-2 in human granulocytes: impact on the balance of eicosanoid generation. *J Immunol*, v. 169, n. 9, p. 5279-86, 2002.

RUDICK, C. N.; CHEN, M. C.; MONGIU, A. K.; KLUMPP, D. J. Organ cross talk modulates pelvic pain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 293, n. 3, p. 1191-8, 2007.

SILVA JUNIOR, R. N. C.; FIALHO, E.M.S.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; MACHADO, J. L.; ARRUDA, D.; FURTADO, P. G. R.; GONÇALVES FILHO, A.; NASCIMENTO, F. R. F. Caracterização do modelo inflamatório de cistite induzida por ciclofosfamida em camundongos swiss. *Rev. Ciênc. Saúde* v. 15, n. 1, p. 55-67, 2013.

TENA, B.;ESCOBAR, B.; ARGUIS, M. J.; CANTERO, C.; RIOS, J.; GOMAR, C. Reproducibility of Electronic Von Frey and Von Frey monofilaments testing. Clin J Pain, v. 28, n. 4, p. 318-23, 2012.

WANTUCH, C.; PIESLA, M.; LEVENTHAL, L. Pharmacological validation of a model of cystitis pain in the mouse. Neuroscience Letters, v. 421, n. 3, p. 250-252, 2007.

WESTROPP, J. L.; BUFFINGTON, C. A. In vivo models of interstitial cystitis. J Urol, v. 167, n. 2 Pt 1, p. 694-702, 2002.