



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



KAROLINE NUNES NEVES CHEREM

**Análise histológica do efeito do diclofenaco nanoencapsulado associado a iontoforese na articulação de ratos com artrite induzida por CFA**

Florianópolis

2022

KAROLINE NUNES NEVES CHEREM

**Análise histológica do efeito do diclofenaco nanoencapsulado aplicado por iontoforese na articulação de ratos com artrite induzida por CFA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi.

**Coorientador:** Dr. Eduardo Souza Silva.

Florianópolis

2022

## RESUMO

A artrite é uma doença inflamatória crônica que acomete as articulações e está associada à degeneração da cartilagem, meniscos, esclerose subcondral e inflamação sinovial. Apresenta como sintomas dor, inchaço, rigidez e em estágios avançados deformidades e perda de mobilidade. O tratamento de primeira escolha é baseado no uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) como o diclofenaco. Entretanto, o uso prolongado desses medicamentos causa importantes efeitos adversos gástricos, renais e cardiovasculares, diminuindo a adesão ao tratamento. O presente estudo avaliou os efeitos anti-inflamatórios do diclofenaco nanoencapsulado (nanopartículas lipídicas sólidas – NLS, nanoemulsões – NE) associado a iontoforese pela via transdérmica na morfologia da cartilagem articular e membrana sinovial, tecido ósseo de fêmur e tíbia de ratos submetidos a um modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). Para tanto, 45 ratos fêmeas foram randomizadas em grupos. Os animais dos grupos lesão foram submetidos a duas inoculações de CFA (50 µL, 5 mg/mL), sendo a primeira na base da cauda e a segunda no joelho direito. Dentre esses, os animais dos grupos controle foram submetidos à administração transdérmica, no joelho direito, de NLS e NE brancas associada ou não à iontoforese, ou apenas o CFA. Já os animais dos grupos que receberam diclofenaco, foram tratados pela via transdérmica e divididos nos grupos NLS DF e NE DF com ou sem associação à iontoforese, enquanto o grupo diclofenaco livre foi tratado pela via endovenosa. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e os joelhos processados para análise morfológica. Os grupos tratados com diclofenaco livre, NLS DF com ou sem iontoforese, NE DF com ou sem iontoforese apresentaram aspectos semelhantes ao grupo *naive*. Nos grupos CFA isolado, NLS e NE brancas com iontoforese, foi observado mais sinovite, com remodelação óssea e infiltração de células inflamatórias. O modelo experimental foi eficiente em simular os eventos inflamatórios da artrite, e o tratamento com diclofenaco nanoencapsulado apresentou efeitos benéficos sobre a morfologia dos tecidos periarticulares e da membrana sinovial.

**Palavras-chave:** artrite, inflamação, anti-inflamatório, diclofenaco, iontoforese, análise morfológica.

## ABSTRACT

Arthritis is a chronic inflammatory disease that affects the joints and is associated with degeneration of cartilage, menisci, subchondral sclerosis and synovial inflammation. Symptoms include pain, swelling, stiffness and, in advanced stages, deformities and loss of mobility. First-line treatment is based on the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as diclofenac. However, the prolonged use of these drugs causes important gastric, renal and cardiovascular adverse effects, reducing adherence to treatment. The present study evaluated the anti-inflammatory effects of nanoencapsulated diclofenac (solid lipid nanoparticles - NLS, nanoemulsions - NE) associated with transdermal iontophoresis on the morphology of articular cartilage and synovial membrane, femur and tibia bone tissue of rats submitted to a model of arthritis induced by complete Freund's adjuvant (CFA). For that, 45 female rats were randomized into groups. The animals in the lesion groups were submitted to two inoculations of CFA (50  $\mu$ L, 5 mg/mL), the first at the base of the tail and the second at the right knee. The animals in the control groups were submitted to transdermal administration, in the right knee, of white NLS and NE associated or not with iontophoresis, or only CFA. The animals in the groups that received diclofenac were treated transdermally and divided into groups NLS DF and NE DF with or without association with iontophoresis, while the free diclofenac group was treated intravenously. After the experimental period, the animals were euthanized and the knees processed for morphological analysis. The groups treated with free diclofenac, NLS DF with or without iontophoresis, NE DF with or without iontophoresis presented similar aspects to the naive group. In the isolated CFA, NLS and white NE groups with iontophoresis, more synovitis was observed, with bone remodeling and infiltration of inflammatory cells. The experimental model was efficient in simulating the inflammatory events of arthritis, and the treatment with nanoencapsulated diclofenac had beneficial effects on the morphology of periarticular tissues and synovial membrane.

**Keywords:** arthritis, inflammation, anti-inflammatory, diclofenac, iontophoresis, morphological analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1 – Esquema do protocolo experimental do modelo de artrite induzida por CFA.**<sup>18</sup>

**Figura 2 – Gráficos das Análises de Espessura da Cartilagem e Contagem de Condrócitos de Fêmur e Tíbia.**<sup>27</sup>

**Figura 3 – Fotomicrografias do Fêmur dos Grupos Naive, CFA e DF Livre.**<sup>28</sup>

**Figura 4 – Fotomicrografias da Tíbia dos Grupos Naive, CFA e DF Livre.**<sup>29</sup>

**Figura 5 – Fotomicrografias do Fêmur dos Grupos Naive, NLS B (I) e NLS DF (P), NLS DF (I).**<sup>30</sup>

**Figura 6 – Fotomicrografias da Tíbia dos Grupos Naive, NLS B (I) e NLS DF (P), NLS DF (I).**<sup>31</sup>

**Figura 7 – Fotomicrografias de Fêmur nos Grupos Naive, NE B (I), NE DF (P), NE DF (I).**<sup>32</sup>

**Figura 8 – Fotomicrografias da Tíbia nos Grupos Naive, NE B (I), NE DF (P), NE DF (I).**<sup>33</sup>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(I) – Com iontoforese (tratamento).

(P) – Sem iontoforese (tratamento).

µg – Micrograma.

µL – Microlitro.

µm – Micrômetro.

3D – Três dimensões.

A/O – Água em óleo (emulsão).

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais.

B – Branca (formulações sem moléculas ativas).

CCS – Centro de Ciências da Saúde (UFSC).

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais (UFSC).

CFA – Adjuvante completo de Freund (sigla em inglês).

cm – Centímetros.

COX – Cicloxigenase (enzima).

DF – Diclofenaco.

HE – Hematoxilina-Eosina (coloração histológica).

i. a. – Intra-articular.

i. v. – Intravenoso.

kg – Quilograma.

LAMEB – Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (UFSC).

mA – Miliampère.

mg – Miligrama.

min - Minuto

mL – Mililitro.

NE – Nanoemulsão.

NLS – Nanopartículas Lipídicas Sólidas

nm – Nanômetros.

O/A – Óleo em água (emulsão).

TCA – Ácido tricloroacético (sigla em inglês).

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2 HIPÓTESE DO ESTUDO</b>	<b>15</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	<b>16</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	<b>16</b>
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Animais</b>	<b>17</b>
<b>4.2 Modelo Experimental de Artrite Induzida por CFA em Ratos</b>	<b>17</b>
<b>4.3 Protocolo de Análise e Tratamento com NLS ou NE</b>	<b>18</b>
<i>4.3.1 Preparo das Nanoformulações Contendo Diclofenaco</i>	18
<i>4.3.2 Iontoforese</i>	19
<i>4.3.3 Preparação e Coloração da Articulação de Joelho para Análise Morfológica</i>	19
<i>4.3.4 Análise Morfológica</i>	20
<i>4.3.5 Análise Qualitativa por Escore Numérico</i>	21
<b>4.4 Análise Estatística</b>	<b>22</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
<b>5.1 Análise da Espessura da Cartilagem de Fêmur e Tíbia em Animais Submetidos ao Tratamento com Diclofenaco na Artrite Induzida por CFA</b>	<b>23</b>
<b>5.2 Análise da Contagem de Condrócitos na Cartilagem de Fêmur e Tíbia em Animais Submetidos ao Tratamento com Diclofenaco na Artrite Induzida por CFA</b>	<b>24</b>
<b>5.3 Escore Qualitativo da Membrana Sinovial de Fêmur e Tíbia em Animais Submetidos ao Tratamento com Diclofenaco na Artrite Induzida por CFA</b>	<b>24</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>38</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As patologias que envolvem a inflamação das articulações compreendem mais de 100 doenças e síndromes progressivas, sendo as mais comuns a artrite reumatoide e a osteoartrite. A artrite é caracterizada como uma doença crônica que agride as articulações e está associada à degeneração da cartilagem articular, meniscos, esclerose subcondral e inflamação sinovial. Apresenta como sintomas dor, inchaço, rigidez, e, em estágios avançados ocorrem deformidades e perda da mobilidade articular e, por consequência, incapacidade para a realização das atividades diárias (ABHISHEK; DOHERTY, 2013). A artrite provoca danos em 10% da população mundial e dois terços destas pessoas são adultos em idade produtiva entre 18 e 64 anos (CDC, 2017). Estima-se que o número de indivíduos com artrite aumentará quase 40% até 2040 devido ao aumento da expectativa de vida, o envelhecimento da população e o crescimento da obesidade. Dessa forma, tornando-se um problema de saúde pública, envolvendo gastos elevados com tratamentos e procedimentos cirúrgicos (FUSCO *et al.*, 2017).

As principais características da artrite incluem degradação da cartilagem articular, formação de osteófitos, degeneração meniscal, esclerose óssea subcondral, lesões da medula óssea e inflamação sinovial (MONEMDJOU; FAHMI; MOHIT, 2010).

A sinóvia é uma membrana vascularizada que reveste a cápsula articular e circunda os componentes que não possuem cartilagem e fazem parte das articulações. É formada por duas camadas finas de células especializadas chamadas de sinoviócitos. A camada de revestimento adjacente à articulação é chamada de íntima, enquanto a segunda camada é chamada de subíntima. A porção externa da íntima se junta à cápsula fibrosa da articulação. Existem dois tipos de sinoviócitos, do tipo A, que são células análogas aos macrófagos e os do tipo B, que são fibroblastos sinoviais. As células do tipo A são responsáveis pela eliminação do excesso de material e patógenos da articulação, produção e secreção de enzimas, citocinas e quimiocinas que contribuem para a inflamação e a consequente degeneração da cartilagem (MONEMDJOU; FAHMI; MOHIT, 2010).

A inflamação da sinóvia é resultado da síntese e liberação de inúmeras citocinas e mediadores pró-inflamatórios, conhecida como sinovite. A inflamação sinovial costuma ser localizada e pode ser assintomática. A sinóvia inflamada pode

produzir proteases e citocinas, que contribuem para a progressão da doença. (MONEMDJOU; FAHMI; MOHIT, 2010). Na sinovite ocorre a infiltração de leucócitos no líquido sinovial. A migração celular ocorre pela ativação endotelial em microvasos sinoviais, que eleva a expressão de moléculas de adesão, que incluem integrinas, selectinas, algumas imunoglobulinas e quimiocinas (MCINNES; SCHETT, 2011). São características da sinovite a neoangiogênese, induzida por condições de hipóxia locais e citocinas, e a linfangiogênese insuficiente. Essas alterações junto com a reorganização da arquitetura sinovial e a ativação local de fibroblastos, permitem o acúmulo de células inflamatórias no tecido sinovial na artrite. Deste modo, além do comprometimento da membrana sinovial, as áreas adjacentes (ex.: cartilagem e ossos) são afetados e danificados, o que contribui para a amplificação da inflamação sobre o tecido articular com desenvolvimento gradual de *pannus* e dor articular (MCINNES; SCHETT, 2011).

O tratamento de primeira escolha para a dor na artrite é baseado no uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Os AINEs agem inibindo a atividade da enzima ciclooxigenase (COX) resultando na diminuição da formação dos precursores de prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico (WHALEN; FINKEL; PANAVELIL, 2016). A inibição da isoenzima COX-2 é responsável pela atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética desses fármacos enquanto a inibição da COX-1 está relacionada aos efeitos indesejáveis sobre a mucosa gastrointestinal e agregação plaquetária (RANG; DALE, 2016).

Estudos realizados em pacientes com artrite mostram que o diclofenaco, atua promovendo o alívio da dor, do edema e do enrijecimento articular e restabelece a capacidade funcional (MINISOLA *et al.*, 1990; HOLLINGWORTH, 1993). Além disso, reduz de maneira rápida e duradoura a dor nas articulações (BROGDEN *et al.*, 1980; SMALL, 1989; CASE *et al.*, 2003).

Os AINEs, incluindo o diclofenaco, podem modular o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares ou mononucleares na sinóvia inflamada (PARNHAM, 1999). No modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund, em ratos, o diclofenaco reduz a concentração de células polimorfonucleares no fluído sinovial sem alterar a concentração de mononucleares (LOPEZ-ARMANDA *et al.*, 2002), sugerindo que os AINEs podem ter efeitos diferenciados na migração de polimorfonucleares e

mononucleares para a articulação. Além disso, estudo em pacientes com espondilite anquilosante mostrou que os AINEs foram capazes de prevenir a progressão dos danos estruturais ocasionados pela doença (LIU *et al.*, 2004). O estudo de Bressan (2005) mostrou que, além do efeito antinociceptivo e antiedematogênico, o diclofenaco foi capaz de reduzir a migração de células mononucleares para o fluido sinovial, ressaltando a possível eficácia deste fármaco na redução dos danos articulares gerados pela inflamação mediada principalmente pela migração de mononucleares. Entretanto, a inibição da infiltração de leucócitos pelo diclofenaco ocorreu com doses maiores que as necessárias para a inibição local de prostaglandinas (BRESSAN, 2005).

O uso destes fármacos por períodos prolongados aumenta a probabilidade de desenvolvimento de efeitos adversos sistêmicos gástricos, renais e cardiovasculares (THONE *et al.*, 2017), interferindo, dessa forma, na adesão do paciente à terapêutica e trazendo prejuízos à sua qualidade de vida (WHALEN; FINKEL; PANAVELIL, 2016). Dessa forma, a associação do fármaco a um sistema de liberação que permita a alteração de suas propriedades biofarmacêuticas, sem alterar seu mecanismo de ação torna-se interessante. O desenvolvimento de novos sistemas de liberação (do inglês, *New Drug Delivery Systems*) de fármacos tem contribuído para controlar a velocidade de liberação destes no organismo, modulando de forma que atinjam o alvo farmacológico desejado, melhorando a eficácia, reduzindo a dose terapêutica e os seus efeitos adversos. Dentre eles, estão incluídos os sistemas utilizando nanocarreadores de fármacos (DEMINA; SKATKOV, 2013; LÜHDER; REICHARDT, 2017).

As nanoemulsões (NE) são dispersões coloidais compostas por dois líquidos imiscíveis, em que um líquido é disperso no outro através do auxílio de um surfactante, co-surfactante ou misturas de surfactantes e/ou co-surfactantes. Podem formar emulsões do tipo água em óleo (A/O) e do tipo óleo em água (O/A) e geram gotículas de tamanho entre 20-200 nm, que possibilitam a administração de medicamentos de modo controlado e localizado. Possuem boa estabilidade, baixo custo, sua produção é relativamente simples e de fácil reprodutibilidade, não requer o uso de tecnologia avançada. Além disso, as propriedades dos componentes que formam as NE possuem efeitos antimicrobianos e antivirais evitando a necessidade do uso de conservantes nas formulações (SHAKER *et al.*, 2019).

As NE permitem um tratamento não invasivo através da via cutânea, possuem capacidade de carrear diferentes fármacos que são intensamente metabolizados pela via hepática, ou apresentam variados efeitos indesejáveis quando utilizados por via oral (SHAKER *et al.*, 2019).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidas no início dos anos 1990 como alternativa a outros sistemas de fármacos como as emulsões, lipossomas e as nanopartículas poliméricas. Possuem forma esférica, com um diâmetro entre 50 e 500 nm dispersas em meio aquoso e formam um sistema coloidal (com uma proporção de água de 70-95%) que permitem a administração de medicamentos de maneira controlada e localizada. As NLS podem ser produzidas simplesmente pela substituição do lipídio líquido das emulsões, por um lipídio sólido, o que significa que são sólidas à temperatura ambiente e na temperatura corporal. Na sua produção se somam as vantagens das partículas sólidas com as das emulsões e dos lipossomas. As vantagens da utilização de nanopartículas lipídicas sólidas como vetores incluem: a utilização de lipídios fisiológicos em sua formulação, a ausência de solventes orgânicos em sua preparação e a possibilidade de serem utilizadas num amplo espectro para administração através da via cutânea, oral ou intravenosa mediante as formas convencionais como pomadas, comprimidos, cápsulas, suspensões ou soluções injetáveis (GARZÓN; FERNÁNDEZ, 2009).

As NLS protegem os fármacos susceptíveis à degradação pela influência de agentes externos como a água e luz, apresentam uma melhor biodisponibilidade e podem ser desenhadas para alcançarem perfis de liberação prolongada de substâncias ativas pouco solúveis em água ao incorporá-las na matriz lipídica sólida. Entre as desvantagens, encontram-se o possível crescimento das partículas durante seu armazenamento, a tendência de gelificação, a existência de mudanças inesperadas em suas transições polimórficas e sua inerente capacidade limitada na incorporação de fármacos pela estrutura cristalina do lipídio sólido (GARZÓN; FERNÁNDEZ, 2009).

Diferentes mecanismos têm sido propostos para explicar os benefícios dos nanocarreadores para a liberação de fármacos através da pele. Quando aplicadas topicamente, o elevado potencial de aumento da solubilidade de fármacos tende a aumentar a atividade termodinâmica em direção à pele. Além disso, os constituintes

dos nanocarreadores, tais como os surfactantes, agem como promotores de permeação, aumentando o fluxo de fármacos através da pele (BARAKAT *et al.*, 2011). O tamanho reduzido das partículas também permite o estreito contato com as junções entre os queratinócitos, favorecendo o acúmulo das mesmas e sustentação da liberação do agente ativo (SANNA *et al.*, 2007). Finalmente, o efeito oclusivo proporcionado pelo filme lipídico hidrata a camada córnea e favorece a absorção cutânea, porém nem sempre ocorre a permeação desejada, necessitando de um promotor de permeação, para que o fármaco alcance a circulação sistêmica e tenha o efeito esperado. (MULLER *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2007).

Com o intuito de aumentar a permeação cutânea e a biodisponibilidade do fármaco no alvo terapêutico, a associação de nanocarreadores de fármacos com a iontoforese tem sido proposta. A iontoforese é um método físico seguro, não invasivo, com capacidade de proporcionar a permeação de moléculas pela pele por meio da aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade, não superior a 0,5 mA/cm<sup>2</sup>, que ultrapassa uma solução eletrolítica e carrega consigo as moléculas para dentro da pele, possibilitando uma maior permeação do fármaco desejado (GRATIERI *et al.*, 2008; DEMINA; SKATKOV, 2013; LÜHDER; REICHARDT, 2017). Assim como em outras técnicas para permeação de fármacos, a iontoforese também evita o efeito de primeira passagem no fígado e a possível degradação do fármaco no estômago. A técnica é capaz de promover a liberação do fármaco mais rapidamente e diretamente nos tecidos que os sistemas passivos de liberação tópica e transdérmica (GRATIERI *et al.*, 2008; DEMINA; SKATKOV, 2013; LÜHDER; REICHARDT, 2017).

Para mimetizar a artrite em humanos, é indispensável o uso de modelos experimentais em animais. O modelo de artrite utilizando o Adjuvante Completo de Freund (CFA) foi descrito pela primeira vez por Pearson em 1956 (GOMES *et al.*, 2014) e reproduz em animais os sinais inflamatórios da doença em humanos como edema articular, hipersensibilidade, infiltração celular, e alterações histopatológicas (GOMES *et al.*, 2014). O CFA é composto por parafina em óleo contendo mono-oleato de manitol, que atua como surfactante e micobactéria atenuada (*Mycobacterium tuberculosis*) (BILLIAU; MATTHYS, 2001). A indução da doença nos animais ocorre devido ao óleo, componente principal do adjuvante, e pela presença do peptidoglicano presente na parede celular das micobactérias. Alguns estudos

mostram que os ratos da linhagem *Wistar* desenvolvem com maior capacidade os sinais de artrite, manifestada por uma maior gravidade do caso (BANIK; KASAI; MIZUMURA, 2002; WHITEHOUSE, 2007). Segundo Gomes *et al.* (2013), as respostas geradas após a utilização do CFA incluem a presença de edema articular, recrutamento de células inflamatórias, assim como sensibilidade aumentada no membro afetado, gerando alodinia mecânica (WHITEHOUSE, 2007). A administração do CFA em conjunto com o *M. tuberculosis* é capaz de causar hiperalgesia por 14 dias e edema articular ao longo de 90 dias (WILSON *et al.*, 2006).

A morfologia dos tecidos articulares após o tratamento transdérmico com diclofenaco, em modelo de artrite, permanece incerta. Desta forma, o presente trabalho pretende explorar os efeitos do tratamento com nanocarreadores contendo diclofenaco associado a iontoforese no dano tecidual periarticular em modelo animal de artrite induzida por CFA.

## **2 HIPÓTESE DO ESTUDO**

O tratamento com nanopartículas contendo diclofenaco associado a iontoforese aplicado pela via transdérmica demonstre redução dos danos causados pelo CFA nas alterações morfológicas dos tecidos como a membrana sinovial, cartilagem e osso subcondral em animais com artrite experimental.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com diclofenaco nanoencapsulado associado a iontoforese administrado pela via transdérmica na progressão da lesão dos tecidos periarticulares no modelo de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) em ratos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Análise da morfologia e espessura da cartilagem do joelho de ratos em modelo de artrite induzida por CFA após tratamento com diclofenaco nanoencapsulado administrado pela via transdérmica;
- Avaliação do efeito do tratamento com diclofenaco nanoencapsulado administrado pela via transdérmica na lesão tecidual na articulação de ratos em modelo de artrite induzida por CFA;
- Avaliação do efeito da iontoforese associada ao diclofenaco nanoencapsulado administrado pela via transdérmica na lesão tecidual na articulação de ratos em modelo de artrite induzida por CFA.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Foram utilizados 45 ratos fêmeas *Wistar* com peso médio de 200 g provenientes do Biotério Central mantidas em caixas plásticas de polipropileno em condições de temperatura controlada de  $20 \pm 2$  °C, período de claro/escuro de 12 horas e acesso à água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), nº 1914250220, e os experimentos foram conduzidos de acordo com o regimento ético da Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP, 1983).

Os animais foram randomizados e divididos igualmente nos seguintes grupos:

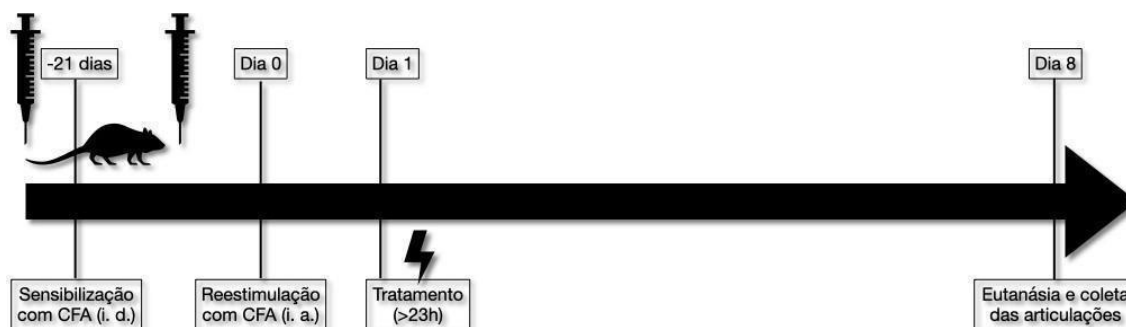
- **Grupo I:** Animais com artrite induzida por CFA (i. a.) 50 µL contendo 5 mg/mL;
- **Grupo II:** Animais sem intervenção (*naive*);
- **Grupo III:** Animais com artrite induzida por CFA submetidos a aplicação de Gel contendo NLS ou NE sem o diclofenaco, associado a iontoforese pela via transdérmica;
- **Grupo IV:** Animais com artrite induzida por CFA submetidos ao tratamento com diclofenaco (i. v.) 25 µg/kg;
- **Grupo V:** Animais com artrite induzida por CFA submetidos ao tratamento com NLS ou NE contendo diclofenaco sem aplicação de iontoforese pela via tópica;
- **Grupo VI:** Animais com artrite induzida por CFA submetidos ao tratamento com NLS ou NE contendo diclofenaco associado a iontoforese pela via transdérmica.

### 4.2 Modelo Experimental de Artrite Induzida por CFA em Ratos

A inflamação articular foi induzida de acordo com o protocolo descrito por Gomes *et al.* (2014), com algumas adaptações (Figura 1). Os animais foram pré-sensibilizados por uma injeção intradérmica (i. d.) de 50 µL de CFA (0,5 mg/mL, *M. tuberculosis* - Difco™, Alemanha), na base da cauda (1 cm, subcutaneamente) por meio de uma seringa de 1 mL e agulha de 13 x 4,5 mm (BD Plastipak™). Após 21 dias do primeiro estímulo inflamatório, foi aplicada uma injeção intra-articular (i. a.) de 50 µL de CFA (5 mg/mL, 250 µg/joelho) na articulação tibiofemoral. As áreas

que receberam as injeções foram previamente depiladas e a assepsia foi realizada com uma solução de álcool iodado (1%). O tratamento foi realizado 23 horas após a reestimulação com CFA.

**Figura 1 – Esquema do protocolo experimental do modelo de artrite induzida por CFA.**



Fonte: Autora.

### 4.3 Protocolo de Análise e Tratamento com NLS ou NE

#### 4.3.1 Preparo das Nanoformulações Contendo Diclofenaco

As NLS e NE foram desenvolvidas previamente em colaboração com o Laboratório de Farmacotécnica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (CCS/UFSC). As NLS contendo diclofenaco foram preparadas utilizando-se a técnica de homogeneização a quente. Em suma, o componente lipídico, constituído de lecitina e tripalmitina, foi disperso em uma solução aquosa quente de Pluronic™ F-68 (Gibco™), um surfactante não iônico, que foi subsequentemente homogeneizada por sonicação e resfriada à temperatura ambiente (ver FARIA *et al.*, 2009).

As NE contendo diclofenaco, por sua vez, foram preparadas utilizando-se a técnica de emulsificação espontânea. Em suma, foi realizada a adição gradual de água em uma solução contendo surfactante em óleo, com agitação suave em temperatura constante. (ver A DATE; DESAI; DIXIT; NAGARSENKER, 2010).

#### 4.3.2 Iontoforese

Após 23 horas da injeção de CFA (i. a.), realizou-se a aplicação pela via tópica dos tratamentos de NLS (413,82 µg/mL) e NE (783,4 µg/mL) diclofenaco, associado ou não à iontoforese, e dos controles na articulação tibiofemoral dos animais.

Na iontoforese, os eletrodos (negativo e positivo) foram fixados nos lados medial e lateral da articulação do joelho dos animais e conectados ao dispositivo gerador de corrente elétrica constante. O cátodo foi constituído por uma cápsula cilíndrica em polietileno de 0,49 ml (0,79 cm de diâmetro e 1,0 cm de comprimento). Um lado deste tubo foi fechado pelo eletrodo de prata e conectado ao polo negativo do gerador; depois de ser preenchido com gel de natrosol 2% contendo as nanopartículas com diclofenaco, o lado aberto do tubo foi colocado em contato com o lado medial da articulação do joelho. O anodo, constituído pelo eletrodo com ponta em algodão conectado ao polo positivo do gerador e saturado com solução salina fisiológica, foi colocado na lateral da articulação do joelho. Durante a aplicação da iontoforese, os animais estavam sob anestesia inalatória com isoflurano (2%) e restringidos em decúbito dorsal por meio de tiras de borracha aplicadas a cada membro.

Foi estabelecido para o protocolo de administração das nanopartículas pela via iontoforética, a aplicação de uma densidade de corrente total aplicada sobre a pele dos animais de 3,95 mA.min. O protocolo de aplicação de iontoforese foi de 10 min e após o término os animais se recuperaram completamente da anestesia dentro de 15 minutos. A densidade de corrente no parâmetro estabelecido para o estudo é conhecida por ser tolerado por pacientes e animais sem sinais de danos à pele (ver MOTTA *et al.*, 2003).

Após os procedimentos, os animais foram eutanasiados com cetamina e xilazina, 40 mg/kg e 200 mg/kg respectivamente, e as articulações foram coletadas para análise morfológica.

#### 4.3.3 Preparação e Coloração da Articulação de Joelho para Análise Morfológica

Utilizando a metodologia de forma adaptada descrita por Liu *et al.* (2018), após os animais terem sido eutanasiados, foi realizada a retirada do joelho direito

seccionando o fêmur e a tíbia próximos à articulação. Os músculos foram dissecados, deixando apenas o osso e a articulação. A fixação foi realizada em formol 10% por 48 horas e realizada lavagem em água corrente por 24 horas. Após a lavagem a articulação foi colocada em álcool 70% por no máximo 48 horas. Novamente foi realizada a lavagem do material por 24h em água corrente. Subsequentemente, foi realizada a descalcificação dos ossos em ácido tricloroacético 5% (TCA), que foi trocado a cada 5-7 dias até completa descalcificação. Após a descalcificação, as amostras foram desidratadas por imersão em uma série de álcoois em concentrações crescentes (80%, 90%, 95% e 100%). Então, foi realizada a inclusão das amostras em parafina.

As amostras de tecidos foram embebidas em parafina histológica derretida para montagem dos blocos de corte. Após 24 horas do emblocamento foi possível cortar os blocos com auxílio de um micrótomo. Os cortes foram realizados em plano sagital com 7 µm de espessura e transferidos para lâminas de vidro. Subsequentemente, foi realizada a coloração das lâminas com hematoxilina-eosina (HE) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC) de forma automatizada. Após serem coradas as lâminas foram colocadas em capela para total evaporação dos reagentes. Posteriormente foi acrescentado 1 gota de Entellan<sup>®</sup> (Merck) em cada lâmina e adicionado a lamínula, em seguida as lâminas foram colocadas em estufa para fixação da amostra. Após a fixação da amostra, foi realizada as avaliações morfológicas dos cortes.

#### *4.3.4 Análise Morfológica*

As avaliações morfológicas das lâminas contendo os cortes histológicos corados foram realizadas primeiramente com o auxílio de microscópio óptico (*Olympus BX41*, LAMEB), onde foram observadas as imagens em campo claro e realizadas as fotomicrografias em aumento de 40x. Após, as imagens foram analisadas utilizando o programa *ImageJ* (NIH, EUA) (ver RASBAND, 2018), que foi calibrado através de uma câmara de Neubauer, utilizando como parâmetro a medida de 1 mm (1000 µm). A escala obtida após a calibração foi de 1,4132 pixels/µm, e cada fotomicrografia possuía 1009,188 µm.

Em todos os grupos experimentais foi analisado as características da membrana sinovial e três pontos padronizados para cartilagem e contagem de condrócitos no fêmur e tíbia. P1 (região anterior da cartilagem articular próximo à região da patela), P2 (ponto médio da cartilagem entre anterior e posterior) e P3 (região posterior da cartilagem próxima à fossa poplíteia). Cada região foi avaliada conforme a espessura de cartilagem total, espessura da cartilagem da zona superficial, espessura da cartilagem da zona profunda e contagem de condrócitos. Os resultados das avaliações histomorfométricas para a cartilagem e contagem de condrócitos foram obtidos a partir da análise média de 3 pontos separados em cada fotomicrografia. Para tanto, foi encontrado o ponto médio (504,594  $\mu\text{m}$ ) da imagem e outros dois pontos distantes a 252,297  $\mu\text{m}$  anterior e posterior ao ponto médio. A média das medidas em P1, P2 e P3 foram utilizadas para a avaliação dos resultados nas articulações.

A avaliação do número de condrócitos foi realizada nas mesmas imagens e pontos, utilizando padronização de 300 por 300  $\mu\text{m}$  (90000  $\mu\text{m}^2$ ) entre a zona superficial e profunda para contagem das células. A contagem de condrócitos seguiu a mesma metodologia e foi realizada manualmente nos pontos mencionados, entre a zona superficial e profunda, pois o programa não foi capaz de diferenciar condrócitos de outras células presentes enquanto as medidas de cartilagem foram calculadas de forma automática pelo programa *ImageJ*. Nenhuma fotomicrografia passou por ajustes de melhoria pelo programa *ImageJ*, o programa foi utilizado apenas para as mensurações e confecções dos painéis das fotomicrografias.

#### 4.3.5 Análise Qualitativa por Escore Numérico

Na análise qualitativa foi utilizado o modelo adaptado de pontuação histopatológica desenvolvido por Aiman *et al.* (2020). Em cada imagem foi analisado os danos na membrana sinovial, cartilagem e ossos (destruição óssea e/ou invaginação do osso subcondral). Além disso, também foi avaliado o grau de infiltrado inflamatório no espaço articular. A escala do escore variou de 0 a 3 pontos de acordo com o grau de lesão [0 - animais sem anormalidades detectáveis; 1 - discreto infiltrado de células inflamatórias no espaço articular, discreta erosão da cartilagem e espessamento da membrana sinovial, discreto dano a estrutura óssea; 2 - moderado infiltrado de células inflamatórias no espaço articular, moderada erosão da cartilagem

e espessamento da membrana sinovial, moderado dano a estrutura óssea; 3 - intenso infiltrado de células inflamatórias no espaço articular, intenso processo de fibrose da cartilagem e membrana sinovial, e intenso dano a estrutura óssea].

#### **4.4 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e o intervalo de confiança foi de 95%. Foi aplicado o teste U de Mann-Whitney, onde foi considerado o nível de significância  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de espessura da cartilagem e contagem de condrócitos foram apresentados em forma de gráficos, onde a análise estatística utilizada assumiu intervalo de confiança de 95%, e os resultados foram expressos em média± desvio padrão dos valores de P1, P2 e P3. Além disso, foram confeccionados painéis das fotomicrografias para análise qualitativa entre os grupos através de um score de pontuação, os animais do grupo lesão e tratados com diclofenaco foram comparados levando em consideração a morfologia normal da cartilagem, membrana sinovial e estrutura óssea de fêmur e tíbia do grupo *naive*, foi utilizado uma escala com score numérico já descrito na metodologia, para classificar os graus de lesão e facilitar o entendimento.

### 5.1 Análise da Espessura da Cartilagem de Fêmur e Tíbia em Animais Submetidos ao Tratamento com Diclofenaco na Artrite Induzida por CFA

A Figura 2 apresenta os resultados de fêmur e tíbia da espessura da cartilagem total, zona superficial, zona profunda e contagem de condrócitos dos animais submetidos a diferentes tratamentos com ou sem diclofenaco de sódio.

A artrite induzida por CFA (5 mg/mL, 250 µg/joelho) reduziu a espessura total da cartilagem no fêmur de forma significativa comparado aos animais *naive* (sem artrite) e tratados com diclofenaco livre (25 µg/kg, i. v.) ( $p < 0,01$ ). Além disso, o tratamento com diclofenaco livre (25 µg/kg, i. v.) preveniu a ocorrência das mudanças nos aspectos morfológicos da articulação induzidas pela administração do CFA, mantendo a espessura da cartilagem próximo ao padrão de normalidade, uma vez que não apresentou diferença em relação aos animais *naive* (sem artrite). Já em tíbia, não foi observado diferença significativa entre os grupos analisados. Nenhum dos tratamentos das formulações de NE e NLS com diclofenaco tiveram efeitos na espessura total da cartilagem tanto em fêmur quanto em tíbia. Na espessura da zona superficial, nenhum dos tratamentos com diclofenaco teve efeito na prevenção dos danos causados pelo CFA em fêmur e tíbia. No entanto, na espessura da zona profunda o tratamento com diclofenaco livre previne os danos causados pelo CFA ( $p < 0,05$ ), além disso, a espessura da cartilagem do grupo diclofenaco livre foi

semelhante ao grupo *naive* (sem artrite). Os tratamentos com diclofenaco nas duas formulações NE e NLS não demonstraram efeito. Em tibia, nenhum dos tratamentos demonstrou efeito.

## **5.2 Análise da Contagem de Condrócitos na Cartilagem de Fêmur e Tibia em Animais Submetidos ao Tratamento com Diclofenaco na Artrite Induzida por CFA**

Na análise da contagem de condrócitos, a artrite induzida por CFA reduziu o número de condrócitos de forma significativa comparado aos grupos *naive* (sem artrite) e diclofenaco livre ( $p < 0,01$ ) tanto em fêmur quanto em tibia. Em fêmur o tratamento com NLS DF (I) (413,82  $\mu\text{g/mL}$  ou 202,7  $\mu\text{g}$  em 0,49 mL; densidade da corrente de iontoforese: 3,95 mA/min) apresentou resultado significativo em relação ao controle que não possui diclofenaco NLS B (I) (mesma densidade de corrente) ( $p < 0,01$ ), sendo observado número de condrócitos superior no grupo tratado com NLS DF (I). Já em tibia, não houve diferença no tratamento.

No tratamento com NE, em fêmur, NE DF (I) (783,4  $\mu\text{g/mL}$  ou 384  $\mu\text{g}$  em 0,49 mL; densidade da corrente de iontoforese: 3,95 mA/min) foi observado maior número de condrócitos quando comparado ao controle NE B (I) (mesma densidade de corrente) que não possui diclofenaco ( $p < 0,01$ ). Além disso, o número de condrócitos também foi superior em relação ao tratamento com NE DF (P) sem iontoforese ( $p < 0,05$ ), sugerindo que a iontoforese traz maiores benefícios na prevenção das características normais da cartilagem. Em tibia, o tratamento com as NLS não demonstrou efeito em relação ao número de condrócitos, mas o tratamento com NE DF (I) contendo diclofenaco apresentou resultado significativo e maior número de condrócitos quando comparado ao controle NE B (I) sem diclofenaco ( $p < 0,05$ ).

## **5.3 Escore Qualitativo da Membrana Sinovial de Fêmur e Tibia em Animais Submetidos ao Tratamento com Diclofenaco na Artrite Induzida por CFA**

Nos resultados das análises qualitativas por escore das fotomicrografias em fêmur e tibia, foi atribuído score 0 no grupo *naive* (sem artrite) na membrana sinovial



e pontos analisados para todos os tratamentos e comparações. O grupo *naive* foi o parâmetro de comparação das características normais do tecido.

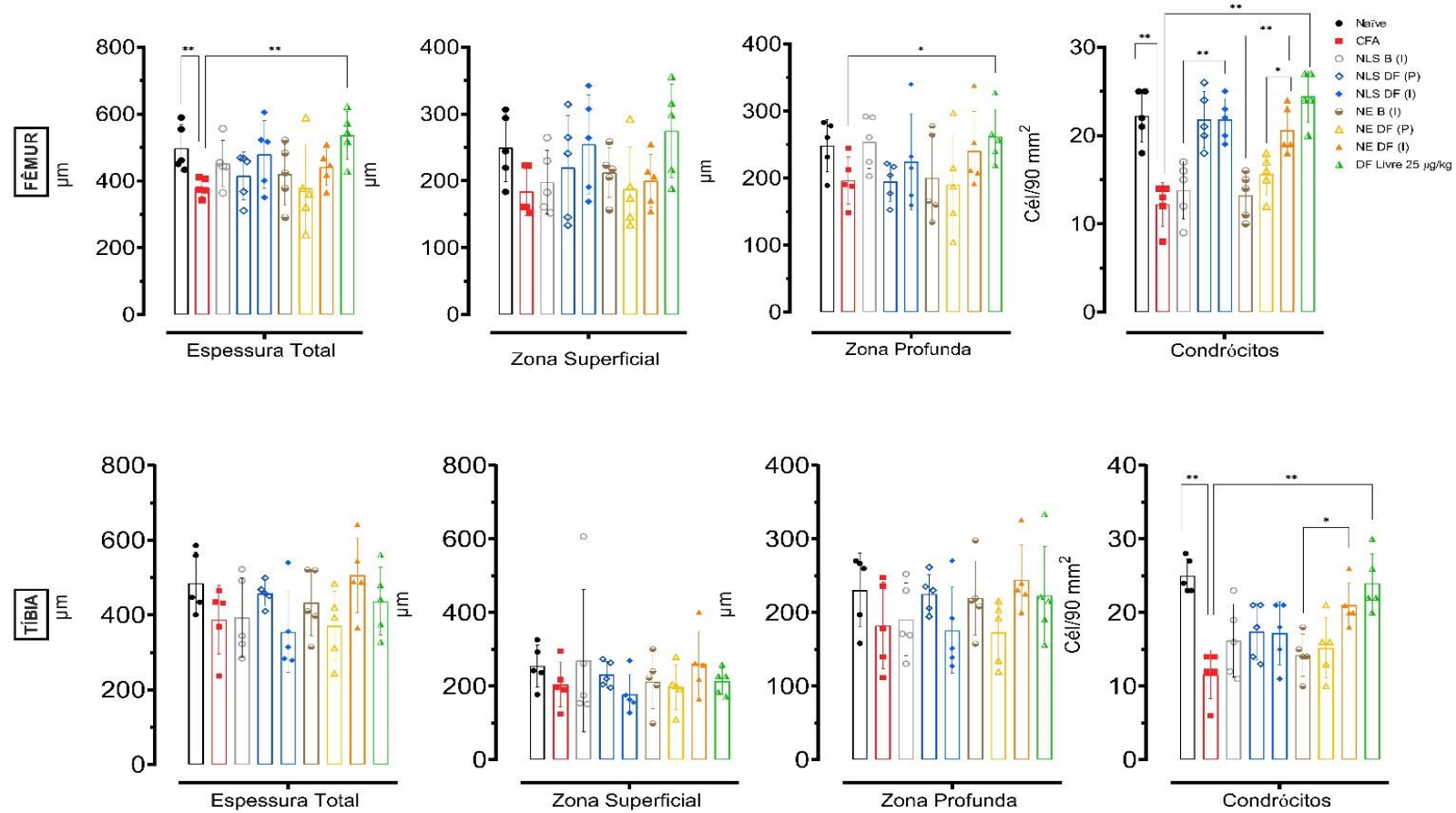
As Figuras 3 e 4 apresentam os resultados do tratamento com diclofenaco livre (25 µg/kg, i. v.) comparados ao CFA (animais com artrite, 50 µL, 5 mg/mL, i. a.) em fêmur e tíbia respectivamente. Na Figura 3, o grupo diclofenaco Livre (25 µg/kg, i. v.) apresentou score 1 na membrana sinovial nos pontos P1 e P2, e score 3 no ponto P3. Já o grupo CFA, apresentou escore 3 na membrana sinovial nos pontos P2 e P3 e score 2 no ponto P1. Este resultado sugere que o tratamento com diclofenaco em fêmur, foi superior em prevenir parte dos danos causados pelo CFA na membrana sinovial e nos pontos P1 e P2. Já na Figura 4, em tíbia, o grupo diclofenaco livre apresentou escore 1 na membrana sinovial e nos pontos analisados, e o grupo CFA escore 3 na membrana sinovial e no ponto P1, enquanto escore 2 foram observados nos pontos P2 e P3. Estas características sugerem que apesar dos resultados estatísticos em tíbia não serem significantes em relação a espessura da cartilagem, ocorre uma prevenção das lesões causadas pelo CFA no grupo diclofenaco livre quando comparado ao CFA.

As Figuras 5 e 6 apresentam os resultados dos tratamentos com diclofenaco nanoencapsulado na forma de nanopartículas lipídicas (NLS) associadas ou não a iontoforese em fêmur e tíbia respectivamente. Na Figura 5, em fêmur, o grupo NLS DF (I) apresentou escore 2 na membrana sinovial, escore 1 em P1 e P2 e escore 2 em P3 enquanto o controle NLS B (I) apresentou escore 3 na membrana sinovial e nos pontos P1 e P2 e escore 2 no ponto P3. Este resultado sugere que em fêmur, o tratamento com NLS DF (I) preveniu as lesões do tecido causadas pelo CFA quando comparado ao grupo NLS B (I), que não recebeu diclofenaco, resultados que foram expressivos principalmente nos pontos P1 e P2. Na Figura 6, em tíbia, o grupo NLS DF (I) apresentou escore 2 na membrana sinovial e P1 e P2, e escore 1 em P3, enquanto o controle NLS B (I) que não possui diclofenaco apresentou escore 2 na membrana sinovial, escore 3 em P1 e escore 2 em P2 e P3. Este resultado sugere que em tíbia, o tratamento com NLS DF (I) obteve discreta prevenção das lesões nos pontos P1 e P3 quando comparados ao grupo NLS B (I), que não possui diclofenaco.

As Figuras 7 e 8 apresentam os resultados dos tratamentos com diclofenaco nanoencapsulado na forma de nanoemulsão (NE) associadas ou não a iontoforese

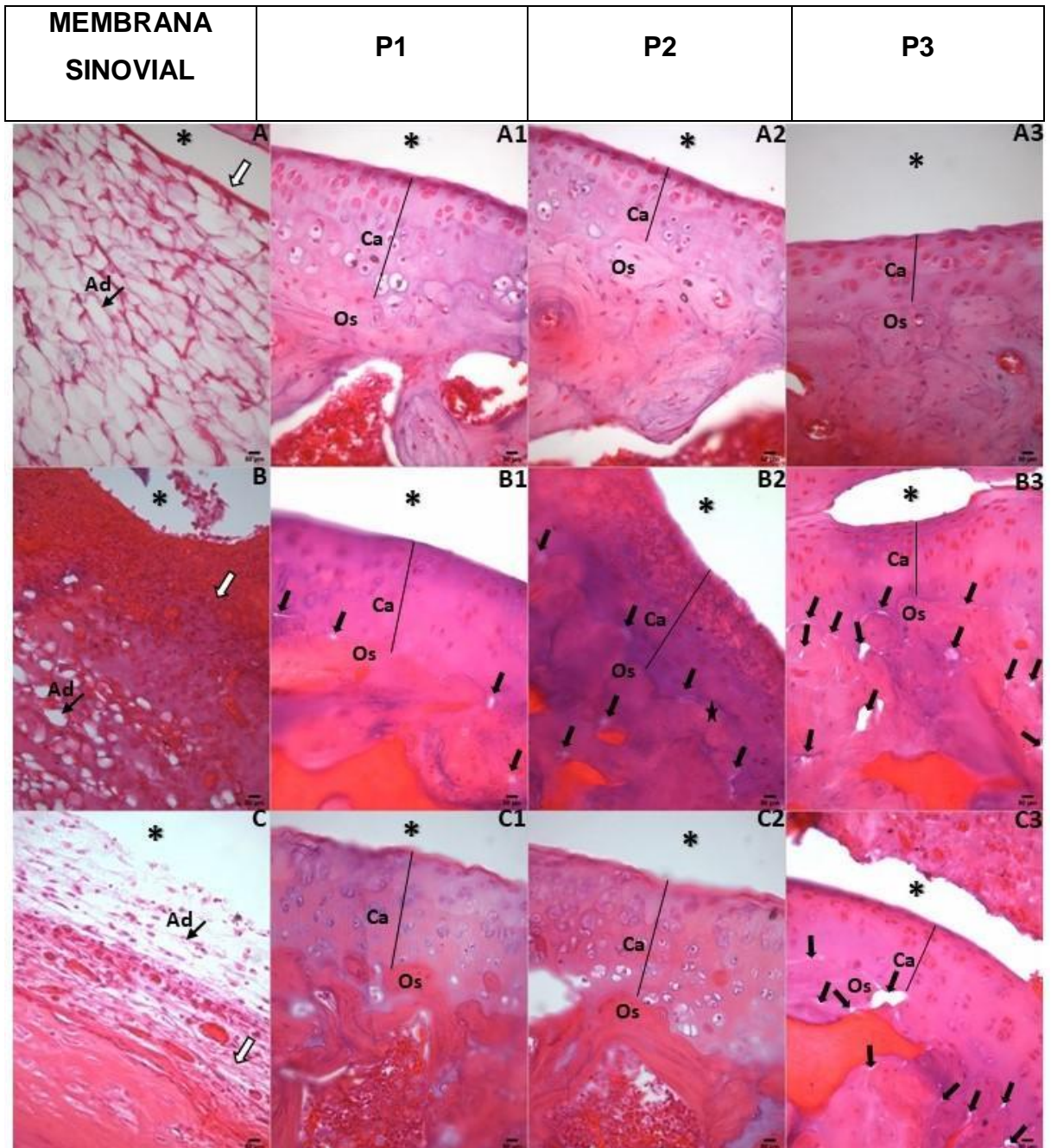
em fêmur e tibia respectivamente. Na Figura 7, em fêmur, o grupo tratado com NE DF (I), apresentou escore 2 na membrana sinovial, escore 1 em P1 e P2, e escore 2 em P3, enquanto o grupo controle NE B (I) (sem diclofenaco) apresentou escore 3 na membrana sinovial, P1 e P2, e escore 2 em P3. Em conjunto, esses resultados sugerem que ambos os tratamentos com NE DF (I) e NLS DF (I) em fêmur preveniu as lesões causadas pelo CFA. Em tibia Figura 8, o grupo tratado com NE DF (I), apresentou escore 2 para a membrana sinovial e escore 1 em todos os pontos analisados, enquanto o grupo controle NE B (I) apresentou escore 3 na membrana sinovial e ponto P1, e escore 2 nos pontos P2 e P3. Assim, o tratamento com NE DF (I) em tibia também foi capaz de prevenir parte dos danos causados pelo CFA.

**Figura 2 – Gráficos das Análises de Espessura da Cartilagem e Contagem de Condrócitos de Fêmur e Tíbia.**



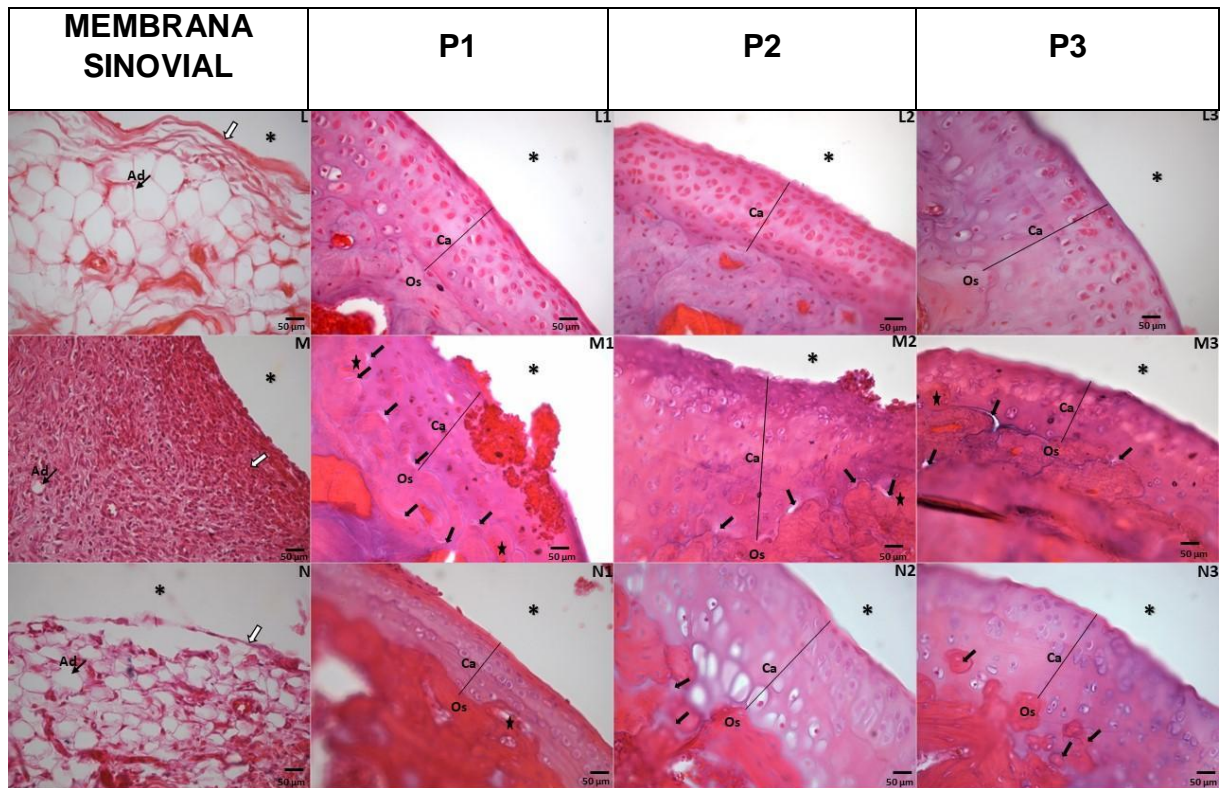
**Legenda:** Naive: Animais sem intervenção; CFA: Animais com artrite; DF Livre (25 µg/kg, i. v.); NLS B (I): Nanopartículas lipídicas sólidas sem diclofenaco associado a iontoforese; NLS DF (P): Nanopartículas lipídicas sólidas contendo diclofenaco sem iontoforese; NLS DF (I): Nanopartículas lipídicas sólidas contendo diclofenaco associado à iontoforese, NE B (I): Nanoemulsão sem diclofenaco associado a iontoforese; NE DF (P): Nanoemulsão contendo diclofenaco sem iontoforese; NE DF (I): Nanoemulsão contendo diclofenaco associado a iontoforese. Teste de Mann-Whitney. \* e \*\* Representam diferença estatística de  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente (µm, micrômetros).

**Figura 3 – Fotomicrografias do Fêmur dos Grupos *Naïve*, CFA e DF Livre.**



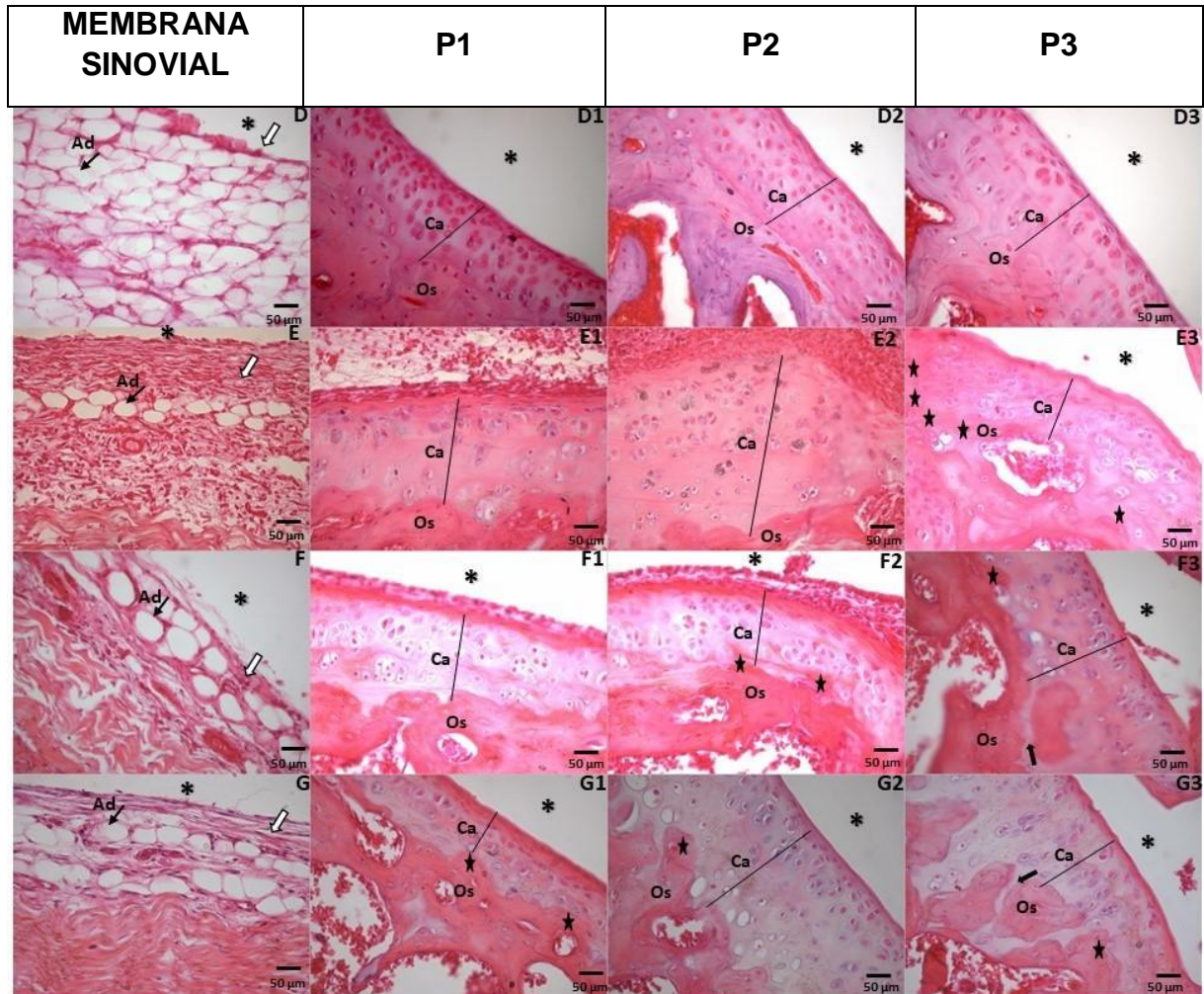
**Legenda:** Corte sagital com coloração HE. Fotomicrografias das membranas sinoviais e cartilagem dos joelhos de ratos. Letras A, A1, A2 e A3 representam o grupo *naïve* (articulação normal, sem alterações). As letras B, B1, B2 E B3 representam o grupo CFA (animais com artrite, 50  $\mu$ L, 5 mg/mL, i. a.). Letras C, C1, C2 E C3 representam o grupo DF Livre (diclofenaco 50  $\mu$ L, 5 mg/mL, i. v.) (\*) representa o espaço articular, (Ca) representa a cartilagem, (Os) representa osso subcondral, (Ad) representa os adipócitos, (estrela) representa invaginação do osso subcondral, (seta branca) representa espessamento da membrana sinovial, (seta preta) representa danos a estrutura óssea.

**Figura 4 – Fotomicrografias da Tíbia dos Grupos *Naive*, CFA e DF Livre.**



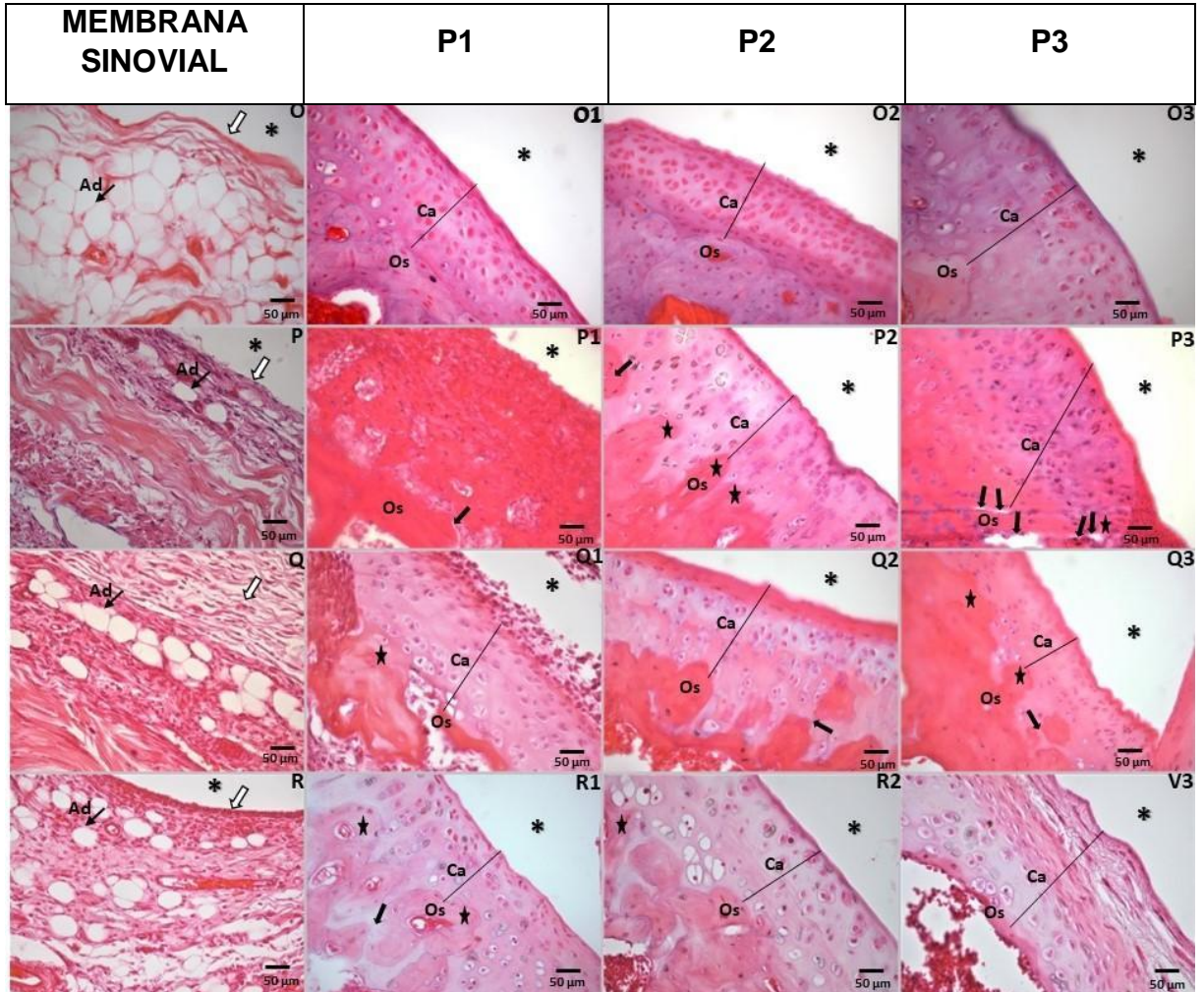
**Legenda:** Corte sagital com coloração HE. Fotomicrografias das membranas sinoviais e cartilagem dos joelhos de ratos. Letras L, L1, L2 e L3 representam o grupo *naive* (articulação normal, sem alterações). Letras M, M1, M2 E M3 representam o grupo CFA (animais com artrite, 50  $\mu$ L, 5 mg/mL, i. a.). Letras N, N1, N2 E N3 representam o grupo DF Livre (25  $\mu$ g/kg, i. v.) (\*) representa o espaço articular, (Ca) representa a cartilagem, (Os) representa osso subcondral, (Ad) representa os adipócitos, (estrela) representa invaginação do osso subcondral, (seta branca) representa espessamento da membrana sinovial, (seta preta) representa danos a estrutura óssea.

**Figura 5 – Fotomicrografias do Fêmur dos Grupos *Naïve*, NLS B (I) e NLS DF (P), NLS DF (I).**



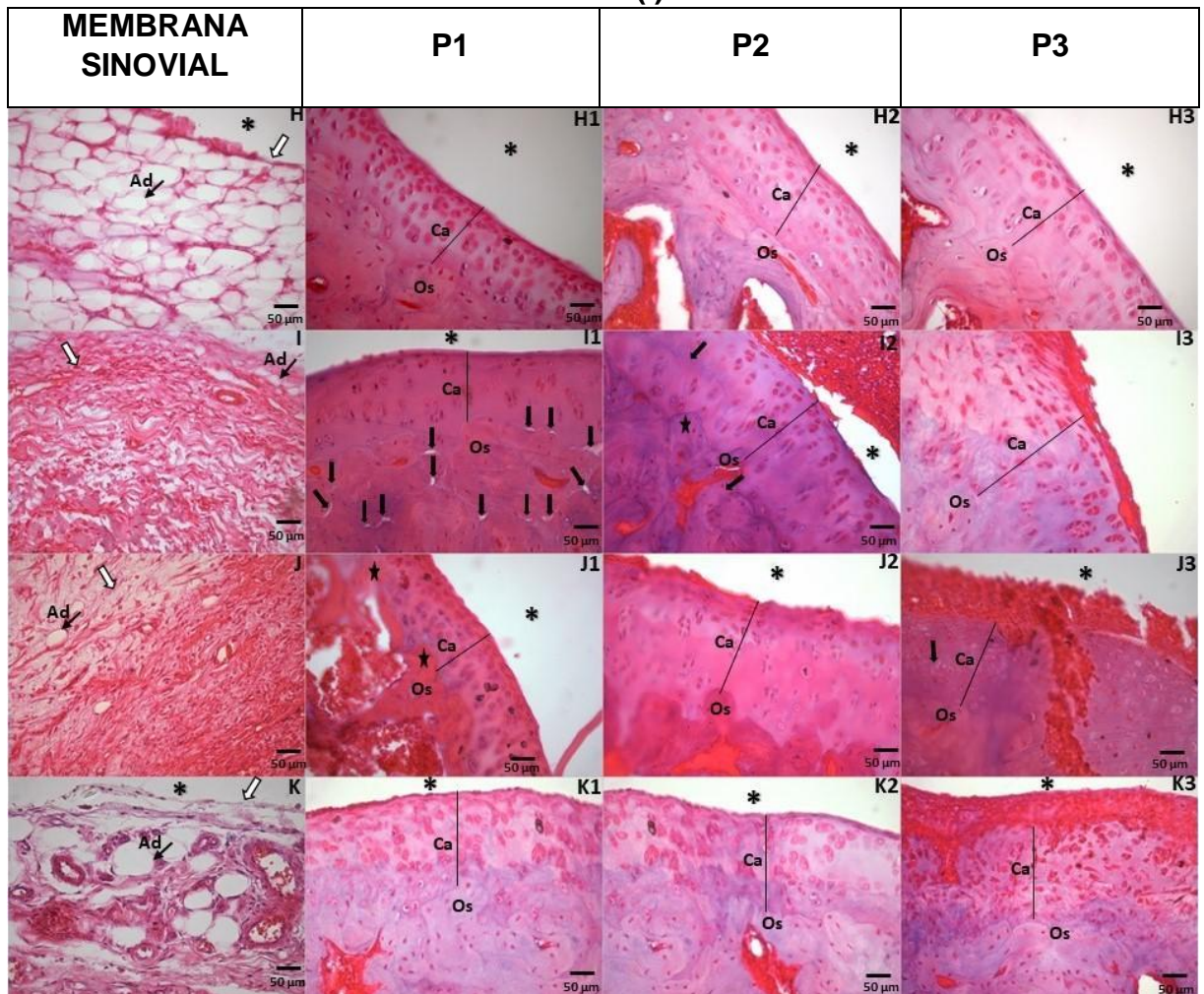
**Legenda:** Corte sagital com coloração HE. Fotomicrografias das membranas sinoviais e cartilagem dos joelhos de ratos. Letras D, D1, D2 e D3 representam o grupo *naïve* (articulação normal, sem alterações). Letras E, E1, E2 e E3 representam o grupo NLS B (I) (animais com artrite, 50 µL, 5 mg/mL, i. a.). Letras F, F1, F2 e F3 representam o grupo NLS DF (P) As letras G, G1, G2 e G3 representam o grupo NLS DF (I). (\*) representa o espaço articular, (Ca) representa a cartilagem, (Os) representa osso subcondral, (Ad) representa os adipócitos, (estrela) representa invaginação do osso subcondral, (seta branca) representa espessamento da membrana sinovial, (seta preta) representa danos a estrutura óssea.

**Figura 6 – Fotomicrografias da Tíbia dos Grupos *Naive*, NLS B (I) e NLS DF (P), NLS DF (I).**



**Legenda:** Corte sagital com coloração HE. Fotomicrografias das membranas sinoviais, cartilagem e ossos dos joelhos de ratos. Letras O, O1, O2 e O3 representam o grupo *naive* (articulação normal, sem alterações). Letras P, P1, P2 e P3 representam o grupo NLS B (I) (animais com artrite, 50  $\mu$ L, 5 mg/mL, i. a.). As letras Q, Q1, Q2 e Q3 representam o grupo NLS DF (P). As letras R, R1, R2 e R3 representam o grupo NLS DF (I). (\*) Representa o espaço articular, (Ca) representa a cartilagem, (Os) representa osso subcondral, (Ad) representa os adipócitos, (estrela) representa invaginação do osso subcondral, (seta branca) representa espessamento da membrana sinovial, (seta preta) representa danos a estrutura óssea.

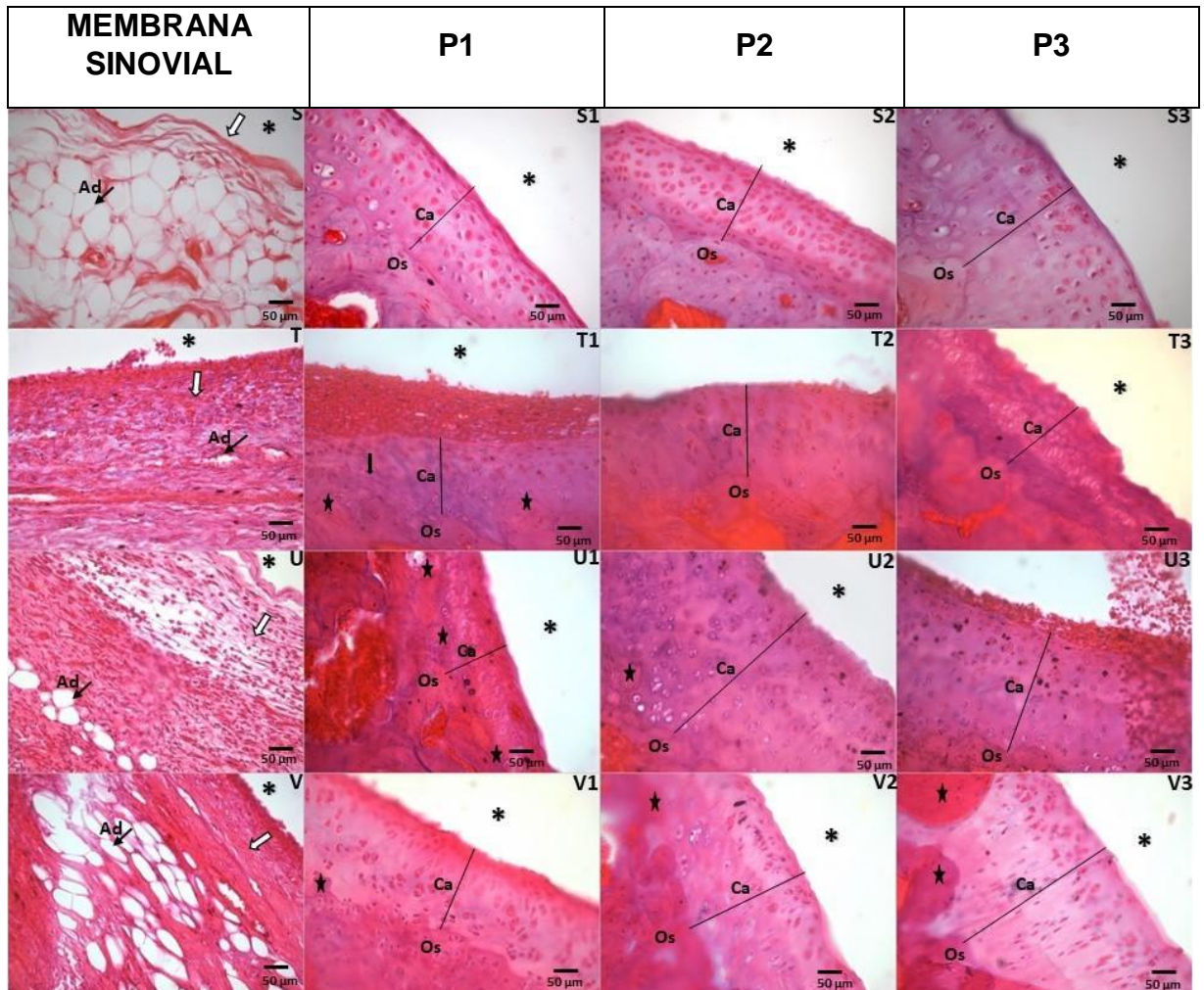
**Figura 7 – Fotomicrografias de Fêmur nos Grupos *Naive*, NE B (I), NE DF (P), NE DF (I).**



**Legenda:** Corte sagital com coloração HE. Fotomicrografias das membranas sinoviais e cartilagem dos joelhos de ratos. Grupo *naive* (articulação normal, sem alterações) representado pelas letras H, H1, H2 e H3. Letras I, I1, I2 e I3 representam o grupo NE B (I). Letras J, J1, J2 e J3 representam o grupo NE DF (P). Letras K, K1, K2 e K3 representam o grupo NE DF (I). (\*) Representa o espaço articular, (Ca) representa a cartilagem, (Os) representa osso subcondral, (Ad) representa os adipócitos, (estrela) representa invaginação do osso subcondral, (seta branca) representa espessamento da membrana sinovial, (seta preta) representa danos a estrutura óssea.



**Figura 8 – Fotomicrografias da Tíbia nos Grupos *Naive*, NE B (I), NE DF (P), NE DF (I).**



**Legenda:** Corte sagital com coloração HE. Fotomicrografias das membranas sinoviais e cartilagem dos joelhos de ratos. Grupo *naive* (articulação normal, sem alterações) representado pelas letras S, S1, S2 e S3. Letras T, T1, T2 e T3 representam o grupo NE B (I). Letras U, U1, U2 e U3 representam o grupo NE DF (P). As letras V, V1, V2 e V3 representam o grupo NE DF (I). (\*) Representa o espaço articular, (Ca) representa a cartilagem, (Os) representa osso subcondral, (Ad) representa os adipócitos, (estrela) representa invaginação do osso subcondral, (seta branca) representa espessamento da membrana sinovial, (seta preta) representa danos a estrutura óssea.

No presente estudo, o CFA induziu o aparecimento de alterações histomorfológicas significativas, incluindo hiperplasia anômala de tecido da cartilagem, espessamento da membrana sinovial, sinovite característica, modificações e danos à estrutura óssea presentes no fêmur e tíbia, corroborando os achados nos estudos de Aiman *et al.* (2020), onde também foi observado estes danos no modelo de CFA.

A artrite promove um distúrbio do sistema musculoesquelético que desestabiliza o balanço entre degradação e a regeneração da cartilagem articular, membrana sinovial e ossos periarticulares após um estímulo inflamatório ou trauma mecânico (AIMAN *et al.*, 2020). Neste estudo o desequilíbrio foi causado pelo estímulo inflamatório induzido pelo CFA.

Resultados semelhantes foram descritos por Nagarkar e Jagtap (2017) ao observarem o efeito do diclofenaco (15 mg/kg, i.v.) em animais que tiveram artrite induzida com CFA, onde os efeitos do diclofenaco possivelmente se deram pela supressão da migração de leucócitos para a área inflamada. Zhu, Bannon e Joshi (2015) também descrevem uma diminuição na sensação dolorosa com o uso de diclofenaco (30 mg/kg i.v.) em ratos com artrite induzida por CFA. Além disso, um estudo realizado por Aiman *et al.*, (2020), em avaliação histomorfológicas em um modelo utilizando CFA em ratos, o tratamento com diclofenaco (10 mg/kg i.v.) demonstrou eficácia em reduzir os danos na cartilagem.

No presente estudo, os animais que receberam diclofenaco livre (25 µg/kg, i. v.) tiveram a estrutura do tecido articular mais preservada (ver Figuras 2, 3 e 4), indicando que o fármaco foi capaz de prevenir parte dos danos articulares causados pela injeção de CFA, como diminuição da espessura da cartilagem e redução do número de condrócitos, especialmente no fêmur. Estes achados mostram que o presente modelo de artrite experimental (CFA) responde ao tratamento com diclofenaco livre de forma similar à descrita na literatura e, portanto, nos permite utilizá-lo de forma consistente como plataforma para avaliar o efeito terapêutico de formulações especiais contendo diclofenaco, como o presente estudo avaliando nanopartículas contendo esse fármaco associadas à iontoforese.

O diclofenaco é amplamente usado pela via tópica, porém sabe-se que ele possui uma baixa permeação através da pele (NISHIHATA *et al.*, 1987). Além disso,

ele tem sido utilizado no tratamento da AR, mas por via oral, na dose de 75 a 100 mg/dia (MOTA, 2013). A iontoforese é um método físico seguro, não invasivo, com capacidade de proporcionar a permeação de moléculas pela pele por meio da aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade, não superior a 0,5 mA/cm<sup>2</sup>, que passa por uma solução eletrolítica e carrega consigo as moléculas para dentro da pele, possibilitando uma maior permeação do fármaco desejado (GRATIERI *et al.*, 2008; DEMINA; SKATKOV, 2013; LÜHDER; REICHARDT, 2017). Isto posto, no presente trabalho exploramos o efeito da iontoforese. Com base no que já foi descrito na literatura, a permeação de moléculas ionizáveis como o diclofenaco pode ser facilitada com o uso da iontoforese (TYLE, 1986; VARGHESE, KHAR, 1996; ver MOTTA *et al.*, 2003).

Neste estudo, a estratégia de utilizar o diclofenaco nanoencapsulado associado a iontoforese teve como objetivo prolongar o efeito terapêutico do fármaco no local de ação. Os animais que receberam as NLS ou NE contendo diclofenaco associadas à iontoforese apresentaram uma melhora dos danos causados pelo CFA (ver Figura 2). As NLS contendo diclofenaco, quando administradas associadas à iontoforese, foram capazes de conservar a quantidade de condrócitos na cartilagem do fêmur (ver Figuras 2 e 5), mas não na da tíbia (ver Figuras 2 e 6). As NE contendo diclofenaco, por sua vez, quando administradas associadas à iontoforese, foram capazes de conservar a quantidade de condrócitos na cartilagem tanto do fêmur quanto da tíbia. Entretanto, não foi observado efeito na espessura da cartilagem (ver Figuras 2, 7 e 8). Estudos semelhantes que utilizaram polímeros contendo diclofenaco associados à iontoforese, observaram uma maior permeação desse fármaco (FANG; SUNG; LIN; FANG, 1999). Sendo assim, sugere-se que os efeitos anti-inflamatórios dos tratamentos com NLS e NE contendo diclofenaco associadas à iontoforese se dão possivelmente por uma maior permeação do fármaco na pele, o diclofenaco permeia através do folículo piloso (MAITANI *et al.*, 1994).

LOPEZ-ARMANDA *et al.* (2002) descreve um estudo que utilizou o modelo de artrite induzida por adjuvante de Freund em ratos, e o diclofenaco reduziu a concentração de células polimorfonucleares no fluido sinovial. Sugerindo então, que os AINEs podem ter efeitos diferenciados na migração de leucócitos para a articulação. Sendo assim, a hipótese proposta neste estudo, juntamente com os dados disponíveis na literatura, é que o diclofenaco nanoencapsulado e aplicado por

iontoforese apresenta absorção mais precisa por possibilitar a entrega do fármaco no local de ação, obtendo aumento da eficácia terapêutica e prevenção do desenvolvimento de danos causados pela artrite induzida por CFA através da diminuição do infiltrado de leucócitos.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a utilização do diclofenaco nanoencapsulado é um tratamento promissor e pode trazer inúmeros benefícios ao paciente com artrite como o aumento da disponibilidade de diclofenaco no alvo terapêutico sem os efeitos adversos sistêmicos apresentados pelos tratamentos convencionais. Os efeitos obtidos com as nanopartículas aplicadas pela via transcutânea ainda ficaram aquém dos resultantes da aplicação endovenosa de diclofenaco livre, indicando que é necessário o aumento da quantidade de diclofenaco entregue pela iontoforese. Porém, dados na literatura utilizando NLS e NE com diclofenaco associados a iontoforese em ratos e humanos ainda são escassos, isto posto, mais estudos são necessários para elucidar seus mecanismos e como se dá seus efeitos terapêuticos. Além disso, as técnicas histológicas utilizadas precisam ser aprimoradas e melhor padronizadas para obtenção de resultados com uma boa reprodutibilidade.

## REFERÊNCIAS

- ABHISHEK A, DOHERTY M. Mechanisms of the placebo response in pain in osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 21, n.9, p. 1229-1235, 2013.
- A DATE, Abhijit; DESAI, Neha; DIXIT, Rahul; NAGARSENKER, Mangal. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. **Nanomedicine**, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 1595-1616, dez. 2010. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/nnm.10.126>.
- AFIFY, Mohamed S. El *et al.* Development and optimization of a novel drug free nanolipid vesicular system for treatment of osteoarthritis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [S.L.], v. 44, n. 5, p. 767-777, 19 dez. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/03639045.2017.1411944>.
- AIMAN, Ummu; KHATIMAH, Husnul; SAIFULLAH, Muhammad Ariq; MATONDANG, Muhammad Carnegie; SUKMANA, Dike Dandari; MISKAD, Upik Anderiani. Anti-Arthritic Effect of Onion Skin Extract On Rat Complete Freund's Adjuvant-Induced. **European Journal of Molecular & Clinical Medicine**, Indonesia, v. 7, n. 7, p. 1183-1192, 2020.
- BANIK, R. K.; KASAI, M.; MIZUMURA, K. Reexamination of the difference in susceptibility to adjuvant-induced arthritis among LEW/Crj, Slc/Wistar/ST and Slc/SD rats. **Experimental Animals**, v.51, n.2, p. 197-201, 2002.
- BARAKAT, Nahla; FOUAD, Ehab; ELMEDANY, Azza. Enhancement of Skin Permeation and Anti-Inflammatory Effect of Indomethacin Using Nanoemulsuion. **Letters in Drug Design & Discovery**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 436-446, 26 abr. 2012. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/157018012799859891>.
- BARTON, Nicola J. *et al.* Demonstration of a novel technique to quantitatively assess inflammatory mediators and cells in rat knee joints. **Journal of Inflammation**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 13, 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-9255-4-13>.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvant in experimental models of autoimmune disease. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 70, p. 846-860, 2001.
- BOVE, S. E. *et al.* Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 821-830, nov. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1063-4584\(03\)00163-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1063-4584(03)00163-8).
- BRESSAN, Elisângela *et al.* Comparison of two PBR ligands with classical antiinflammatory drugs in LPS-induced arthritis in rats. **Life Sciences**, [S.L.], v. 72, n. 23, p. 2591-2601, abr. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(03\)00171-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(03)00171-1).
- BROGDEN, R. N. *et al.* Diclofenac Sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. **Drugs**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 24-48, jul. 1980. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-198020010-00002>.

CASE, John P. *et al.* Lack of Efficacy of Acetaminophen in Treating Symptomatic Knee Osteoarthritis. **Archives of Internal Medicine**, [S.L.], v. 163, n. 2, p. 169, 27 jan. 2003. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.163.2.169>.

CASHMAN, Jeremy N. The Mechanisms of Action of NSAIDs in Analgesia. *Drugs*, [S.L.], v. 52, n. 5, p. 13-23, 1996. **Springer Science and Business Media LLC**. <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-199600525-00004>.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Arthritis**. 2017. U.S. Department of Health & Human Services. Disponível em: <https://www.cdc.gov/arthritis/index.htm>. Acesso em: 20 abr. 2021.

DEMINA, N. B.; SKATKOV, S. A. Development strategies and biopharmaceutical aspects of drug delivery systems. **Russian Journal of General Chemistry**, [S.L.], v. 83, n. 12, p. 2519-2523, dez. 2013. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s1070363213120505>.

EL-HARATI, Assma Ahmed; CHARCOSSET, Catherine; FESSI, Hatem. Influence of the Formulation for Solid Lipid Nanoparticles Prepared with a Membrane Contactor. **Pharmaceutical Development and Technology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 153-157, jan. 2006. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10837450600561182>.

FANG, Jia-You; SUNG, K.C.; LIN, Hung-Hong; FANG, Chia-Lang. Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations: in vitro and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 178, n. 1, p. 83-92, fev. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(98\)00361-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(98)00361-5).

FARIA, Tatianny Jovita de *et al.* Evaluation of the pro-inflammatory potential of nanostructured drug carriers in knee-joints of rats: effect on nociception, edema, and cell migration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 98, n. 12, p. 4844-4851, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21788>.

FARIA, Tatianny Jovita de *et al.* Evaluation of the pro-inflammatory potential of nanostructured drug carriers in knee-joints of rats: effect on nociception, edema, and cell migration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 98, n. 12, p. 4844-4851, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21788>.

FUSCO, M. *et al.* Degenerative Joint Diseases and Neuroinflammation. **Pain practice**, v. 17, n.4, p. 522-532, 2017.

GARG, Neeraj K. *et al.* Nanostructured lipid carrier mediates effective delivery of methotrexate to induce apoptosis of rheumatoid arthritis via NF- $\kappa$ B and FOXO1. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 499, n. 1-2, p. 301-320, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.061>.

GARZÓN, M. L. S.; FERNÁNDEZ, B. G. Las nanopartículas sólidas lipídicas y los acarreadores lipídicos nanoestructurados en usos terapêuticos. **Rázon y Palabra**, v.14, 2009.

GASCO, M.R. Method for producing solid lipid microspheres having narrow size distribution. **US Patents**. 5 250 236. 1993.

GOMES, R. P. *et al.* Efeitos de um minuto e dez minutos de deambulação em ratos com artrite induzida por adjuvante completo de Freund sobre os sintomas de dor e edema. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, n. 2, p. 83–89, 2014.

GRATIERI, Taís; GELFUSO, Guilherme Martins; LOPEZ, Renata Fonseca Vianna. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 31 jul. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000600040>.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147–157, 2007.

HU, F.Q. *et al.* Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 239, n. 1-2, p. 121-128, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00081-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00081-9).

IASP, International Association for the Study of Pain. **Home**. 2017. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org>. Acesso em: 20 abr. 2021.

LIU, Weiwei *et al.* Sinomenine Inhibits the Progression of Rheumatoid Arthritis by Regulating the Secretion of Inflammatory Cytokines and Monocyte/Macrophage Subsets. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, p. 1-21, 26 set. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02228>.

LOPEZ-ARMADA, M. J. *et al.* Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [S.L.], v. 61, n. 11, p. 1027-1030, 1 nov. 2002. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/ard.61.11.1027>.

LÜHDER, Fred; REICHARDT, Holger. Novel Drug Delivery Systems Tailored for Improved Administration of Glucocorticoids. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 1836, 24 ago. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18091836>.

MCINNES, Iain B.; SCHETT, Georg. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, [S.L.], v. 365, n. 23, p. 2205-2219, 8 dez. 2011. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1004965>.

MONEMDJOU, Roxana; FAHMI, Hassan; KAPOOR, Mohit. Synovium in the pathophysiology of osteoarthritis. **Therapy**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 661-668, nov. 2010. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/thy.10.72>.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 385, n. 1-2, p. 113-142, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.

MOTA, Licia Maria Henrique da *et al.* Diretrizes para o tratamento da artrite reumatoide. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2013, v. 53, n. 2, pp. 158-183. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/txvghqpZhQ3kYDG9rzsZhVD/?lang=pt#>. Epub 30 Out 2015. ISSN 1809-4570.

MUKHERJEE, Satanic *et al.* Use of Computational Modeling to Study Joint Degeneration: a review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S.L.], v.



8, p. 1-20, 28 fev. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.00093>.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 54, p. 131-155, nov. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x\(02\)00118-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0169-409x(02)00118-7).

NAGARKAR, Bhagyashri; JAGTAP, Suresh. Effect of new polyherbal formulations DF1911, DF2112 and DF2813 on CFA induced inflammation in rat model. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-12, 4 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-017-1711-6>.

OLIVEIRA, Daniel Teixeira de; SOUZA-SILVA, Eduardo; TONUSSI, Carlos Rogério. Technical Report: Gingival Vein Punction: A New Simple Technique for Drug Administration or Blood Sampling in Rats and Mice. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 109-113, 2009.

PANERAI, A. E. Plasma and synovial fluid interleukin-1, interleukin-6 and substance P concentrations in rheumatoid arthritis patients: effect of the nonsteroidal anti inflammatory drugs indomethacin, diclofenac and naproxen. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 44, n. 11, p. 486-490, nov. 1995. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01837915>.

PARNHAM, Michael J. Antirheumatic agents and leukocyte recruitment. **Biochemical Pharmacology**, [S.L.], v. 58, n. 2, p. 209-215, jul. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00056-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00056-8).

PASKAUSKAS, Saulius *et al.* Blockade of leukocyte haptokinesis and haptotaxis by ketoprofen, diclofenac and SC-560. **BMC Immunology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 64, 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2172-12-64>.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. Editora Elsevier, 8ª edição, 2016. 784 p.

RASBAND, W. S., ImageJ, U. S. **National Institutes of Health**, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

SACERDOTE, P. *et al.* Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) - structural investigations on two different carrier systems. **Bio-medical Materials and Engineering**, 15(5):393-402, 2005.

SEIFER, D. R. *et al.* Novel synovial fluid recovery method allows for quantification of a marker of arthritis in mice. **Osteoarthritis and Cartilage**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 1532-1538, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2008.04.013>.

SHAKER, Dalia S. *et al.* Nanoemulsion: a review on mechanisms for the transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs. **Scientia Pharmaceutica**, [S. L.], v. 87, n. 17, p. 1-34, jun. 2019.

SIEKMANN, Britta; WESTESEN, Kirsten. Preparation and physicochemical characterization of aqueous dispersions of coenzyme Q10 nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 201-208, 1995. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1016270724413>.

- SMALL, R. E. Diclofenac sodium. **Clinical Pharmacy**. 8(8):545-58, 1989.
- SWEENEY, Susan E.; FIRESTEIN, Gary S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 372-378, mar. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00259-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00259-0).
- TONUSSI C. R., FERREIRA S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**; 48(3):421-7, 1992.
- WANG, D.; ZHAO, P.; CUIA, F.; LI, X. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with total flavones of Hippophae rhamnoides (TFH). **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**. 61(2):110-20, 2007.
- WHALEN, Karen; FINKEL, Richard; PANAVELIL, Thomas A. **Farmacologia Ilustrada**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2016. 669 p.
- WHITEHOUSE, M. W. Adjuvant arthritis 50 years on: the impact of the 1956 article by C. M. Pearson, "Development of arthritis, peri-arthritis, and periostitis in rats given adjuvants". **Inflammation Research**, v.56, n.4, p.133-8, 2007.
- WHITEHOUSE, M. W. *et al.* Freund's adjuvants: relationship of arthritogenicity and adjuvant activity in rats to vehicle composition. **Immunology**. 27(2): 311-30, 1974.
- WILSON, Alex W. *et al.* An animal model of chronic inflammatory pain: pharmacological and temporal differentiation from acute models. **European Journal of Pain**, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 537-537, ago. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.08.003>.
- ZHANG, J.; FAN, Y.; SMITH, E. Experimental Design for the Optimization of Lipid Nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.L.], v. 98, n. 5, p. 1813-1819, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21549>.
- ZHU, C. Z.; BANNON, A. W.; JOSHI, S. K. Complete Freund's adjuvant-induced reduction of exploratory activity in a novel environment as an objective nociceptive endpoint for sub-acute inflammatory pain model in rats. **European Journal of Pain**, [S.L.], v. 19, n. 10, p. 1527-1536, 2 mar. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ejp.686>.