

**ANDRESSA DA SILVA DE MELLO**

**PADRÃO DE SONO EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ANDRESSA DA SILVA DE MELLO**

**PADRÃO DE SONO EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do título de Mestre em Ciências.

*Orientadora:*

Profa. Dra. Monica Levy Andersen

*Co-orientador:*

Prof. Dr. Sergio Tufik

São Paulo

2009

Silva, Andressa de Mello

**Padrão de sono em modelo experimental de osteoartrite** / Andressa da Silva de Mello - São Paulo, 2009.

xxv, 135f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis

1. Padrão de sono; 2. Osteoartrite; 3. Dor crônica; 4. Gênero; 5. Ratos

**ANDRESSA DA SILVA DE MELLO**

**PADRÃO DE SONO EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE**

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Stela Márcia Mattiello Rosa

Prof. Dr. Katsumasa Hoshino

Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari

**SUPLENTE**

Profa. Dra. Suely Roizemblatt

Aprovada em: Agosto/2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGIA**

**Chefe do Departamento:**

Profa. Dra. Maria Lúcia Oliveira de Souza Formigoni

**Coordenadora do Curso de Pós-Graduação:**

Profa. Dra. Maria Gabriela Menezes de Oliveira

*Esta tese de Mestrado foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina no período de março/2008 a julho/2009 com apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 07/56620-6 e 98/14303-3 (CEPID).*

*“Feliz aquele que transfere o que sabe  
e aprende o que ensina”  
(William Shakespeare)*



## *Dedicatória*

*Aos meus Pais, Leiva e José Antônio*

*Apesar da imensurável distância, saibam que a minha vitória é também de vocês. Sou grata a todo o esforço dedicado à minha educação e criação que contribuiu para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Sou muito feliz e orgulhosa por vos ter como meus Pais, exemplos para a minha vida.*

*À minha irmã, Vanessa*

*Amiga, conselheira e companheira... Mesmo distante você foi importante pelas suas palavras de carinho e conforto nas horas difíceis. Saiba que tenho muito carinho e amor por você e que estarei sempre ao seu lado, minha querida irmã.*

*Ao meu esposo Marco Túlio de Mello,*

*Que me ensina a Viver;*

*Que me ensina a Respeitar;*

*Que me ensina a Amar.*

*Sem o seu carinho, a sua paciência e o seu companheirismo ao longo desta etapa tudo seria diferente, muito obrigada por tudo. E saiba que eu vou Te Amar por toda a minha vida!*

*“Um sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas um sonho que se sonha junto se torna realidade”*

*(Raul Seixas)*

## *Agradecimentos especiais*

### *Aos meus Mestres*

*A minha orientadora, Profa. Dra. Monica Levy Andersen, Mãe, amiga, acolhedora e eterna professora. Você foi essencial e excepcional para que esta dissertação tivesse início, desenvolvimento e conclusão. Com você aprendi a seriedade, o amor e o respeito para com a Ciência e a Vida. Você, pela sua dedicação e motivação, é um exemplo de profissional! Irei levar isso para toda a minha vida, esteja eu onde eu estiver. Muito obrigada pela confiança, a paciência e por todo o aprendizado. Foi muito bom conhecer e aprender com você! Serei eternamente grata a você por todos os incentivos e conselhos sugeridos nesta dissertação.*

*Ao meu co-orientador Prof. Dr. Sergio Tuftk*

*Um grande professor, exemplo de profissional e incentivador em busca do conhecimento. A sua energia positiva ilumina cada um ao seu redor, muito obrigada por me transmitir esse brilho que, com certeza, abriu os meus olhos para a pesquisa e a ciência. Muito obrigada por poder fazer parte do seu grande grupo de pesquisadores e sábios na Ciência do Sono, pois você é um exemplo de que pesquisar dá certo.*

*Com vocês aprendi que:*

*A ciência não se tece apenas com os resultados e sim com as perguntas.*

## *Agradecimentos*

*Muitos contribuíram para a conclusão desta dissertação, porém nada seria possível sem os animais, que, com as suas vidas, proporcionam o progresso da Ciência.*

*A Deus,*

*Pela saúde plena de todos os dias e pela proteção que só o Pai Eterno sabe dar.*

*A minha Família,*

*Pelo carinho, o apoio e pelo pensamento positivo que, no final, tudo dá certo. Vocês são indispensáveis para um bem estar físico e psíquico.*

*A minha grande Amiga e Irmã Mari,*

*A sua presença tem sido constante desde minha infância até ao presente momento. Muito obrigada pelos seus conselhos, seu*

*companheirismo e pela sua dedicação para cuidar de mim.  
Ninguém melhor do que você me conhece!*

*Às famílias Corgosinho e Mandl, em especial a Isa  
Lucia, Rafael Mandl e a Marisa, pelos conselhos e pelo  
carinho recebido.*

*Ao meu sogro Mario Lúcio, pelo carinho e atenção.*

*A todos os professores do Curso de Pós-Graduação do  
Departamento de Psicobiologia,*

*Cada um de vocês teve uma participação especial na minha  
formação.*

*Aos amigos e colegas Francielli Ruiz, Adriano Zager,  
Raquel Martins, Thatiana Alvarenga e Tereza Schutz,*

*Obrigado por compartilharem comigo todas as certezas e incertezas nestes anos que passamos juntos. Vocês são pessoas inesquecíveis. Obrigada pela vossa amizade e confiança.*

*A colega e amiga Paula Araújo*

*Pela amizade e pela confiança, assim como pela sua dedicação e paciência, sem dúvida foram essenciais para a realização e finalização desta dissertação. Muito obrigada!*

*Aos companheiros de trabalho Fernanda Armani, Neuli Tenório, Vanessa Kahan, Juliana Perry, Camila Hirotsu, Adriana Carvalho e Camila Guindalini,*

*Obrigada pela amizade e pela ajuda que sempre precisei.*

*A Sandra Queiroz, Raquel Munhoz e Marcos Mônico,*

*Obrigada pela ajuda no projeto clínico, sem esta tudo teria sido diferente.*

*As amigas Andrea Maculano, Cristiane Westin, Gisele Passos, Rita Roscolo, Shamanta Paim, e Cleide Lopes, Viviane Groismam, Glorinha e Tia Candinha,*

*Gostaria de agradecer todo apoio e incentivo no processo dessa dissertação. Muito obrigada pelas conversas, pelos conselhos, pela cumplicidade, pelas risadas e por também terem compartilhado as tristezas. Obrigada por existirem e fazerem parte da minha vida como grandes amigas.*

*Aos amigos e funcionários do Centro de Estudo em Psicobiologia e Exercício, e do Centro de Estudo Multidisciplinar em Sono e Acidentes,*

*Pelo convívio, amizade e carinho, demonstrado em cada vez que encontro vocês. Vocês fazem parte da minha trajetória acadêmica.*

*Aos amigos Marcos Gonçalves Santana, Silveiro Garbui, Daniel Paulino e Ricardo Cassilhas,*

*Pelas trocas de idéias e pelas conversas agradáveis e acolhedoras.*



*Às primas e grandes amigas Camila e Caroline Pigatto,*

*Que apesar da distancia, conseguimos permanecer unidas.*

*Obrigada por toda a amizade desde sempre.*

*Às minhas amigas Fernanda Barrichelo, Carine Binotto, Cristina Binotto e Marjane Lobrelloto,*

*Sei que em vocês encontro meu refúgio e minha calma, obrigada pela amizade sincera desde nossa infância, até hoje tenho saudades de vocês, mas as conversas por emails me tranquilizam.*

*Aos amigos e companheiros Tânia Regina Noquelli, Rogerio Silva e a Profa. Dra. Lia Bittencourt*

*Pela amizade, confiança e as conversas engraçadas. Sempre é bom ter pessoas como vocês ao meu lado. Muito obrigada pelos momentos de descontração.*

*A Marilde Aires Costa,*

*Pela sua paciência para me ensinar, pelo carinho de todos os dias e pelo apelido de Flor.*

*Ao funcionário Waldermaks Leite,*

*Obrigada pela sua paciência para me ensinar os procedimentos cirúrgicos, a manipulação, o respeito e o carinho para com os animais.*

*Aos funcionários Tomé Pimentel, Ivan Xavier, Ricardo Marques, Manoel Novais, Kleber Silva, Solange da Silva e Sandra Vieira,*

*Obrigada pela amizade e por toda ajuda na execução dos experimentos.*

*Ao Gilbertinho e ao Prof. Dr. Roberto Frussa*

*Pela ajuda com os cálculos e a pesagem do material utilizado nesta dissertação.*

*A Magda Bignotto,*

*Pela sua paciência e dedicação durante a realização desta pesquisa e pela realização das dosagens hormonais.*

*Aos funcionários técnicos-administrativos Valéria Azequino,  
Nereide Garcia, Julio Nascimento e Mara Vianna,*

*Muito obrigada pela amizade e pela ajuda constante nas dúvidas sobre a Pós-Graduação.*

*A Maria Cristina Jorge,*

*Pela sua paciência para atender sempre os meus pedidos e pelo carinho recebido na Biblioteca.*

*Ao Antonio da Silva Moraes e ao Leonardo Pimentel,*

*Pela ajuda e paciência constante para solucionar os problemas com os computadores, os vírus e todo o suporte de informática.*

*Ao Nelson da Silva, Sebastião da Silva e João Bosco,  
Por cuidarem da segurança do prédio e pela amizade.*

*Os meus mais sinceros agradecimentos a todos os alunos,  
funcionários e técnicos do Departamento de Psicobiologia da  
Unifesp,*

*Obrigada pelo acolhimento e pelo convívio nesses anos.*

*A Ffp e à Fapesp (Cepid)*

*O vosso auxílio financeiro à pesquisa foi importante e  
fundamental para a realização desta dissertação. Muito  
obrigada!*

*A sabedoria é algo mágico e conquistado.*

*A sua conquista requer paciência, dedicação e motivação*

*O que a torna mágica,*

*Assim como tudo na vida...*

*Cada conquista na vida é única*

*E, portanto, inesquecível.*

# SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	xxii
<b>Lista de figuras</b> .....	xxiii
<b>Resumo</b> .....	xxiv
<b>Abstract</b> .....	xxvi
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Sono - aspectos gerais .....	2
1.2 Arquitetura do sono .....	3
1.2.1 Ciclo vigília-sono nos seres humanos .....	3
1.2.2 Padrões eletrofisiológicos do sono nos ratos .....	6
1.3 Osteoartrite - considerações gerais .....	10
1.3.1 Definição .....	10
1.3.2 Etiopatogenia .....	11
1.3.3 Classificação da osteoartrite .....	12
1.3.4 Epidemiologia .....	12
1.3.5 Incidência .....	13
1.3.6 Fatores de risco .....	14
1.3.6.1 Idade .....	14
1.3.6.2 Etnia .....	14
1.3.6.3 Aspectos hormonais .....	15
1.3.6.4 Fatores nutricionais .....	16
1.3.6.5 Fatores genéticos .....	16
1.3.6.6 Obesidade .....	16
1.3.6.7 Sobrecarga na cartilagem articular .....	17
1.3.6.8 Fatores ocupacionais .....	17
1.3.6.9 Atividade física .....	18
1.4 Modelos animais de osteoartrite .....	19
1.4.1 Espontâneos .....	19
1.4.1.1 STR/ort .....	19
1.4.1.2 Envelhecimento natural e imobilização .....	20
1.4.2 Geneticamente modificados .....	22
1.4.2.1 ADAMTS-5 knockout .....	22
1.4.2.2 Catepsina K transgênica .....	22
1.4.2.3 IL-6 knockout .....	23

1.4.3	Cirúrgicos .....	23
1.4.3.1	Transecção do ligamento cruzado anterior .....	23
1.4.3.2	Meniscectomia .....	24
1.4.3.3	Ovarectomia .....	25
1.4.4	Substâncias químicas ou enzimáticas .....	25
1.4.4.1	TGF- $\beta$ .....	25
1.4.4.2	Iodocetato de sódio .....	26
1.5	Influências das condições dolorosas no sono em humanos .....	27
1.6	Influências das condições dolorosas no sono em modelos animais .....	30
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	Animais .....	40
4.2	Registro do ciclo vigília-sono .....	40
4.3	Cirurgia estereotáxica .....	41
4.4	Registro eletrocorticográfico (ECoG) .....	44
4.5	Esfregaço vaginal .....	47
4.6	Teste da placa quente .....	49
4.7	Desenvolvimento da osteoartrite em ratos .....	49
4.8	Histologia da articulação do joelho .....	51
4.8.1	Preparação do tecido .....	51
4.8.2	Coloração histológica e marcação da patologia .....	52
4.9	Coleta de sangue .....	52
4.10	Análise hormonal .....	53
4.11	Análise estatística .....	53
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
	Artigo 1: <i>Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis</i> .....	55
	Artigo 2: <i>Gender differences in sleep pattern of rats in an experimental model of osteoarthritis</i> .....	66
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>96</b>
	Artigo 1 .....	97
	Artigo 2 .....	102
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>133</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

OA	Osteoartrite
CTRL	controle
EEG	eletroencefalográfico
EMG	eletromiograma
ECoG	eletrocorticograma
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
NREM	do inglês <i>non rapid eye movement</i>
REM	do inglês <i>rapid eye movement</i>
SNC	sistema nervoso central
SOL	sono de ondas lentas
SP	sono paradoxal
IL-6	interleucina-6
TLCA	transecção do ligamento cruzado anterior
PSG	polissonografia
OVX	ovariectomia
TGF- $\beta$	fator de crescimento tumoral- $\beta$
D	Dia



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Hipnograma das fases do ciclo vigília-sono nos seres humanos . . . . .	5
<b>Figura 2</b>	Hipnograma do ciclo vigília-sono dos ratos . . . . .	8
<b>Figura 3</b>	Porcentagem da vigília, do sono de ondas lentas e do sono paradoxal nos ratos, durante um período de 24 horas . . . . .	9
<b>Figura 4</b>	Rato durante a vigília atenta (lado esquerdo) e durante o sono (lado direito) . . . . .	10
<b>Figura 5</b>	Ilustração do joelho normal (A) e do joelho com osteoartrite (B) . . . . .	10
<b>Figura 6</b>	Posições dos eletrodos usados para registro eletrocorticográfico: 1, eletrodo frontal esquerdo; 2, eletrodo frontal direito; 3, eletrodo occipital esquerdo; 4, eletrodo occipital direito . . . . .	41
<b>Figura 7</b>	Eletrodo e parafusos utilizados para registro eletrocorticográfico e eletromiográfico (A) e ilustração do posicionamento dos parafusos durante a cirurgia de implantação do eletrodo (B) . . . . .	42
<b>Figura 8</b>	Rato do grupo ad libitum nos primeiros dias após a cirurgia (A) e durante o período de adaptação ao cabo para registro de sono (B) . . .	43
<b>Figura 9</b>	Ilustração das gaiolas de Faraday que são utilizadas para minimizar as influências eletrostáticas externas durante a aquisição do registro de sono . . . . .	44
<b>Figura 10</b>	Ilustração de vigília (A), sono de ondas lentas (B) e sono paradoxal (C) . . . . .	46
<b>Figura 11</b>	Ilustração das fases do ciclo estral [Proestro (A); Estro (B); Metaestro (C); Diestro (D)] . . . . .	48
<b>Figura 12</b>	Ilustração do rato sobre a placa quente (A) e ao lamber a pata posterior em resposta ao estímulo nociceptivo (B) . . . . .	49
<b>Figura 13</b>	Ilustração da administração de iodoacetato de sódio no joelho esquerdo . . . . .	50
<b>Figura 14</b>	Ilustração do local da injeção intra-articular com o joelho flexionado a 90° graus . . . . .	51

## RESUMO

A osteoartrite (OA) é um dos grandes problemas de saúde e a sua prevalência tem aumentado nas últimas décadas. Ela se caracteriza pela degeneração da cartilagem articular e está associada com a dor crônica e os distúrbios de sono. Tem sido demonstrado que a relação entre a dor e o sono produz mudanças no padrão de sono e na percepção da dor. No entanto, os estudos eletrofisiológicos com modelos animais de dor ainda são limitados. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de analisar a arquitetura do sono e a sensibilidade dolorosa frente a um estímulo térmico em um modelo experimental de OA em ratos machos Wistar (Artigo 1), além de também avaliar a influência do gênero no padrão de sono e no perfil hormonal (progesterona, estradiol e testosterona) no modelo experimental de OA, tanto em ratos machos como em fêmeas (Artigo 2). Foram implantados eletrodos para registro do eletrocorticograma e do eletromiograma. A OA foi induzida por meio da administração intra-articular de iodoacetato no joelho esquerdo. Os registros de sono, com a duração de 12 horas cada, foram monitorados durante o período claro e escuro, tendo sido avaliados no início do estudo (antes da administração) e nos dias 1, 10, 15, 20 e 28 após a injeção do iodoacetato. Os animais com a OA foram comparados aos grupos SHAM (administração de veículo) e controle (não manipulado). No Artigo 1, avaliou-se ainda, em um grupo adicional de animais e nos mesmos dias, o limiar de dor por meio do teste da placa quente. Os resultados do Artigo 1 demonstraram que a OA induziu a uma redução significativa no limiar da dor térmica a partir do 10º dia até ao final do experimento. As análises dos registros de sono mostraram que os ratos machos OA tiveram alterações no padrão de sono, como a redução da eficiência de sono, do sono de ondas lentas, do sono paradoxal, assim como um aumento do número de despertares durante o período claro, quando comparado com o período basal e com os grupos SHAM e controle. Os resultados do Artigo 2 demonstraram que os ratos OA, independentemente do gênero, apresentaram uma fragmentação no padrão de sono com uma redução da eficiência de sono, do sono de ondas lentas e do sono paradoxal, bem como uma menor duração nos episódios de sono paradoxal. No entanto, os machos, em comparação às fêmeas, apresentaram menor eficiência de sono e de ondas lentas do sono no período escuro. Além disso, a OA afetou os níveis hormonais nos machos, uma vez que as concentrações de testosterona foram significativamente reduzidas em comparação com os grupos controle e SHAM. Nas fêmeas, a progesterona e o estradiol permaneceram inalterados durante o estudo. Os resultados sugeriram que o modelo com a OA acarreta marcantes alterações da arquitetura de sono, tanto nos machos como nas fêmeas, associadas à menor limiar de dor e níveis de hormônios (sexuais).

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a major health issue and its prevalence has increased in the past decades. OA is characterized by the degeneration of joint cartilage, a condition associated to chronic pain and sleep disturbances. It has been shown that the relation between pain and sleep produces adverse effects in the sleep pattern and in pain perception. Because electrophysiological investigations in animal pain models are still limited the current study purported to examine sleep architecture and sensitivity to thermal stimulation within the framework of an experimental OA model in male rats (Paper 1). And also, to assess how this OA model influences the sleep pattern and hormonal profile (progesterone, estradiol and testosterone) in both genders (Paper 2). Wistar rats were used in all of the experimental protocols. Electrodes were implanted for the recording of electrocortigrams. OA was induced by means of intra-articular administration of iodineacetate in the left knee. Sleep recordings were monitored during the light and dark periods (12h each) and these were analyzed at the beginning of the study before administration iodineacetate and on days 1, 10, 15, 20 and 28 after the injection of iodineacetate. OA animals were compared to SHAM groups (vehicle) and controls (not manipulated). Paper 1 also assessed the threshold of pain in the hot plate test in an additional group of animals on the same days. The results of Paper 1 showed that OA induced a significant reduction in the threshold of thermal pain from the 10<sup>th</sup> day to the end of the experiment. Analysis of the sleep recordings showed that the male OA rats suffered alteration in the sleep pattern like reduction in the efficiency of sleep, slow wave sleep, paradoxical sleep, but increased number of awakenings during the light period when compared to the baseline period, SHAM groups and controls. Results collected from paper 2 show that OA rats, regardless of the gender, presented fragmentation in the sleep pattern with reduced sleep efficiency, slow wave sleep and paradoxical sleep, as well as shorter paradoxical sleep episodes. However, in the dark period, male rats presented lower sleep efficiency and slow wave sleep in comparison to females. In addition, OA affected concentrations of male hormones, once those of testosterone were significantly reduced in comparison to controls and SHAM. In females, progesterone and estradiol remained unaltered throughout the investigation. Our results suggest that the OA model does promote marked alterations in sleep architecture in males as well as in females, and is associated to lower pain thresholds and smaller levels of hormones in the blood.

# *1 INTRODUÇÃO*

---

## **1.1 Sono – Aspectos gerais**

A concepção do sono como um fenômeno simples, passivo e uniforme, do início deste século, foi reformulada a partir de 1969, com a descoberta dos eletroscilogramas humanos por Berger, que os denominou de eletroencefalogramas (EEG-denominação específica para os registros feitos por intermédio de elétrodos situados sobre o escalpo) e, em 1937, por Loomis, Harvey e Hobaert (Berger, 1969), que descreveram as oscilações interativas dos potenciais eletrencefalográficos humanos, registrados durante várias horas de sono.

Em 1953, Aserinsky e Kleitman descreveram a ocorrência cíclica de movimentos oculares rápidos durante o sono, associados ao aumento da atividade cortical. No entanto, Dement e Kleitman, em 1957, demonstraram que a atividade ocular ocorria simultaneamente à fase dessincronizada do sono e que ela estava relacionada com o conteúdo dos sonhos no ser humano, tendo a denominado de “sono de movimentos oculares rápidos” (REM, do inglês *Rapid Eye Movements*).

O padrão de sono observado no sono REM por Dement e Kleitman (1957) também foi identificado por Jouvett nos gatos, tendo ele o chamado de “sono paradoxal”, uma vez que o registro eletrencefalográfico cortical é semelhante ao alerta, apesar da atonia muscular que sugeria um sono profundo (Jouvett, 1962). Outros nomes, como sono paradoxal, sono ativo, sono rápido ou parassono, também foram usados.

O sono de ondas lentas (SOL, sono quieto, sono lento ou profundo) é assim denominado por suas características eletrencefalográficas evidenciarem um potencial elétrico rítmico inibitório-excitatório, gerado por neurônios talâmicos e corticais, formando ondas sincronizadas de alta amplitude e baixa voltagem chamadas de ondas lentas ou delta (Steriade, 1992).

As ondas elétricas cerebrais sofrem alterações que configuram as diferentes fases do sono, as quais podem ser evidenciadas pela avaliação continuada de diversos parâmetros funcionais como a respiração, os movimentos

dos olhos e a mobilização dos músculos do pescoço e da face. Estas que se repetem a intervalos mais ou menos regulares, constituem os ciclos de sono (Timó-laria, 1985). A descoberta dos ciclos de sono despertou considerável interesse pelos mecanismos neurais envolvidos na geração e na manutenção do ciclo vigília-sono.

Inicialmente, acreditava-se que existiam centros responsáveis pela indução de sono. Este conceito foi abandonado, pois sabe-se que o ciclo vigília-sono, incluindo as características específicas observadas nas suas diferentes fases, depende da integração de vários sistemas neurais.

Não é fácil estabelecer a seqüência das fases do sono, sobretudo porque cada uma, longe de ser imutável, sofre oscilações que, por curtos períodos, pode ultrapassar os seus próprios limites, compondo-se com a fase precedente ou subsequente (Timó-laria, 1985).

## **1.2 Arquitetura do Sono**

### **1.2.1 Ciclo vigília-sono nos seres humanos**

O ciclo vigília-sono depende de um ritmo circadiano, o qual é gerado pelo núcleo supraquiasmático e modulado por estímulos externos (como por exemplo, a luz). Nos seres humanos, esse ciclo é de 24 horas, sendo oito horas de sono alternadas com um período de aproximadamente 16 horas de vigília.

Durante o período de sono, normalmente ocorrem de quatro a seis ciclos com duração de 90 a 100 minutos cada, sendo cada um deles composto pela fase de sono NREM com uma duração de 45 a 85 minutos, e pela do sono REM de 5 a 45 minutos. A primeira fase de sono que se manifesta nos indivíduos normais é o NREM, o que é caracterizado pela desaceleração progressiva da atividade cortical. O sono NREM é composto por quatro estágios nos quais ocorre

progressiva desaceleração da frequência e o aumento da amplitude da onda observada no eletroencefalograma (EEG) (Rechtschaffen e Kales, 1968).

O Estágio 1 é considerado uma fase de transição entre a vigília e o sono podendo ser alcançado após alguns minutos do início do registro. Neste estágio nota-se o desaparecimento do ritmo alfa (característico da vigília), a atenuação da atividade elétrica cerebral caracterizada pela presença do ritmo teta (3 a 7Hz) (Figura 1), e a presença de movimentos oculares lentos. No estágio 1 do sono também se pode observar ondas agudas occipitais com uma amplitude de 20 a 75 microvolts e com uma duração de 80 a 120 milissegundos. A transição do estágio 1 para o estágio 2 é caracterizada pelo aparecimento das ondas agudas do vértice, que são ondas com projeção nas regiões centrais, com uma duração de 50 a 200 milissegundos e com uma amplitude maior do que os 250 microvolts (Yasoshima et al., 1984).

O Estágio 2 é caracterizado pela sincronização da atividade elétrica cerebral e pela ocorrência de grafoelementos típicos deste estágio, como os fusos do sono e os complexos K (Figura 1). Os fusos do sono têm origem no tálamo e são disparos neuronais súbitos (de 0,5 a 1,5 segundo) com uma frequência entre os 11,5 e os 14,5Hz (Elingson, 1982; Werth et al., 1997). O complexo K consiste numa seqüência de ondas com duas ou três fases com morfologia aguda, uma duração maior do que 0,5 segundo, uma amplitude geralmente maior que 75 $\mu$ V, e que apresenta projeções nas regiões centrais.

Os Estágios 3 e 4 (sono de ondas lentas - SOL) são caracterizados pelo ritmo delta (0,5 a 2 Hz) e pela baixa atividade neuronal. A presença de 20 a 50% de ondas delta com uma amplitude superior a 75 $\mu$ V caracteriza o estágio 3, e a presença de mais de 50% dessas ondas determina o estágio 4 (Figura 1).

O Sono REM é representado pela hipotonia, que pode progressivamente acentuar-se desde o início do sono, atinge o seu máximo após 70 a 120 minutos, quando tem início o sono REM. Pode-se, em muitos indivíduos,

observar um padrão eletroencefalográfico característico dessa fase, denominado ondas em dente de serra de frequência entre os 2 e os 6Hz e com maior amplitude nas regiões centrais (Schwartz, 1962; Yasoshima et al., 1984). Este estágio do sono é caracterizado por apresentar eventos tônicos (presentes durante todo o episódio de sono REM) e fásicos (intermitentes). Os principais eventos são a hipotonia muscular, a dessincronização do EEG e a perda do controle autonômico da temperatura. O evento fásico característico do sono REM é o movimento ocular rápido, mas, além deste, pequenos abalos musculares, ondas ponto-genículo-occipitais (PGO), entre outros eventos, também podem ser observados (Aserinsky e Kleitman, 1953; Dement e Kleitman, 1957). A frequência e a duração dos episódios de sono REM aumentam do primeiro ao último ciclo de sono, podendo durar até uma hora no fim da noite (Figura 1).

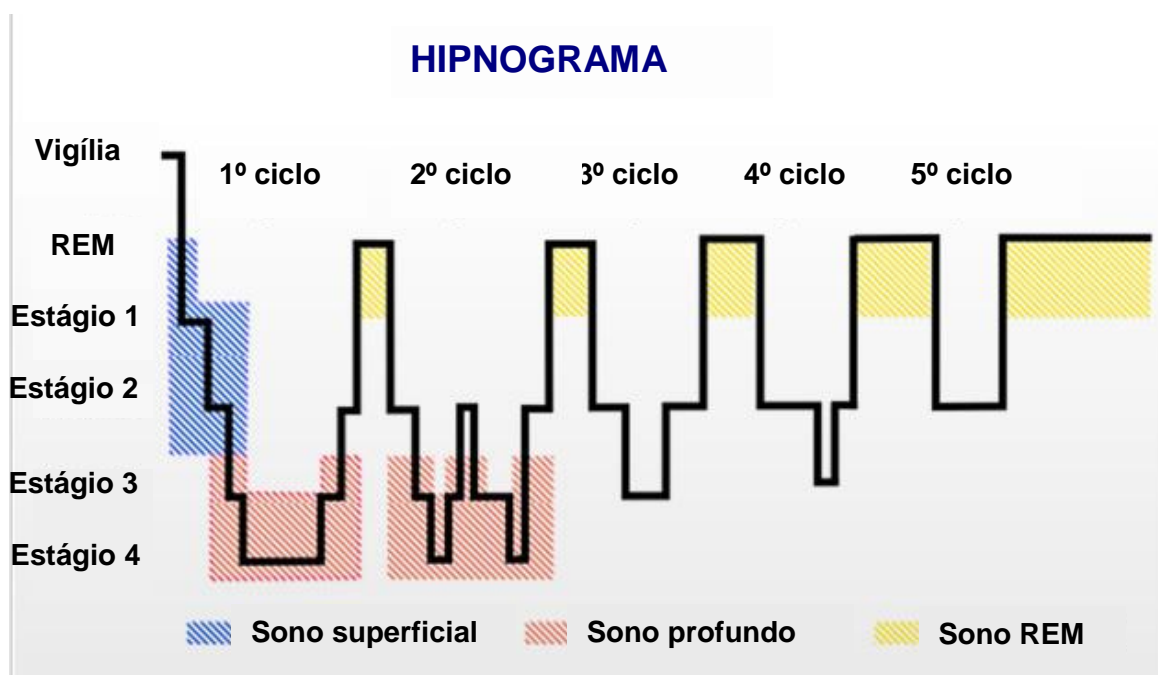


Figura 1: Hipnograma das fases do ciclo vigília-sono nos seres humanos.



### **1.2.2 Padrões eletrofisiológicos do sono nos ratos**

Na década de 70 foi realizada uma detalhada e minuciosa análise das várias fases do sono dos ratos, a qual revelou a existência de semelhanças, muito maior do que se acreditava até então, com o sono dos seres humanos (Timo-laria et al., 1970). Hoje, graças às pesquisas tanto com seres humanos quanto com animais, sabe-se que diferentes regiões do sistema nervoso central (SNC) apresentam oscilações elétricas, as quais permitem distinguir as diversas fases do sono e a sua repetição cíclica em função do tempo (Timo-laria, 1985) que, nos ratos distingue-se conforme descrito em seguida.

**Vigília atenta:** esta é constituída predominantemente por ondas ou ritmo theta. Na área cortical 10, geralmente, o padrão eletroscilográfico predominante é o da dessincronização tônica e contínua que, durante a intensificação do grau de alerta pode aumentar, baixando ainda mais a voltagem e aumentando a freqüência dos potenciais. A dessincronização tônica da área 10 e a sua intensificação quando o grau de alerta se eleva indicam que não só que a ativação desta área aumenta muito em função do grau de alerta, mas também que ela se mantém tonicamente ativa. A Figura 4 ilustra o estado de vigília no rato.

**Vigília relaxada:** Os potenciais tendem a sincronizar em todas as regiões cujos eletroscilogramas são registrados. Durante alguns segundos, as ondas theta dão lugar às ondas chamadas delta, as quais são de alta voltagem e de baixa freqüência (abaixo de 5,5Hz). Pode-se dizer que isto ocorre quando há uma diminuição no grau de alerta do animal, a qual se manifesta pelo desaparecimento das ondas theta e a imobilidade. Durante o relaxamento (isto é, da redução do nível de atenção) a movimentação é mínima. A ocorrência de ondas theta indica o retorno da atenção (Timo-laria, 1985).

**Sono de ondas lentas (SOL), fase SS:** Geralmente, os eletroscilogramas do gato, do rato e de outros animais de experimentação são detectados por elétrodos dispostos em derivações bipolares longas, comumente

entre um situado no córtex frontal e outro no occipital. Além disso, costuma-se dividir o ciclo vigília-sono dos ratos em “sono de ondas lentas” (SOL) ou “NREM” e “sono paradoxal” ou “REM”. O SOL se constitui de várias fases em ambas as espécies, assim como ocorre no sono humano, compondo-se de fases com *fusos*, *fusos e ondas delta* e *só ondas delta*.

Quando o rato começa a adormecer, as ondas características do alerta relaxado transformam-se abruptamente, predominando os potenciais de alta freqüência (12 a 25Hz) denominados *fusos de sono*. Este período denomina-se fase  $SS_I$ , isto é, fase I do SOL. Os fusos do sono do rato são semelhantes aos do sono humano e do gato e caracterizam a primeira fase do SOL, isto é, das fases em que os potenciais eletroscilográficos geralmente se expressam por meio dos potenciais de alta voltagem, predominando esses fusos nas regiões frontais e parietais no rato e em algumas regiões subcorticais.

**Sono de ondas lentas, fase  $SS_{II}$ :** A fase  $SS_I$  é seguida pela  $SS_{II}$  que é caracterizada eletroscilograficamente pela presença das ondas delta (freqüência abaixo de 5,5Hz) acopladas ou não aos fusos. Nesta fase o sono é mais profundo do que na anterior, visto que o limiar para despertar se eleva significativamente. Assim como a fase  $SS_I$ , a  $SS_{II}$  também ocorre no homem e no gato.

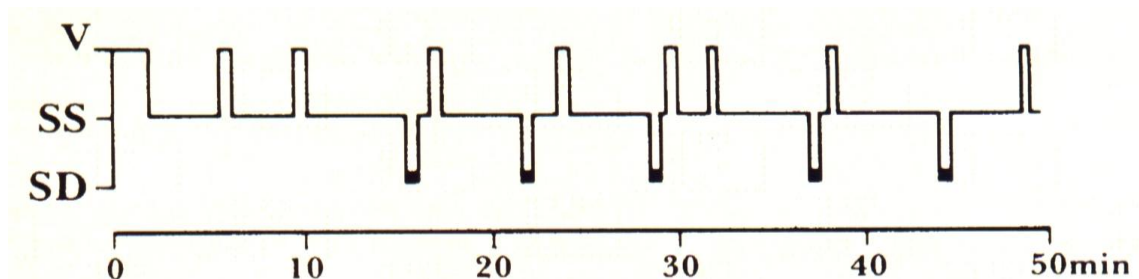
**Sono de ondas lentas, fase  $SS_{III}$ :** Nesta fase os fusos cessam, restando apenas as ondas delta. Ela também está presente no homem e no gato, e é a do sono mais profundo.

**Sono pré-paradoxal (ou fase intermediária):** Frequentemente a fase  $SS_{III}$  é seguida por um período em que ocorrem fusos no neocórtex, porém as ondas theta predominam no hipocampo. As ondas theta no hipocampo durante o sono caracterizam o sono paradoxal, mas os fusos corticais revelam presença do SOL. Gottesmann (1973) a chamou de *fase intermediária*.

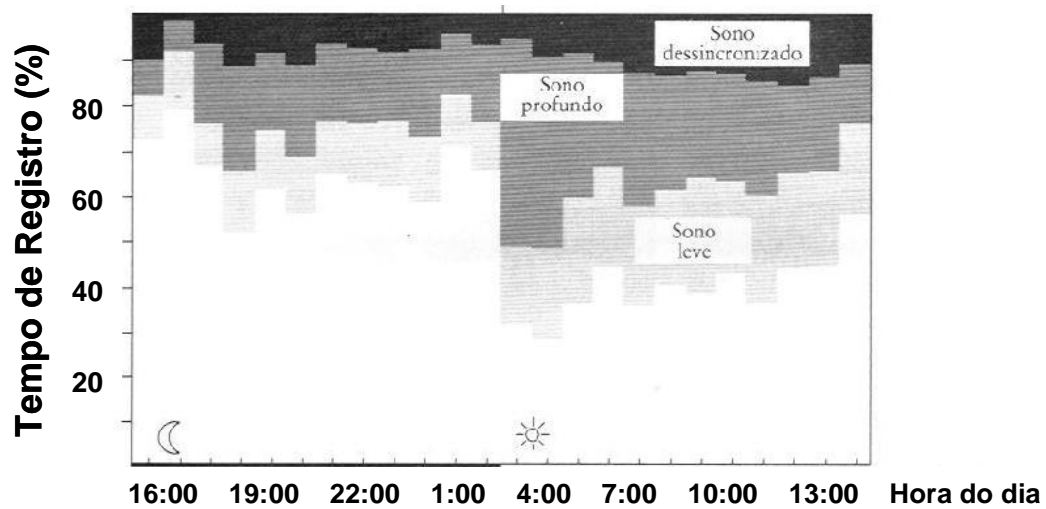
**Sono Paradoxal:** A dessincronização é predominante nas regiões mais frontais, ao passo que no hipocampo e no núcleo ventro-lateral do tálamo

predominam as ondas theta. No sono paradoxal de ambas as espécies também ocorre a movimentação de várias partes do corpo, o que pode ser interpretado como atividade onírica. Neste sono a movimentação que caracteriza a atividade onírica é pouco intensa, o que não é muito comum, porém geralmente os movimentos do rosto e as vibrissas dos olhos e da cabeça são bem evidentes durante o sono paradoxal do rato. Segundo Timo-Iaria (1985), no rato, os episódios de sono paradoxal duram em média dois minutos, podendo ainda limitar-se a dois ou três segundos, constituindo 15% do seu sono total.

Por se tratar de um animal naturalmente predado quando inserido em seu *habitat* natural, o rato possui um padrão de sono polifásico (Figura 2), apresentando um ciclo vigília-sono freqüentemente irregular. Os primeiros ciclos são incompletos, mas depois se regularizam, terminando quase sempre com um despertar breve, cuja duração em geral não passa de um segundo. Este breve despertar parece ser característico dos animais naturalmente predados (roedores), ao passo que os predadores (homem, gato, cão) raramente despertam entre um ciclo e o outro, apresentando um padrão de sono monofásico. No entanto, breves períodos de vigília ou pelo menos de forte superficialização do sono (microdespertares) também ocorrem nos seres humanos. É possível que no rato esses curtos períodos de vigília tenham por finalidade explorar olfativamente o ambiente, a fim de identificar a presença de algum eventual predador nas redondezas (Andersen et al., 2001).



**Figura 2:** Hipnograma do ciclo vigília-sono dos ratos (Timo-Iaria, 1985).



**Figura 3:** Porcentagem da vigília, do sono de ondas lentas e do sono paradoxal nos ratos, durante um período de 24 horas (Van Luijtelaaar e Coenen, 1983).

Durante o período claro concentram-se, freqüentemente, os episódios do sono, enquanto que a vigília predomina no período escuro (Figura 3). A figura mostra graficamente a distribuição dos estados de sono do rato ao longo das 24 horas do dia, segundo Van Luijtelaaar e Coenen (1983). Segundo estes autores, o rato dorme cerca de 62% do período claro e 33% do escuro, sendo que, durante a vigília, ele realiza as suas atividades vitais e sociais (alimentação, procriação, interação social e exploração do ambiente). Somando-se os períodos de sono, verifica-se que o rato dorme 47,5% das 24 horas, sendo 17,1% com sono leve (fases  $SS_I$  e  $SS_{II}$ ), 21% com profundo ( $SS_{III}$ ) e 9,4% com paradoxal (Timo-laria, 1985) (Figura 3).



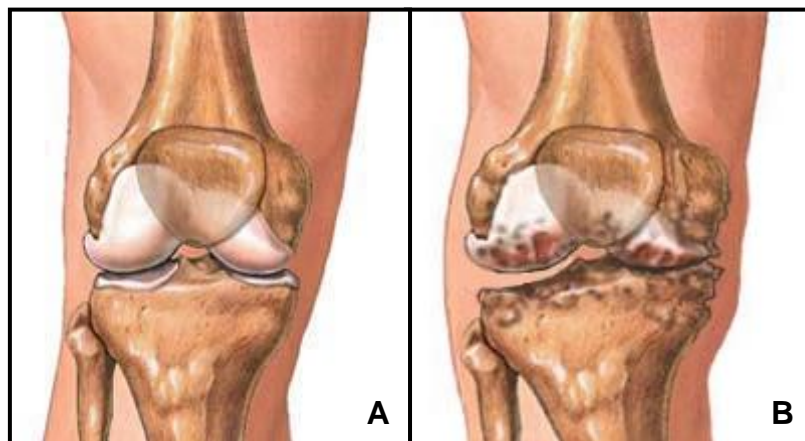
**Figura 4:** Rato durante a vigília atenta (lado esquerdo) e durante o sono (lado direito).

### **1.3 Osteoartrite - Considerações gerais**

#### **1.3.1 Definição**

A osteoartrite (OA) ou osteoartrose é a doença mais comum no âmbito reumatológico, a qual pode ser definida como uma condição degenerativa que afeta as articulações sinoviais (Figura 5). A prevalência aumenta com a idade, principalmente a partir da sexta ou sétima década de vida (Greve e Plapler, 2001).

A OA tem sido considerada uma doença essencialmente não-inflamatória e, sim, degenerativa, de evolução crônica, que afeta as articulações e lesiona a cartilagem com neoformação óssea nas margens articulares (esclerose subcondral e formação de osteófitos). Os fatores químicos, enzimáticos e genéticos também contribuem para a sua etiologia (Menezes, 1999).



**Figura 5:** Ilustração do joelho normal (A) e do com a osteoartrite (B).

O paciente costuma queixar-se de rigidez articular ao acordar pela manhã, a qual diminui com os primeiros movimentos. As parestesias podem estar presentes e algumas articulações apresentam crepitação, já outras articulações, como as dos dedos e dos joelhos, apresentam deformidades. Os sinais e os sintomas clássicos de inflamação como o rubor, o calor, o edema e a dor, podem ou não estar presentes. Sendo assim, muitos pacientes acometidos pela OA são sintomáticos, relatam dor e, aproximadamente, 30% deles relatam dor noturna (Dieppe e Lim, 2000).

Têm sido realizados estudos na tentativa de se investigar as interrelações estruturais da dor, nos quais se faz o uso das técnicas de imagem, como por exemplo, a ressonância magnética que mostra as características anatômicas da associação da dor comum com a presença dos osteófitos, do edema e das sinovites (Fernihough et al., 2004).

### **1.3.2 Etiopatogenia**

A OA é o resultado de eventos mecânicos ou biológicos que interferem com o frágil equilíbrio entre a produção e a degradação do tecido cartilaginoso e do osso subcondral. Ela acomete todos os tecidos da articulação e se manifesta por alterações morfológicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas.

Os condrócitos ocupam menos de 5% do volume total da cartilagem, sendo que o conteúdo de água, a compressividade, a resistência e a permeabilidade da matriz do colágeno e dos proteoglicanos atuam reduzindo a sobrecarga e o atrito na articulação. As alterações biomecânicas da cartilagem podem resultar da modificação da sua estrutura. Inversamente, como a principal função das cartilagens é absorver os choques e reduzir a fricção entre os ossos, as modificações que ocorrem na compressividade e na elasticidade da cartilagem em função da OA tornam a articulação mais propensa a traumas (Xu et al., 1998).

Nas fases iniciais da OA, os condrócitos estão ativados, mas apesar da biossíntese aumentada, com o tempo ocorre depleção dos componentes da matriz. O acúmulo de água pelos proteoglicanos remanescentes contribui para a sua fragilização e a conseqüente redução da resistência da cartilagem à compressão (Kuettner e Thonar, 1998). O processo culmina com a fibrilação, a ulceração, a perda da cartilagem, a formação de osteófitos, a esclerose do osso subcondral e a formação de cistos subcondrais.

### **1.3.3 Classificação da AO**

A OA pode estar associada a múltiplos fatores, incluindo os genéticos, os metabólicos, os traumáticos, os quais estão relacionados com o desenvolvimento ou com as patologias ósseas, articulares, endócrinas ou sistêmicas. Assim, a OA pode ser considerada primária ou secundária. Também se considera como difusa a OA que acomete as mãos e alguma articulação de carga. A OA localizada, por sua vez, acomete preferencialmente as interfalangeanas proximais e/ou distais das mãos, a primeira metatarsofalangeana dos pés, os joelhos, os quadris, a coluna cervical ou a lombar.

Os critérios diagnósticos propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia para a OA do joelho (Altman et al., 1986), do quadril (Altman et al., 1991), e das mãos (Altman et al., 1990), visam diferenciar esta patologia das outras, sendo também úteis para o recrutamento de pacientes para estudos clínicos. Esses critérios não podem ser considerados em casos isolados ou em estudos populacionais (Coggon et al., 2005).

### **1.3.4 Epidemiologia**

As manifestações clínicas da OA podem ser intermitentes ou ocasionais, verificando-se uma precária correlação entre as manifestações clínicas,

os dados radiológicos e a gravidade da patologia (Croft et al., 1994; Nevitt, 1996). Considera-se a OA sintomática quando, além das evidências radiológicas, ocorre a manifestação de dor na maior parte dos dias, durante um mês do último ano. Este critério apresenta como limitação o fato de haver casos com limitação articular, a despeito da ausência da manifestação da dor. No caso da OA de joelhos ou de mãos, considera-se, como evidência radiológica da OA, a presença dos osteófitos. Em relação ao quadril, a presença dos osteófitos deve ser associada ao estreitamento articular. A gravidade do acometimento radiológico tem como base a presença dos osteófitos, a redução do espaço articular, a esclerose subcondral e presença de atrito ósseo (Kellgren e Lawrence, 1963).

### **1.3.5 Incidência**

Alguns estudos epidemiológicos indicam que a incidência anual da OA sintomática do quadril é de 47 a 88 casos por 100.000, enquanto a dos joelhos é de 164 a 240 casos por 100.000 (Wilson et al., 1990; Oliveria et al., 1995).

As mulheres na menopausa ou em idade mais avançada apresentam maior tendência do que os homens a desenvolver a OA de joelhos, quadris e mãos. O estudo de Chaisson e colaboradores (1997) evidenciaram que mulheres com uma idade média de 71 anos desenvolvem alterações radiológicas sugestivas da OA do joelho na razão de 2% ao ano e sintomática de 1% ao ano, sendo que nos homens a razão é de, respectivamente, 1,4 e 0,7% ao ano. A incidência da OA de mãos, de acordo com os critérios adotados é estimada como de 2 a 4% ao ano (Bagge et al., 1992; Carman et al., 1994; Chaisson et al., 1997). Os estudos longitudinais sobre a OA de mãos evidenciam que o seu acometimento e a sua progressão aumentam com o avançar da idade (Plato e Norris, 1979; Sowers et al., 1991).



### **1.3.6 Fatores de risco**

A OA geralmente resulta da interação entre fatores sistêmicos e locais (Doherty et al., 1983) que atuam de forma isolada tanto na incidência como na progressão de uma patologia (Sharma et al., 2006).

#### *1.3.6.1 Idade*

A idade constitui o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da OA, embora esta possa se iniciar precocemente de forma assintomática e imperceptível. No entanto, com o envelhecimento, a cartilagem hialina das articulações apresenta alteração na função dos condrócitos, nas propriedades dos seus constituintes estruturais, respondendo diferentemente às citocinas e aos fatores de crescimento. Além disto, precedendo a instalação da OA, evidencia-se falência dos mecanismos neurais e musculares que protegem a articulação com o comprometimento da percepção consciente e inconsciente da posição (Cicutini et al., 2004), a fraqueza muscular e a frouxidão ligamentar (Sharma et al., 2001), em especial nos idosos sedentários (Cahue et al., 2004).

Nos joelhos instalam-se desvios em valgo ou em varo, lesão de meniscos com maior frequência em mulheres, tendo como fator de risco a idade, independentemente de fatores confundidores como, peso e altura (Hart et al., 1999). O fator idade também se mostrou importante no desenvolvimento de evidências radiológicas de OA de mãos (Kallman et al., 1990).

#### *1.3.6.2 Etnia*

Com base em estudos epidemiológicos americanos, diferenças étnicas no que se refere à prevalência da OA entre os afro-americanos e os caucasianos é controversa (Jordan et al., 1996; Tepper e Hochberg, 1993). Alguns

estudos sugerem um aumento da prevalência da OA de joelhos nas mulheres afro-americanas e quadril nos homens afro-americanos, os quais apresentam formas mais grave e bilaterais de manifestação da OA (Anderson e Felson, 1988; Jordan et al., 1996; Clark et al., 1999). Apesar das diferenças étnicas na manifestação da OA poderem ser influenciadas por aspectos socioeconômicos e estilo de vida, a participação dos fatores biológicos e genéticos tem sido evidenciada.

#### *1.3.6.3 Aspectos hormonais*

Independentemente da influência do estrógeno sobre as diversas estruturas articulares e o osso, ainda é controverso se a reposição estrogênica após a menopausa pode proteger contra a OA de joelhos (Felson e Zhang, 1998; Zhang et al., 1998) e quadril (Nevitt et al., 1996). Wluka e colaboradores (2001), em um estudo transversal, constataram por meio de ressonância nuclear magnética que o volume da cartilagem era maior nas usuárias de estrógeno do que nas não-usuárias.

No que se refere ao efeito da densidade óssea no desenvolvimento da OA, as mulheres com OA no joelho tendem a perder menos massa óssea nos três anos que se sucedem à menopausa, e apresentam um menor remodelação óssea do que as mulheres mais jovens. Esta descoberta foi evidenciada pelos níveis séricos da osteocalcina (Sowers et al., 1991).

Diversos estudos têm constatado a relação direta existente entre o risco de desenvolver a OA e o nível da densidade mineral óssea no que se refere ao desenvolvimento dos osteófitos, assim como, também, as manifestações precoces da OA são menos evidentes nos casos de osteoporose (Hannan et al., 1993; Hart et al., 1994; Nevitt et al., 1995; Burger et al., 1996; Zhang et al., 2000).

#### *1.3.6.4 Fatores nutricionais*

Embora seja controverso o papel dos fatores nutricionais na OA (McAlindon et al., 2005), a vitamina C parece retardar a sua evolução, mesmo na ausência de evidências radiológicas (Lane et al., 1993).

No que se refere à carência de vitaminas, a falta da vitamina D constitui fator de risco para a progressão da OA de joelhos, enquanto que a deficiência da vitamina K acarreta perda da cartilagem articular e propicia o desenvolvimento dos osteófitos (Neogi et al., 2006). No entanto, não se evidenciou que a administração da vitamina D possa impedir o surgimento de novas lesões articulares no joelho (McAlindon et al., 1996) ou no quadril (Lane et al., 1999).

#### *1.3.6.5 Fatores genéticos*

A associação dos fatores genéticos com a OA tem sido confirmada por diversos estudos, tanto para as formas comuns como para as raras da doença, correspondendo pelo menos a 50% dos casos da OA de mãos, quadril e, em menor porcentagem, aos casos nos joelhos (Spector et al., 1994; Jimenez et al., 1998).

Exemplos de genes mutantes incluem os que codificam colágeno, proteínas da matriz e moléculas que atuam na função da cartilagem (Zhang e Doherty, 2005). A tendência dos estudos genéticos atuais tem sido a de investigar características da estrutura da cartilagem hialina, em especial, o seu volume (Hunter et al., 2003; Zhai et al., 2005).

#### *1.3.6.6 Obesidade*

A obesidade constitui um importante fator de risco para a instalação e para a progressão da OA de joelhos. Felson e colaboradores (1992) sugeriram que existe um maior envolvimento do sexo feminino do que do masculino em

relação à OA e à obesidade, fato este que também já foi demonstrado por Tepper e Hochberg (1993). Estes autores demonstraram que a perda de apenas 5 kg de peso corporal já é suficiente para reduzir o risco da OA de joelhos em 50% nas mulheres obesas. Carman e colaboradores (1994) descreveram que existe a participação de distúrbios metabólicos, dos glicídeos ou dos lipídeos no desenvolvimento da OA.

#### *1.3.6.7 Sobrecarga na cartilagem articular*

A relação causa-efeito entre a distribuição da carga e as alterações mecânicas da articulação, constitui um fator limitante na avaliação da contribuição desse fator para a instalação da OA. Um exemplo da influência dos fatores mecânicos na articulação é o que se pode constatar nos desalinhamentos da articulação fêmuro-tibial (Sharma et al., 2001) e, em menor grau, da patelo-femoral (Cahue et al., 2004). Com o avançar da idade, em especial nas mulheres, aumenta a mobilidade da tíbia em relação ao fêmur no plano frontal ou lateral (varo-valgo) (Sharma et al., 1999). Foi demonstrada, respectivamente, a correlação entre o grau de desalinhamento, tanto em varo como em valgo, e a perda anual de cartilagem fêmuro-tibial medial e lateral (Cicutini et al., 2004). O alinhamento dos joelhos em relação ao quadril e ao tornozelo, e os aspectos funcionais como fraqueza dos quadríceps e o encurtamento do isquiotibial, parecem contribuir para um pior prognóstico (Slemenda et al., 1998).

#### *1.3.6.8 Fatores ocupacionais*

Os movimentos repetitivos, que promovem fadiga de grupos musculares que estabilizam as articulações, podem influenciar o desenvolvimento da OA. Exemplos disso são os movimentos repetitivos em pinça entre o primeiro e o segundo quirodáctilos, o ajoelhar ou o ficar de cócoras carregando peso

(Lawrence, 1961; Maetzel et al., 1997). Este aspecto foi constatado na OA das mãos em trabalhadoras da indústria têxtil (Hadler et al., 1978), nos joelhos em trabalhadores braçais (Felson et al., 1991) e nos quadris de trabalhadores rurais (Coggon et al., 1998). No entanto, atividades ocupacionais que obrigam a subir escadas, a andar em solo irregular, a sentar-se e a levantar-se repetidamente ou a ficar em pé por períodos prolongados, não demonstraram ser um risco para o desenvolvimento da OA (Coggon et al., 1998).

#### *1.3.6.9 Atividade física*

Entre as atividades esportivas que constituem fator de risco para desenvolver a OA, destacam-se as que demandam impacto articular agudo e intenso com superfícies ou equipamentos (Buckwalter e Lane, 1997), como ocorre com os jogadores de futebol, cujos joelhos estão sujeitos a impacto, torções e traumas cumulativos. Não se pode afirmar que a corrida ou a atividade física diária favoreça a OA de joelhos (Panush et al., 1986; Lane et al., 1993; Hannan et al., 1993; Spector et al., 1994; Hart et al., 1999). No entanto, uma atividade física intensa e prolongada, em associação com a idade acima dos 60 anos, pode favorecer o surgimento da OA nos joelho (McAlindon et al., 1999).

O impacto da perda do condicionamento físico sobre as manifestações da OA há que se considerar os fatores confundidores como, por exemplo, a idade, a obesidade, as comorbidades, a depressão e o abandono (Ormel et al., 2002). Além disto, o grau de força muscular, a intensidade da dor e o preparo físico anterior, influenciam a capacidade funcional dos pacientes com a OA de joelho (O'Reilly et al., 1998; Rejeski et al., 2001). Uma melhor condição física basal atua como fator protetor para a gravidade do acometimento articular pela OA, controlando-se os dados para a idade, o índice de massa corpórea, a gravidade da dor, a força muscular e o estado mental (Sharma et al., 2003).

## **1.4 Modelos animais de osteoartrite**

Um dos aspectos limitantes para o estudo da OA, nos seres humanos, é a inexistência de métodos objetivos e confiáveis para avaliar a evolução da progressão da doença por meio de estudos clínicos. As dificuldades incluem a não disponibilidade de tecido para análise histopatológica, em particular nas fases iniciais da doença, a ausência de marcadores biológicos confiáveis, além da não padronização em definitivo de métodos de imagem, tanto da radiografia quanto da ressonância magnética. Desta forma, modelos experimentais com animais continuam sendo amplamente utilizados, tanto para a compreensão dos aspectos fisiopatológicos da doença, como para a avaliação pré-clínica de novos fármacos e terapias. De forma geral, estes modelos podem ser classificados como espontâneos, geneticamente induzidos, cirúrgicos ou por injeções de substâncias químicas na articulação. Não existe atualmente um modelo ideal que englobe de forma precisa todos os aspectos da doença humana, e cada modelo animal proposto apresenta vantagens e desvantagens (Ameye e Young, 2006). Alguns modelos animais mais comumente utilizados na literatura são descritos a seguir.

### **1.4.1 Espontâneos**

Os animais que desenvolvem a OA espontaneamente são, talvez, os que melhor expressam a lenta evolução humana. Contudo exigem um tempo muito longo de observação e apresentam uma progressão variável (Silva Junior, 2007).

#### **1.4.1.1 STR/ort**

O progenitor do modelo STR/1N foi realizado pelo Dr. George Jay, em 1951, com camundongos mutante do gene STR/1N, decorrente da geração do F29 (Sokoloff e Barile, 1962; Mason et al., 2001). A linhagem do STR/ort em camundongos foi obtida a partir da ancestral materna do STR/1N. Uma série de

artigos realizados por Silberberg e Silberberg apresentaram evidências de que o desenvolvimento da OA nos ratos é influenciada por uma variedade de fatores nutricionais e hormonais (Silberberg e Silberberg, 1941, 1950, 1952, 1958a, 1958b, 1961, 1963ab). Em todos os estudos destes autores, os camundongos machos apresentaram uma maior incidência de degeneração do que as fêmeas, sendo que os côndilos mediais foram os mais afetados (Sokoloff, 1956). No entanto, em um estudo piloto com ratos machos castrados e fêmeas ovariectomizadas STR/ort não foi observado nenhum indício, em ambos os gêneros, de que o desenvolvimento da OA dependa dos hormônios sexuais nesse modelo (Chambers et al., 1999).

Recentemente, Regan e colaboradores (2005) observaram que uma espécie de radicais livres está diminuída na cartilagem humana com a OA. Isto também foi observado na cartilagem de camundongos e de ratos da linhagem STR/ort mostradas na histologia da OA. Estes dados sugerem que a falta de controle na reação ao oxigênio pode desempenhar um papel para o início e na fisiopatologia da OA (Regan et al., 2005).

#### *1.4.1.2 Envelhecimento natural e Imobilização*

Ohta e colaboradores (1981) realizaram a imobilização da pata posterior direita de coelhos com idades diferentes (um mês, um ano e dois anos e cinco meses) por um período de três a nove semanas. Os autores observaram que nos imobilizados com gesso nenhuma alteração significativa foi notada nos coelhos mais jovens. Por outro lado, no coelho adulto (um ano) ocorreram alterações marcantes na superfície articular e na matriz intercelular (as fibras intercelulares não eram regulares e sim distribuídas desordenadamente na matriz). Além destas alterações, os condrócitos dos coelhos velhos (dois anos e cinco meses) também estavam afetados depois de cinco semanas de imobilização. A cartilagem articular lesada do coelho adulto, que havia sido imobilizado por três semanas, recuperou-se, enquanto que na do coelho velho não se obteve resposta reparadora.

Renner e colaboradores (2006) estudaram, em ratos, o efeito do estiramento muscular passivo sobre a cartilagem articular do tornozelo não imobilizado ou imobilizado previamente. Os autores concluíram que a imobilização, associada ao estiramento muscular, produziu uma redução dos proteoglicanos e um aumento significativo da celularidade, considerado esta redução e este aumento como sinais precoces de um processo degenerativo ou, pelo menos, de risco para a cartilagem articular. Por outro lado, nos modelos que utilizam a imobilização como agente produtor das alterações degenerativas ocorre à rápida deterioração das propriedades bioquímicas e biomecânicas da cartilagem, resultando em alterações degenerativas que, inclusive têm sido utilizadas como modelo para o estudo do processo degenerativo da cartilagem articular. No entanto, esses modelos não são semelhantes àqueles observados na doença degenerativa típica da cartilagem articular (Säämänen et al., 1990; LeRoux et al., 2001).

Haapala e colaboradores (1999) demonstraram que a imobilização causou alterações atróficas na cartilagem articular com diminuição dos glicosaminoglicanos, porém com manutenção da rede de colágeno intacta. Estes autores concluíram que as alterações observadas após a imobilização são completamente diferentes das observadas em um processo de OA precoce, tendo também mostrado que o retorno às atividades não produziu alterações significativas na espessura da cartilagem, quando comparado com os seus controles. No entanto, Kiviranta e colaboradores (1994) realizaram a imobilização em cachorros, tendo demonstrado que a recuperação da espessura não ocorre nas áreas submetidas a menor compressão, e que a concentração dos proteoglicanos, que estava reduzida em todos os animais após a imobilização, permaneceu de 14 a 28% menor do que nos controles, mesmo após 50 semanas de retorno às atividades.

Na busca de outras opções, modelos que utilizem o estresse produzido de forma fisiológica, porém com uma intensidade exagerada, talvez sejam o melhor caminho para o estudo da história natural da OA e da eficácia das ações terapêuticas (Camargo Filho, 2006).



### **1.4.2 Geneticamente modificados**

Os modelos com camundongos geneticamente modificados permitem avaliar o papel das moléculas específicas na fisiopatologia da doença.

#### *1.4.2.1 ADAMTS-5 knockout*

A ADAMTS é da família das enzimas que foram capazes de fazer a degeneração de algumas doenças nas articulações dos seres humanos. A partir deste modelo, começaram os estudos para se saber qual era a ADAMTS que estava envolvida na destruição da cartilagem articular na OA (Ameye e Young, 2006). O desenvolvimento de uma linhagem de camundongos deficientes com a ADAMTS-1 (Little et al., 2005), -4 (Glasson et al., 2004) e -5 (Glasson et al., 2005; Stanton et al., 2005) demonstraram que a ADAMTS-5 foi a mais envolvida nesse processo. No entanto, em comparação com os camundongos selvagens, a deficiência da ADAMTS-5 e não a da ADAMTS-1 ou -4, mostraram que os camundongos selvagens foram mais resistentes à perda e à destruição da cartilagem articular induzida pela instabilidade articular ou processos inflamatórios (Glasson et al., 2004).

#### *1.4.2.2 Catepsina K transgênica*

Novos estudos em animais ainda apóiam a idéia do papel da Catepsina K na OA, sugerindo que esta proteína está associada à degeneração da cartilagem articular (Ameye e Young, 2006). O mRNA da Catepsina K foi transitoriamente regulado durante o início da degeneração dos condrócitos na cartilagem, tanto nos camundongos transgênicos Del1 como nos controles (não-transgênicos) que desenvolveram a OA em uma idade mais avançada (Morko et al., 2004).

### 1.4.2.3 IL-6 knockout

A deficiência da IL-6 nos camundongos machos, resultou na destruição bilateral da cartilagem articular, na esclerose subcondral, na diminuição da densidade mineral óssea do joelho, bem como no aumento de proteoglicanos. No entanto, camundongos fêmeas se mantiveram intactas por 18 meses de idade (De Hooge et al., 2005). *Ex vivo*, a diminuição da síntese dos proteoglicanos pela deficiência da IL-6 na cartilagem articular, também foi observada (De Hooge et al., 2005). De fato, a parte cartilaginosa do fenótipo apresentou a maior frequência e ocorreu bilateralmente, contrariamente às mudanças observadas no fenótipo de outros tecidos, sugerindo que, neste modelo da OA é um processo que ocorre na cartilagem articular. O papel da IL-6 na fisiopatologia da OA pode ser mais importante nos idosos, porque as injeções de colágeno em uma determinada idade induzem um grau semelhante da patologia comum em camundongos selvagens com deficiência da IL-6 (De Hooge et al., 2005).

### 1.4.3 Cirúrgicos

A OA também pode ser induzida pela desestabilização da articulação, resultando na redistribuição anormal das forças atuantes na articulação durante a deambulação e na posição de repouso. Em relação aos modelos cirúrgicos, existem os da transecção do ligamento cruzado anterior (Stoop et al., 2000), a meniscectomia (Williams et al., 1982) e, recentemente, Hoeg-Andersen e colaboradores (2004) desenvolveram um modelo de OA nas ratas com ovariectomia.

#### 1.4.3.1 Transecção do ligamento cruzado anterior

A transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) tornou-se um modelo cirúrgico de indução experimental da OA (Stoop et al., 2000).

Alguns coelhos submetidos à TLCA manifestaram alterações histoquímicas na cartilagem articular (Hashimoto et al., 2002), na apoptose dos condrócitos das zonas superficiais e intermediárias da cartilagem e na porção medial do menisco (Hashimoto et al., 1998, 1999). A utilização, do modelo de OA por TLCA em ratos foi padronizada por Stoop e colaboradores (2000). Neste estudo, as alterações ocorreram nas regiões marginais da cartilagem, tendo consistido na destruição da cartilagem com a morte dos condrócitos e a depleção dos proteoglicanos. Em estágios posteriores foi observada a fibrilação na região central da cartilagem (Stoop et al., 2000). Um estudo posterior mostrou que as alterações da cartilagem nos ratos submetidos à TLCA iniciam-se na zona superficial (Stoop et al., 2001). A execução do modelo da OA induzida pela TLCA, em ratos, se apresenta vantajosa em relação ao praticado em outras espécies animais, em virtude do período de tempo reduzido necessário para serem observadas as primeiras alterações características da OA.

#### *1.4.3.2 Meniscectomia*

O modelo da meniscectomia parcial do joelho foi desenvolvido por Moskowitz e colaboradores na década de 70. Os estudos se iniciaram com coelhos, de forma que a meniscectomia parcial produziu mudanças similares às lesões observadas na OA nos humanos (Moskowitz et al., 1970). No entanto, a frequência e a gravidade das alterações osteocartilaginosas no curso da doença, dependem de quanto da articulação é desestabilizada cirurgicamente (Hulth et al., 1970; Moskowitz et al., 1973). No modelo da meniscectomia, o surgimento de osteófitos e a formação de fibrilações na cartilagem articular aconteceram durante a evolução da OA, como observado por Moskowitz e colaboradores (1973). As alterações histológicas, conforme a evolução da doença, mostraram a existência de um padrão progressivo de desorganização celular e as alterações na malha de colágeno. Interessante observar que o joelho contra-lateral também desenvolveu,

em menor escala, sinais de OA, como demonstrado pela presença de alguns raros osteófitos (Moskowitz et al., 1973).

#### *1.4.3.3 Ovariectomia*

A utilização de ratas ovariectomizadas (OVX) como um modelo animal de OA foi recentemente relatada (Hoegh-Andersen et al., 2004). A OVX induziu à deficiência do estrogênio em ratas Sprague-Dawley com sete meses de idade, tendo, resultado no surgimento de erosões leves na cartilagem articular do joelho, nove semanas após a cirurgia. No entanto, nenhuma alteração foi observada seis semanas após a cirurgia (Hoegh-Andersen et al., 2004). Como as ratas se alimentavam normalmente, foi observada a degradação da cartilagem articular gradativa devido ao ganho de peso (um importante fator de risco para a OA), induzida pela deficiência estrogênica.

#### **1.4.4 Substâncias químicas ou enzimáticas**

Dos fatores anabólicos, destaca-se a ação do fator de crescimento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) na formação da cartilagem articular e na síntese dos proteoglicanos (Van Der Kraan et al., 2002). No modelo induzido quimicamente, os danos articulares se desenvolvem de forma rápida e previsível, sendo que o modelo mais usado é o iodoacetato de sódio (Bove et al., 2003; Fernihough et al., 2004).

##### *1.4.4.1 TGF- $\beta$*

O TGF- $\beta$  é uma proteína que age na formação da cartilagem articular e na síntese dos proteoglicanos (Van Der Kraan et al., 2002). O envelhecimento cartilaginoso provoca uma menor agregação dos proteoglicanos, aliado à menor resistência mecânica da cartilagem (Van Der Kraan et al., 2002). O colágeno

adquire menor hidratação, maior resistência à colagenase e maior afinidade pelo cálcio. A cartilagem articular tem uma capacidade reparadora limitada que diminui ainda mais com o envelhecimento, e/ou quando da eclosão de condições degenerativas (Van Der Kraan et al., 2002).

As evidências mostram que a síntese e a degradação do colágeno tipo II se associa com a matriz pericelular, mantendo-se em um estado de equilíbrio dinâmico ao longo dos anos, não apresentando as alterações moleculares comumente associadas à OA (Yudoh et al., 2005). Já os condrócitos dos idosos têm menor capacidade para manter e reparar a cartilagem articular. Demonstrou-se também que o estresse oxidativo contribui para a senescência dos condrócitos, fato que explica, em parte, o maior risco de desenvolver OA com a idade (Yudoh et al., 2005).

#### *1.4.4.2 Iodoacetato de sódio*

A injeção do iodoacetato de sódio no espaço intra-articular é um modelo de indução química. A injeção deste inibidor metabólico, dentro das articulações, inibe a desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato que atua nos condrócitos, resultando na interrupção da glicólise e das eventuais mortes celulares nas articulações de ratos Wistar (Kalbhen, 1987; Van der Kraan et al., 1989; Bove et al., 2003). A perda progressiva dos condrócitos nos resultados histológicos e morfológicos apresenta mudanças na cartilagem articular, muito semelhantes às observadas nos humanos com a OA (Janusz et al., 2001). Além disso, o modelo foi utilizado por vários investigadores para testar a capacidade de preservar a estrutura da cartilagem de alguns agentes farmacológicos (Natchus et al., 2000; Januz et al., 2001; Gencosmanoglu et al., 2001).

Nesse modelo, Fernihough e colaboradores (2004) descreveram que, após a administração do iodoacetato no joelho, os ratos mostraram uma forte hiperalgesia e alodínea na pata posterior, dentro de uma semana após a injeção

(dose de 0,5 a 2 mg). O período inicial do inchaço do joelho, no modelo induzido pela iodoacetato, resultou em uma inflamação sinovial transitória, a qual pode ser correlacionada com a condição clínica da inflamação sinovial que prediz o desenvolvimento da OA no joelho (Saxne et al., 2003). Estas alterações são observadas na evolução da OA nos humanos, sendo que as fases inflamatórias e recorrentes são muito comuns (Saxne et al., 2003). Após cinco dias, a OA induzida pelo iodoacetato causou hiperalgesia profunda avaliada na pata posterior ipsilateral.

Os pacientes com a OA também mostram respostas hiperálgicas aos estímulos nocivos aplicados ao redor de um joelho osteoartítico (Wessel, 1995; Bajaj et al., 2001). Geralmente, eles relatam alodínea em outras áreas junto à articulação afetada e ainda, uma hiperalgesia robusta que é observada no 28º dia (Guingamp et al., 1997). O iodoacetato causa patologia articular via inibição da glicólise na cartilagem vascular provocando morte dos condrócitos (Janusz et al., 2002).

Assim, no presente estudo, escolheu-se o modelo do iodoacetato de sódio por este ser um modelo rápido de progressão da OA, fácil de ser desenvolvido e não necessitar de cirurgia. Também é um modelo seguro que não traz prejuízos para a saúde e o bem-estar dos animais, além de ter características semelhantes com a evolução da OA apresentada pelos pacientes.

### ***1.5 Influências das condições dolorosas no sono em humanos***

O sono é um fenômeno biológico fundamental para a manutenção da saúde mental e emocional. Fisiologicamente, é considerado como um estado funcional, cíclico e reversível, que está presente em todas as faixas etárias e na maioria das espécies animais. Ele possui algumas características comportamentais, como uma imobilidade relativa e o aumento do limiar de resposta aos estímulos externos. O organismo tem grande necessidade de

manifestar o sono e, quando isso não se torna possível, podem ocorrer alterações marcantes, até mesmo a morte após um período prolongado de privação de sono em animais (Rechtschaffen et al., 1989).

Os distúrbios de sono são comuns nos pacientes com dores (Friedrichs e Broen, 1997; Morin et al., 1998; Ohayon, 2005; Lautenbacher et al., 2006; Moldofsky, 2008). Segundo uma revisão de Smith e Haythornthwaite (2004), as dores agudas e crônicas estão associadas aos distúrbios de sono, tendo sido estas relatadas como uma importante causa da insônia (Smith e Haythornthwaite, 2004). De fato, a maioria dos pacientes com dores crônicas sofre de insônia grave, às vezes antes mesmo do início do padrão doloroso propriamente dito, acarretando em um circuito insônia-dor-insônia.

Os pacientes com angina noturna e uma variedade de síndromes de dores crônicas apresentam um aumento das latências de sono e do número de episódios de vigília e estágio 1, além do aumento dos despertares durante a noite. Também apresentam um EEG com atividade alfa nos estágios do sono de ondas lentas (Moldofsky et al., 1975, 1983; Moldofsky e Scarisbrick, 1976; Moldofsky, 2001).

Embora os pacientes com dores crônicas possuam dificuldades para o início e a manutenção do sono, ainda é obscuro o conhecimento de como a dor causa a fragmentação do sono (Moldofsky, 1989). Por exemplo, os movimentos periódicos das pernas e as alterações emocionais causam um sono fragmentado, podendo contribuir para um padrão de sono anormal nos pacientes com dores crônicas (Moldofsky, 2001). De fato, em 1991, Lavigne e colaboradores relataram que a interação entre o sono, os distúrbios dos movimentos e algumas dores músculo-esquelético são complexas, podendo ser influenciados por vários fatores psicológicos e/ou biológicos concomitantes. Os autores relataram a dificuldade de se determinar se é a dor que induz a um sono de baixa eficiência ou o contrário. No mesmo ano, Silva e colaboradores (1991), ao estudarem oito pacientes com dores musculares, encontraram anormalidades no sono, caracterizadas por mioclonias noturnas, sono alfa-delta (que se caracteriza pela intrusão das ondas

alfa durante o sono profundo), além de anormalidades compatíveis com a depressão.

Na mesma linha de investigação, Morin e colaboradores (1998), na tentativa de investigar a prevalência dos distúrbios de sono nos pacientes com dores crônicas e a sua relação com os distúrbios afetivos, notaram que 66% dos pacientes que sofriam de dores crônicas relatavam ter distúrbios de sono, no entanto, não houve correlação com os distúrbios afetivos.

Considerando que a insônia é o distúrbio de sono mais significativo para muitos indivíduos com dores crônicas, Wilson e colaboradores (1998), por meio de um actígrafo, avaliaram a combinação dos diários de sono ao monitoramento da atividade de ambulação. Os resultados demonstraram que os sujeitos com dores de maior intensidade relatavam também prejuízos de sono mais acentuados do que os indivíduos cujas dores eram de menor gravidade, embora este fato não tenha sido confirmado pelo actígrafo. Em geral, ambos os métodos de avaliação podem ser indicativos da significância da insônia associada à dor crônica músculo-esquelética, como um problema clínico distinto, mesmo que o monitoramento da atividade e o auto-relato forneçam informações diferentes (Wilson et al., 1998).

Ao analisarem a complexa relação entre as dores de cabeça e os distúrbios de sono, Paiva e colaboradores (1997) concluíram que as dores de cabeça matutinas e noturnas são freqüentes indicadoras de distúrbios de sono, podendo a sua presença justificar a polissonografia (PSG).

Os distúrbios na manutenção do sono também são observados nos pacientes com a Doença de Parkinson idiopática (74 a 98% dos pacientes com esta doença apresentam distúrbios de sono). Os despertares noturnos observados são freqüentemente causados pela dor, pela rigidez e pela dificuldade em se movimentar no leito (Prinz, 1995).



Dos questionários aplicados a 439 mulheres reumáticas hospitalizadas, os resultados indicaram que há uma pequena diferença na prevalência dos distúrbios de sono entre reumáticas e não-reumáticas. Os distúrbios de sono foram mais freqüentemente observados nas pacientes reumáticas (Leigh et al., 1987). Haythornthwaite e colaboradores (1991) afirmaram que a duração da queixa de dores está associada ao atraso do início do sono e a uma baixa qualidade de sono.

Drewes e colaboradores (1998) também demonstraram a existência de freqüentes queixas de sono nos pacientes com artrite reumatóide, tendo acrescentado que os distúrbios de sono podem contribuir para as dores e outras queixas durante o dia. A PSG mostra aumento no número dos movimentos periódicos das pernas durante o sono, além do aumento da atividade alfa nos estágios do sono de ondas lentas.

Em um estudo populacional recente, Ohayon (2005) correlacionou algumas condições dolorosas crônicas como a fibromialgia, a artrite reumatóide, as lombalgias e as cefaléias com a presença da insônia na população normal de cinco países europeus, sugerindo ainda que existem fatores de associação para essas condições. O autor demonstrou que as condições dolorosas crônicas são freqüentes em mais de 40% da população estudada, levantando novamente a possível hipótese da relação bidirecional da dor e do sono. Recentemente, em um artigo de revisão, Moldofsky (2008) descreveu que uma das principais queixas nos pacientes com fibromialgia eram os distúrbios e a insatisfação com o sono, assim como a fadiga crônica e a depressão que interferiam no trabalho e na vida social dessas pacientes.

### ***1.6 Influências das condições dolorosas no sono em modelos animais***

Apesar da consistência dos dados clínicos com modelos animais de dor, há um número limitado de estudos (Carli et al., 1987; Landis et al., 1988, 1989;

Andersen e Tufik, 2000, 2003; Kontinen et al., 2003; Andersen et al., 2006a; Schutz et al., 2003, 2004, 2007, 2009). A identificação de alterações semelhantes nos ratos com dor crônica adiciona informações relevantes ao quadro dos distúrbios de sono, associados à dor nos seres humanos.

Segundo Landis e colaboradores (1989), os ratos com artrite apresentam um sono fragmentado devido a um maior número de episódios de vigília, um sono de baixas amplitudes e episódios mais curtos de sono com maiores amplitudes, tanto durante o período claro como no escuro. Há também uma redução do sono paradoxal e a incapacidade dos ratos artríticos sustentarem longos períodos de sono. Sendo a gravidade da artrite variável entre os ratos, por meio de um eletroencefalograma pode ser possível detectar a relação entre o grau de inflamação produzida pela dor e as alterações na padrão de sono (Landis et al., 1989).

Ao estudarem o sono de ratos submetidos ao modelo de artrite induzida, durante duas semanas, Andersen e Tufik (2000) observaram que a artrite nos ratos produziu significativas alterações no padrão de sono. Os ratos artríticos mostraram um menor tempo total de sono, um aumento da latência para o sono sincronizado, uma diminuição da eficiência de sono, um maior número de mudanças de estágios, um maior tempo total de alerta e fragmentação de sono. Estes resultados estão de acordo com Landis e colaboradores (1988, 1989), os quais sugeriram que o padrão de sono anormal decorre da incapacidade dos ratos artríticos para manter longos períodos de sono, inabilidade esta provavelmente relacionada à presença de dor. Os resultados dos testes comportamentais indicaram que, desde o segundo dia após a administração do adjuvante de Freund até ao final da oitava semana do estudo, houve uma redução do limiar de dor nos animais (Andersen e Tufik, 2000). Além de terem evidenciado, nos ratos com artrite induzida, a interação entre os distúrbios de sono e as alterações comportamentais.

Em um estudo longitudinal dos efeitos da dor neuropática (constricção crônica do nervo ciático), Andersen e Tufik (2003) demonstraram que os animais

apresentam uma redução do sono de ondas lentas e um aumento do número de despertares, do sono paradoxal e da latência para o início do sono, principalmente na primeira semana após a lesão periférica, corroborando com a condição clínica das queixas de distúrbios de sono nos pacientes acometidos pela dor neuropática.

No sentido de determinar as conseqüências do convívio com a prole com artrite sobre a rata lactante, no que se refere ao comportamento maternal, o limiar de dor e do padrão de sono, Roizenblatt e colaboradores (submetido) utilizaram ratas que foram distribuídas em dois grupos. Em um deles, designado "mães de prole com artrite", se induziu artrite na prole com adjuvante de Freund, no outro, o grupo controle, a prole recebeu uma injeção de salina. Os resultados demonstram que o convívio com a prole artrítica acarreta nas ratas lactantes um aumento do comportamento maternal, da ansiedade, da redução no limiar de dor e dos distúrbios de sono (redução da eficiência de sono e da porcentagem do sono de ondas lentas e do paradoxal, e aumento do número de despertares, do tempo em vigília e da latência para o sono paradoxal). A redução nos níveis da serotonina, em conjunto com as conclusões acima, evidencia as semelhanças existentes entre o modelo animal proposto por este estudo e as condições dolorosas crônicas manifestadas por seres humanos.

Nascimento e colaboradores (2007) demonstraram que a privação de sono paradoxal promoveu mudanças hiperálgicas na sensibilidade dolorosa. Estas alterações ocorreram na mesma intensidade, desde as primeiras 24 horas até 96 horas de privação de sono paradoxal, sendo que somente após o rebote de sono de 48 horas foi restaurada a latência para os valores basais. Também se realizou outro estudo na tentativa de investigar os efeitos da administração intracerebroventricular da substância P em camundongos. Andersen e colaboradores (2006a) observaram que sem ativar os mecanismos da dor, a substância P produz alterações marcantes no ciclo vigília-sono desses animais. No entanto, a administração prévia do antagonista do receptor NK-1 reverteu os distúrbios de sono.

Entre as condições de dor crônica, a dor orofacial é uma importante condição clínica a qual também inclui os processos inflamatórios. O desenvolvimento de modelos animais possibilita um maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos neste processo e as possíveis abordagens terapêuticas. A estimulação nociceptiva sobre a polpa dental dos incisivos superiores, após administração cerebral da serotonina em cobaias, é capaz de manter o animal em estado de vigília, levando a sugerir que o sistema trigeminal provavelmente agiria sobre os centros reguladores do sono (Brentegani et al., 1992).

Schutz e colaboradores (2003) avaliaram os efeitos no padrão de sono dos ratos após a administração de adjuvante de Freund na articulação temporomandibular. Os resultados demonstraram evidentes distúrbios de sono como a redução da eficiência de sono e o aumento da latência para o início do sono. O pré-tratamento com o anti-inflamatório indometacina (Schutz et al., 2003) e o inibidor de óxido nítrico L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl éster) restabeleceram o padrão de sono normal nos animais (Schutz et al., 2004). Recentemente, estes autores descreveram que os distúrbios de sono provocados pela dor orofacial foram revertidos pela administração oral da indometacina e o inibidor da síntese de ciclooxigenase (Schutz et al., 2007). Recentemente, realizou-se um estudo para verificar a participação dos hormônios sexuais no processo doloroso neste modelo animal. Os resultados do estudo demonstraram que os ratos machos que foram induzidos com o adjuvante de Freund na articulação temporomandibular tiveram uma resposta nociceptiva significativa e alterações na arquitetura do sono. No entanto, nas fêmeas o comportamento e a arquitetura do sono permaneceram inalterados. Assim, esses resultados sugerem que as fêmeas e machos apresentam respostas distintas para os modelos agudos de dor orofacial, considerando a importância da participação hormonal na regulação do sono (Schutz et al., 2009).

Os modelos experimentais de dor patológica em animais têm sido desenvolvidos para permitir o estudo dos mecanismos das dores agudas e

crônicas. O conhecimento da fisiopatologia destes modelos experimentais pode conduzir a uma melhor compreensão das condições da dor nos seres humanos e, assim, trazer benefícios para as terapias. Os estudos com modelos animais de dor demonstram que cada um tem a sua particularidade, acarretando alterações comportamentais e prejuízos no ciclo vigília-sono de forma distinta entre si. Algumas evidências como redução do limiar de dor, o lambe a pata afetada, a postura anormal e até a autotomia, estão diretamente relacionadas à intensidade da dor, podendo ser utilizadas como subsídio para as pesquisas sobre a influência das diferentes intensidades de um estímulo doloroso específico sobre o padrão de sono.

Embora modelos que envolvem a indução cirúrgica ou a química da OA se assemelhem claramente à comparação com a condição humana em termos de destruição articular, atualmente, nenhum modelo animal abordou o padrão de sono em modelo animal de dor com a OA. Neste contexto, se insere a necessidade de pesquisas sobre as condições dolorosas em modelos animais com a OA, a fim de melhorar a compreensão dos mecanismos envolvidos na dor crônica e a sua influência sobre o padrão de sono.

## *2 JUSTIFICATIVA*

---

Em consequência do aumento da expectativa de vida nas últimas décadas associado ao sedentarismo, a OA torna-se cada vez mais prevalente. Desta forma, essa patologia é atualmente um dos maiores problemas mundiais de saúde pública.

Assim, os resultados do presente estudo podem contribuir com o entendimento dos mecanismos pelos quais a OA predispõe as alterações no padrão de sono. Constitui-se como importante fato a investigação dessas alterações provocadas pela dor, uma vez que esta é a característica clínica predominante em OA. Desta forma, a magnitude desses achados poderá repercutir positivamente em novas abordagens terapêuticas.

### *3 OBJETIVOS*

---



### **Objetivo geral**

Estudar os efeitos da osteoartrite no padrão de sono em ratos.

### **Objetivos específicos**

O objetivo geral exposto acima foi subdividido em duas proposições:

1. Analisar a arquitetura do sono e a sensibilidade dolorosa frente estímulo térmico em ratos machos submetidos a um modelo experimental de osteoartrite (Artigo 1).
2. Avaliar a influência do gênero no padrão de sono e no perfil hormonal (progesterona, estradiol e testosterona) em ratos submetidos a um modelo experimental de osteoartrite (Artigo 2).

## *4 MATERIAL E MÉTODOS*

---

Neste segmento descrevem-se os procedimentos gerais utilizados em todos os experimentos. O delineamento experimental específico de cada trabalho está nos Resultados.

#### **4.1 Animais**

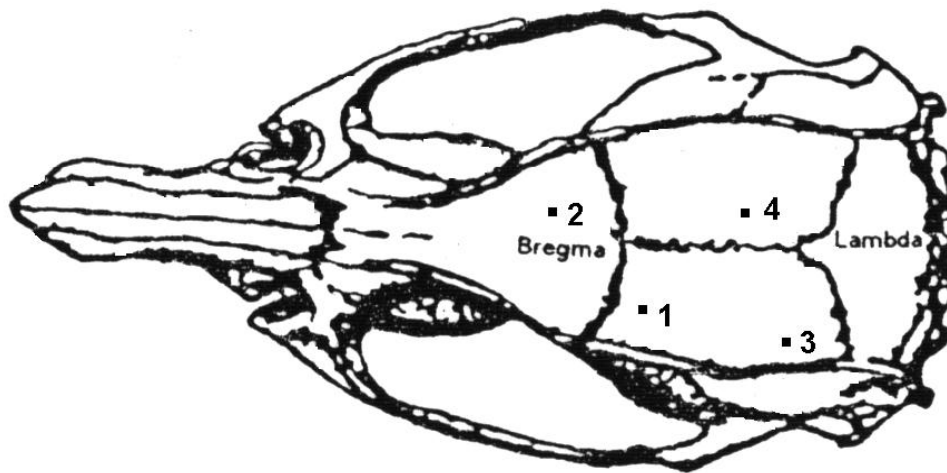
No presente estudo foram utilizados ratos Wistar machos com idade superior dos 90 dias. Os animais foram provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME), da Universidade Federal de São Paulo. O estudo foi conduzido com as condições de luz (claro das 7 às 19 horas) e de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) controladas automaticamente. A ração e a água foram mantidas à vontade nas gaiolas de moradia. Todo o estudo foi conduzido segundo os princípios éticos (Andersen et al., 2004a), sob a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP (CEP # 1292/06) (Anexo I).

O máximo de esforço foi despendido para minimizar os possíveis desconfortos causados aos animais. Além disto, em todos os experimentos do presente trabalho buscou-se empregar a filosofia dos “3Rs”, cujo objetivo é reduzir o tamanho da amostra sem comprometer as análises estatísticas e a interpretação dos resultados.

#### **4.2 Registro do ciclo vigília-sono**

Para o registro da atividade elétrica eletrocorticográfica dos animais foram feitas duas derivações corticais bipolares longas e ipsilaterais. Uma de localização lateral ao plano sagital, para o registro do ECoG com uma mínima atividade *theta*, e outra de localização mais medial ao plano sagital, para o registro do ECoG com máxima atividade *theta* (Timo-laria et al., 1970):

- **Eletrodo 1:** 1 mm posterior ao *Bregma* e 3 mm à esquerda da sutura Sagital.
- **Eletrodo 2:** 3 mm anterior ao *Bregma* e 1 mm à direita da sutura Sagital.
- **Eletrodo 3:** 1 mm anterior ao *Lambda* e 4 mm à esquerda da sutura Sagital.
- **Eletrodo 4:** 4 mm anterior ao *Lambda* e 1 mm à direita da sutura Sagital.



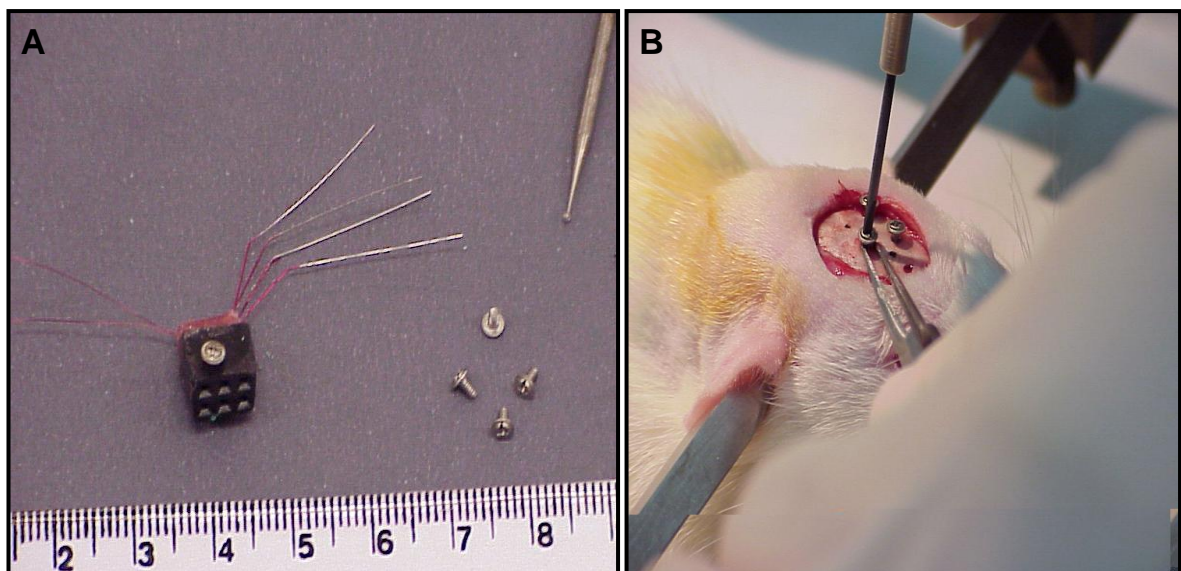
**Figura 6:** Posições dos eletrodos usados para registro eletrocorticográfico: 1, eletrodo frontal esquerdo; 2, eletrodo frontal direito; 3, eletrodo occipital esquerdo; 4, eletrodo occipital direito.

### 4.3 Cirurgia estereotáxica

Após realizada a anestesia (associação de cloridrato de cetamina, 140 mg/kg, i.p. e diazepam, 5,5 mg/kg, i.p.), foi realizada uma tricotomia da região dorsal do crânio e os animais foram fixados ao aparelho estereotáxico. Como hemostático, administrou-se Xilocaína (2% mais vasoconstrictor) na região já mencionada e nos meatos auriculares.

Em primeiro lugar, uma incisão circular mediana foi feita na pele sobre o crânio até a exposição do periósteo. Em seguida, conforme Bergmann e colaboradores (1989) foram demarcadas as coordenadas estereotáxicas. Com o auxílio de uma broca odontológica, foram realizados quatro orifícios onde foram atarraxados quatro microparafusos (diâmetro 1,0 mm) de aço inoxidável (Figura 7B). Também foram implantados dois eletrodos, feitos de fio níquel-cromo revestidos com Teflon™ (California Fine Wire™ EUA, diâmetro 0,004mm), no músculo dorsal do pescoço (trapézio), um do lado direito e o outro do esquerdo, possibilitando assim o registro eletromiográfico, também necessário para a caracterização das fases do sono.

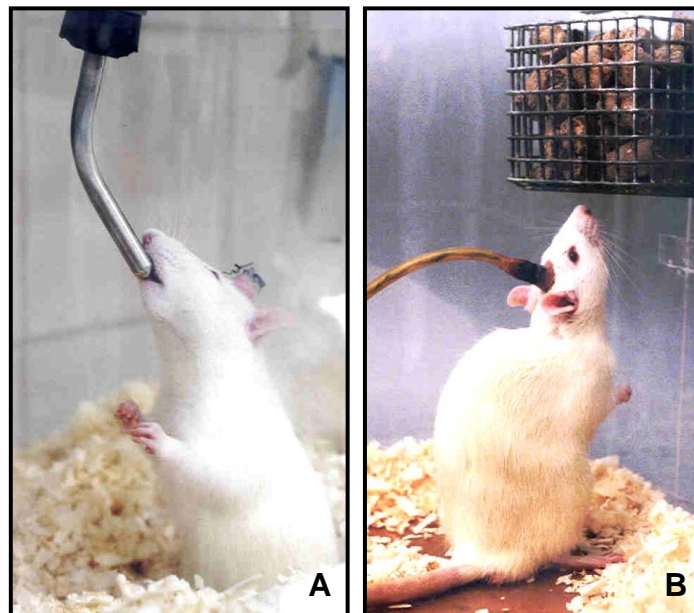
Todos os eletrodos (Figura 7A) corticais, por meio de fios de níquel-cromo revestidos com Teflon™ (California Fine Wire™ EUA, diâmetro 0,008mm), foram ligados a um conector, e este fixado ao crânio do animal com acrílico autopolimerizante odontológico. Os animais foram suturados e finalmente liberados do aparelho estereotáxico.



**Figura 7:** Eletrodo e parafusos utilizados para registro eletrocortográfico e eletromiográfico (A) e ilustração do posicionamento dos parafusos durante a cirurgia de implantação do eletrodo (B).

Os ratos receberam 0,5 ml/kg i.m. de uma dose de suspensão poli-antibiótica com estreptomicinas e penicilinas (Pentabiótico<sup>®</sup> Wyeth<sup>®</sup>, Brasil) e 10mg/kg, i.p. de diclofenaco sódico (Novafarma<sup>®</sup>, Brasil), com o intuito de promover uma analgesia pós-operatória e diminuir a possibilidade de um processo inflamatório local.

Em seguida, a fim de evitar um choque hipotérmico comum no período pós-anestésico, os ratos foram levados para uma gaiola aquecida por aproximadamente 24 horas. Após esse período, os animais foram levados para suas gaiolas, com livre acesso à água e à comida, onde permaneceram por sete dias antes de qualquer intervenção experimental (Figura 8A) e três dias conectados ao cabo de registro (Figura 8B) e foram mantidos no interior da gaiola de Faraday. As gaiolas de Faraday (Figura 9) são utilizadas para minimizar as influências eletrostáticas externas. Durante o registro, os animais permaneceram em salas climatizadas e isoladas acusticamente.



**Figura 8:** Rato do grupo *ad libitum* nos primeiros dias após a cirurgia (A) e durante o período de adaptação ao cabo para o registro de sono (B).



**Figura 9:** Ilustração das gaiolas de Faraday que são utilizadas para minimizar as influências eletrostáticas externas durante a aquisição do registro de sono.

#### **4.4 Registro eletrocorticográfico (ECoG)**

Os ratos foram conectados ao polígrafo por meio de cabos blindados para a eletroencefalografia. Os cabos foram revestidos com uma malha flexível de aço inoxidável, para evitar a sua ruptura pelos animais. Na extremidade de cada cabo foi colocado um conector, apropriado para o encaixe com aquele fixado nos crânios dos animais, tipo “macho-fêmea”. A outra extremidade do cabo foi conectada ao painel de entrada do aparelho, de acordo com a montagem preconizada anteriormente. É importante salientar que o cabo de conexão foi projetado para dar ao animal conforto e liberdade de movimentação, reduzindo assim mais este fator estressante, o qual poderia influenciar os parâmetros a serem observados.

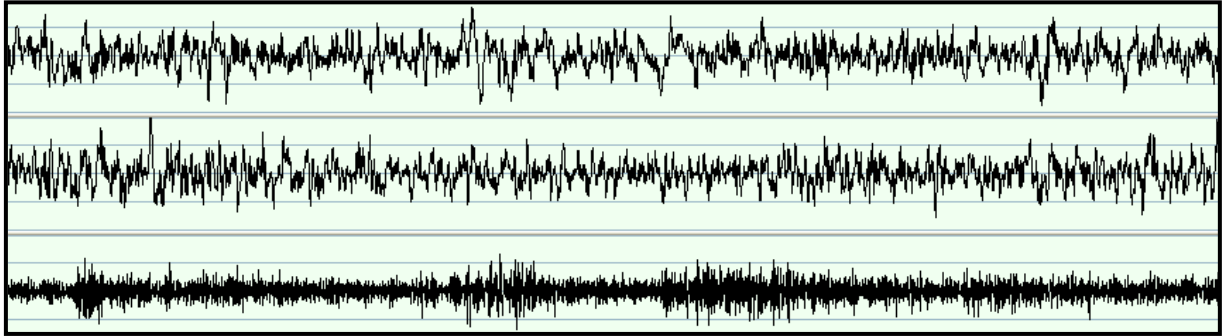
Os ratos foram registrados por polígrafos digitais Nihon-Kohden™ modelo QP-223A (Japão) de 32 canais. Foi feito o registro em cada animal através de três canais, sendo dois para o registro do ECoG e o terceiro para o

registro do eletromiograma (EMG). A aquisição do sinal foi automaticamente digitalizada e armazenada até a leitura em disco rígido. A leitura dos registros foi manual e feita por meio do programa de análise Polysmith™ Neurotronics Inc.™, em épocas de 30 segundos. Após a análise, os registros foram arquivados em discos ópticos (DVD, Panassonic™).

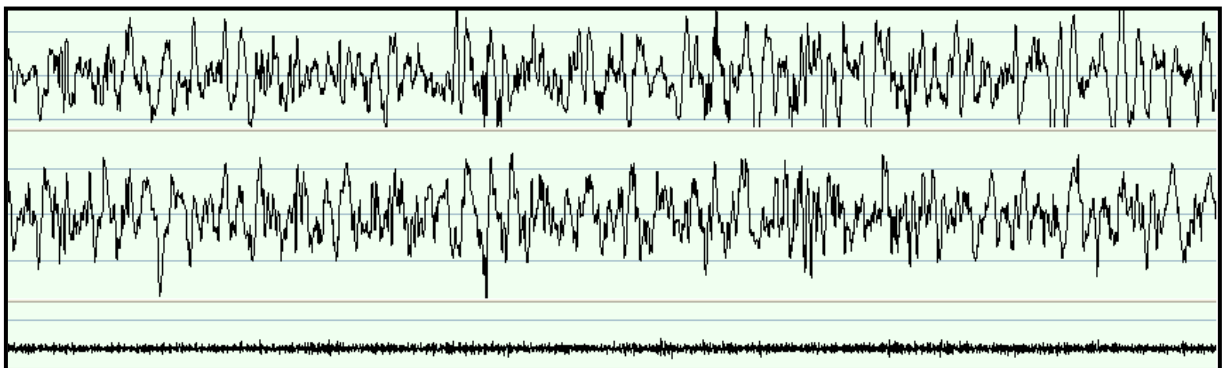
A frequência da amostragem do sinal foi de 200Hz; a calibração foi padronizada em 50 $\mu$ V; a sensibilidade, ou o ganho, foi de 15 $\mu$ V para o ECoG e de 30 $\mu$ V para o EMG; a constante de tempo ou filtro "passa baixo" foi de 0,1s para o ECoG e de 0,03s para o EMG; o filtro "passa alto" foi ajustado a 35Hz para o ECoG e a 70Hz para o EMG e o filtro de corrente alternada para 60Hz.

Foi considerado como vigília quando os dois canais corticais (canal 1: eletrodos 1 e 2; canal 2: eletrodos 3 e 4) demonstravam um traçado dessincronizado, de alta frequência (>25Hz) e amplitude baixa (<50 $\mu$ V), podendo aparecer o ritmo theta (5 a 8Hz) no segundo canal cortical, e quando o canal do EMG apresentou um traçado de alta amplitude (>40 $\mu$ V), exceto na vigília quieta em que a amplitude do EMG pode estar tão reduzida quanto no SOL (Figura 10A). O sono de ondas lentas (SOL) foi caracterizado quando os dois canais corticais demonstraram um aumento na amplitude (>50 $\mu$ V) e uma diminuição na frequência de onda (< 25Hz), e quando o EMG apresentou uma amplitude mais reduzida (20 a 50 $\mu$ V) (Figura 10B). O sono paradoxal (SP) foi caracterizado quando o primeiro canal cortical demonstrou uma redução na amplitude (<50 $\mu$ V) e um aumento na frequência de onda (>40Hz), o segundo canal cortical apresentou um padrão de onda de ritmo theta (5 a 8Hz) praticamente monotônico e o EMG se mostrou com a amplitude quase nula (<20 $\mu$ V) (Timo-laria et al., 1970; Andersen et al., 2001) (Figura 10C).

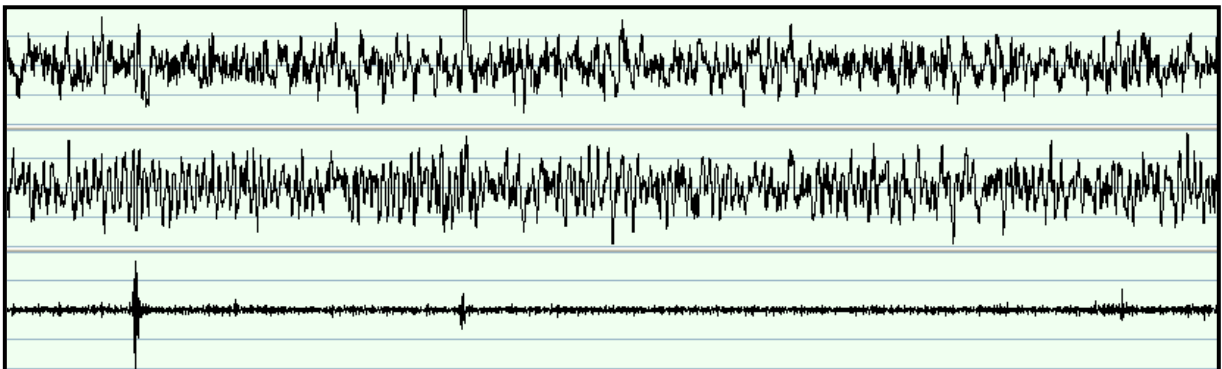




**A:** Prolongado episódio de vigília caracterizada pela dessincronização cortical (Canal 1-ECOG) e tônus muscular acentuado (Canal 2-EMG). Calibração: 1 segundo e  $50\mu\text{V}$ . Velocidade: 10 mm/seg. Tempo: 30 segundos.



**B:** Padrões eletrocorticográficos de sono de ondas lentas. Notam-se ondas sincronizadas, com alta amplitude e baixa frequência (Canal 1-ECOG) e hipotonia muscular (Canal 2-EMG). Calibração: 1 segundo e  $50\mu\text{V}$ . Velocidade: 10 mm/seg. Tempo: 30 segundos.



**C:** Episódio de sono paradoxal. Destaca-se o ritmo teta bem modulado (Canal 1- ECoG) e a atonia muscular (Canal 2-EMG). Calibração: 1 segundo e  $50\mu\text{V}$ . Velocidade: 10 mm/seg. Tempo: 30 segundos. ECoG: eletrocorticográfico; EMG: eletromiograma.

**Figura 10:** Ilustração de vigília (A), sono de ondas lentas (B) e sono paradoxal (C).

#### **4.5 Esfregaço Vaginal**

Para a realização do esfregaço vaginal introduziu-se uma solução salina (0,9%) na abertura vaginal da rata, utilizando o conta gotas e uma pipeta de 200µl. Retirou-se a salina da abertura vaginal após alguns instantes. A salina foi espalhada sobre a lâmina para a identificação do tipo celular predominante em cada fase do ciclo (Figura 11). A leitura foi feita logo após o esfregaço vaginal utilizando o microscópio com aumento de 40X. O esfregaço vaginal foi realizado diariamente no período das 8 às 10 horas. As concentrações dos hormônios sexuais apresentam oscilações em cada fase do ciclo estral, como ilustra a Figura 11 (Branchey et al., 1971; Haim et al., 2003).

As ratas apresentam uma ciclicidade hormonal denominada de ciclo estral que normalmente começa entre o 35<sup>o</sup> e o 45<sup>o</sup> dia de vida (Butcher et al., 1974). As ratas são animais poliéstricos, cuja duração do ciclo estral, que varia de quatro a cinco dias, consiste em quatro fases: proestro, estro, metaestro (ou diestro I) e diestro (ou diestro II).

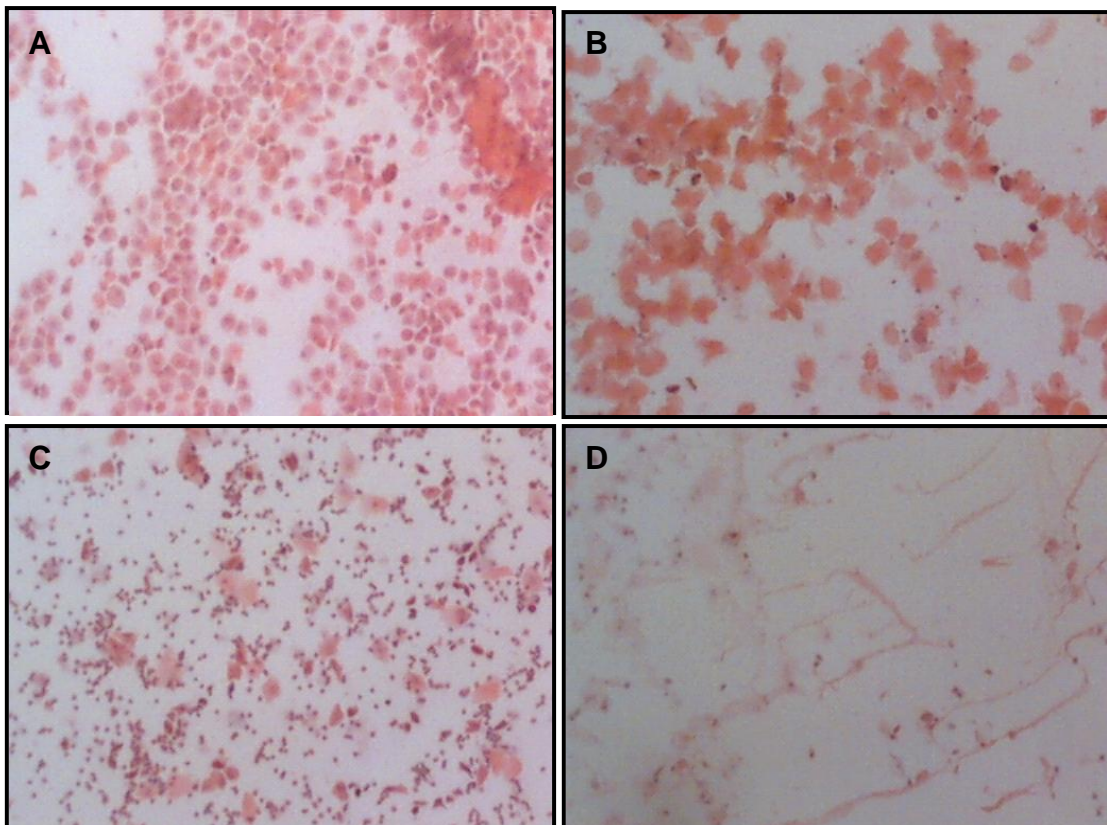
As quatro fases do ciclo estral estão descritas a seguir:

**Proestro:** a proestro é caracterizada pela presença das células epiteliais com predominância de células grandes e nucleadas e ocasionais células cornificadas. Esta fase permanece de 12 a 14 horas e precede o estro. Nesta fase torna-se evidente a ação estrogênica sobre o epitélio vaginal, assim como o desenvolvimento folicular provocado pelas altas concentrações de estradiol (Figura 11A).

**Estro:** a predominância das células cornificadas torna esta fase evidente. O estro inicia-se à noite e permanece de 25 a 27 horas. Durante esta fase, a ovulação ocorre espontaneamente e as fêmeas se tornam receptivas aos machos, exibindo mudanças comportamentais que aumentam a probabilidade de cópula (Figura 11B).

**Metaestro:** esta fase é frequentemente chamada de diestro I e é caracterizada pela presença de poucos leucócitos, do muco, e das células cornificadas e epiteliais (nucleadas). O período de duração é de seis a oito horas e ocorre a tumefação da vulva e massa caseosa na vagina. Esta é a fase luteínica que corresponde à formação do corpo lúteo na superfície do ovário. O corpo lúteo é responsável pela produção da progesterona, a qual impede a maturação de novos folículos e permite a manutenção da prenhez (Figura 11C).

**Diestro:** também é conhecida como a diestro II. As células predominantes desta fase são os leucócitos e as células epiteliais com muco abundante no esfregaço vaginal. Essa é a fase mais longa, que predomina de 55 a 57 horas, e corresponde ao impedimento da maturação de novos folículos provocado pela ação da progesterona. A sua duração dessa depende do tempo necessário para ocorrer a regressão do corpo lúteo e a cessação da ação da progesterona (Figura 11D).

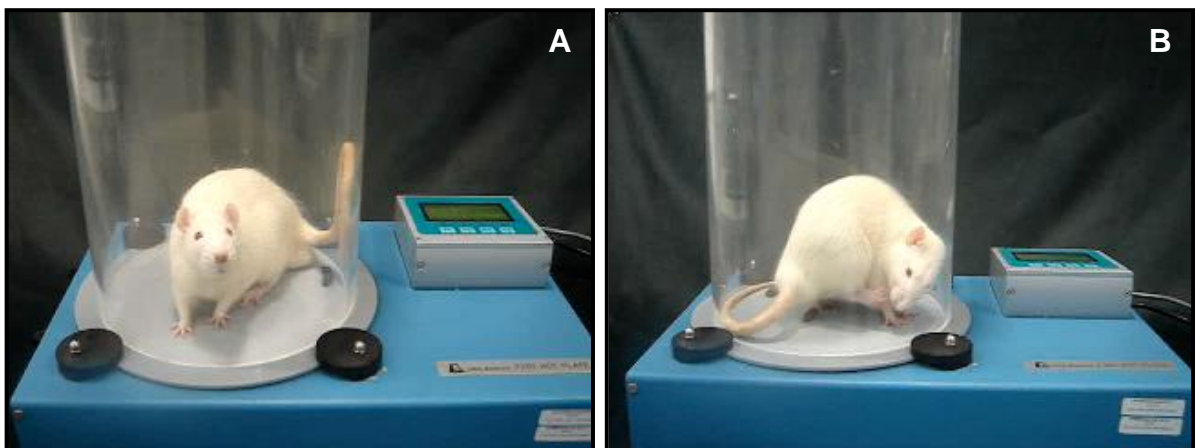


**Figura 11:** Ilustração das fases do ciclo estral [Proestro (A); Estro (B); Metaestro (C); Diestro (D)].

#### 4.6 Teste da placa quente

A placa quente foi utilizada para medir a latência da resposta à dor, de acordo com o método descrito por Eddy e Leim Bach (1953). Os animais foram colocados sobre a placa quente (Ugo Basile, Biological Research Apparatus Company, Comerio, Itália) aquecida a 50°C (Bolles e Fanselow, 1982) (Figura 12).

A latência da placa quente foi definida como elevação, lamber as patas ou salto. O animal foi retirado da placa quente imediatamente após uma das reações descritas anteriormente ter acontecido. Um período de latência de 90 segundos foi definido como completa analgesia e usado como tempo limite para os ratos que não respondessem ao estímulo térmico. Os testes sempre foram conduzidos entre as 8 e as 10 horas.



**Figura 12:** Ilustração do rato sobre a placa quente (A) e ao lamber a pata posterior em resposta ao estímulo nociceptivo (B).

#### 4.7 Desenvolvimento da osteoartrite em ratos

O dano na articulação foi induzido por uma injeção intra-articular de 2mg de iodoacetato de sódio dentro da articulação do joelho esquerdo dos ratos (Figura 13) levemente anestesiados (halotano) num volume total de 25 $\mu$ L (Fernihough et al., 2004). Para o grupo SHAM, a salina foi injetada dentro do joelho, enquanto que o grupo controle (CTRL) não recebeu qualquer intervenção.

Com o joelho flexionado a um ângulo de 90° (Figura 14), a solução do iodoacetato de sódio foi injetada por meio do ligamento patelar usando uma agulha do tamanho 26GX3/8. A dose de 2mg produziu a hiperalgesia e a alodínea com a ausência de efeitos sobre a saúde geral dos animais (Fernihough et al., 2004). Uma hiperalgesia robusta foi observada até ao 28º dia (Guingamp et al., 1997). O iodoacetato causa a patologia articular via inibição da glicólise na cartilagem vascular, ocorrendo a morte dos condrócitos (Janusz et al., 2002). A saúde geral dos animais foi monitorada diariamente.



**Figura 13:** Ilustração da administração do iodoacetato de sódio no joelho esquerdo.



**Figura 14:** Ilustração do local da injeção intra-articular com o joelho flexionado a 90° graus.

Os testes comportamentais e dos registros de sono foram conduzidos com diferentes grupos de ratos durante o período basal, e nos 1º, 10º, 15º, 20º e 28º dias após a injeção. Estes dias foram baseados no protocolo de Fernihough e colaboradores (2004). No total, 36 animais foram utilizados no presente estudo (n=18 para o experimento 1 e n=18 para o experimento 2).

## **4.8 Histologia da articulação do joelho**

### **4.8.1 Preparação do tecido**

Os ratos submetidos ao teste comportamental foram eutanasiados para se realizar a histologia da articulação após 28 dias da administração do iodoacetato de sódio. Realizou-se a histologia articular nesses ratos para assegurar e comprovar o dano articular. O protocolo foi adaptado ao de Fernihough e colaboradores (2004). A articulação dos joelhos foi primeiro dissecada para a retirada da musculatura circundante. Os tecidos foram fixados durante uma noite com paraformaldeído a 4% em uma salina tamponada, tendo sido depois descalcificados, por no máximo 16h, em uma água contendo 7% w/v  $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ , 5% de ácido fórmico e 8,5% de HCl (Schwab et al., 1997). As articulações do

joelho descalcificadas foram lavadas ao longo da noite em 0,1 M de tampão fosfato (pH=7,4) e depois encubadas em 15% de sacarose e 0,1 M tampão fosfato por 24h. Em seguida, o tecido foi congelado a -80°C.

#### **4.8.2 Coloração histológica e marcação da patologia**

Cada fração do joelho foi seccionada usando o criostato para fornecer secções coronais de 20 µm. Após a secagem, as lâminas foram inicialmente observadas para identificar o espaço intra-articular e a região central da carga do joelho. Essas secções foram mergulhadas em hematoxilina/eosina e, em seguida, desidratadas com etanol, utilizando uma série composta por 70, 90 e 100%. Finalmente, as secções foram montadas antes de serem fotografadas com um microscópio Nikon com uma câmera digital colorida anexada. Aproximadamente 10 secções de cada animal foram individualmente marcadas para a patologia. Estas secções compreendiam as imagens de uma região de 2 mm através da superfície da articulação femoro-tibial. O protocolo foi conduzido baseado em protocolos prévios (Fernihough et al., 2004).

#### **4.9 Coleta de sangue**

Ao final do experimento os ratos foram imediatamente eutanasiados pelo método da decapitação em uma sala adjacente. Saliente-se que esse procedimento requer muita experiência e destreza para imobilizar o animal corretamente e precisão no manejo da guilhotina, pelo qual apenas duas pessoas realizaram a decapitação no decorrer dos experimentos. O sangue foi recolhido em tubos de vidro específicos de acordo com a dosagem hormonal a ser realizada. Tubos de vidros de 10 ml sem anticoagulante (soro) ou de 5 ml com anticoagulante EDTA (plasma) foram utilizados para a determinação hormonal da testosterona, da progesterona e do estradiol, respectivamente. Após a coleta, os tubos foram



centrifugados a 3.500 rpm por 10 minutos, sendo o soro à temperatura ambiente e o plasma a 4°C. O sobrenadante foi pipetado e armazenado em tubos menores a -80°C até a realização dos ensaios.

#### **4.10 Análise Hormonal**

Cada ensaio hormonal para um determinado hormônio foi realizado no mesmo dia para todos os grupos pertencentes àquele experimento. A concentração da testosterona foi determinada por meio do ensaio da quimioluminescência imunométrica (Advia Centauro, Bayer Corporation, Tarrytown, NY, EUA). Em relação à concentração da progesterona, foi utilizado o imunocompetitivo (Advia Centauro, Bayer Corporation, Tarrytown, NY, EUA). A técnica de radioimunoensaio foi utilizada para determinar as concentrações do estradiol (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, EUA).

#### **4.11 Análise estatística**

**Artigo 1:** Os dados foram analisados usando a análise de variância de duas vias (ANOVA) para medidas repetidas do registro de sono (basal, D1 até D28) e grupo (CTRL, SHAM e OA) como os principais fatores, seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan.

**Artigo 2:** Os dados foram analisados usando a análise de variância de três vias (ANOVA) para medidas repetidas do registro de sono (D1 até D28), grupo (CTRL, SHAM e OA) e gênero (macho, fêmea estro e fêmeas diestro) como os principais fatores, seguida pelo teste de *post hoc* de Duncan.

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão e o nível de significância estabelecido foi de  $p \leq 0,05$ .



## *5 RESULTADOS*

---

**ARTIGO 1****PADRÃO DE SONO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE**

Silva A, Andersen ML, Tufik S

A osteoartrite (OA) é um dos grandes problemas de saúde, tendo a sua prevalência aumentado nas últimas décadas. Tem sido demonstrado que a relação entre a dor e o sono produz mudanças no padrão de sono e na percepção da dor. No entanto, estudos eletrofisiológicos com modelos animais de dor ainda são limitados. O presente estudo analisou o efeito da dor crônica articular no padrão de sono em um modelo experimental com a OA em ratos machos. Foram implantados eletrodos para registro do eletrocorticograma e do eletromiograma. A OA foi induzida nesses animais por meio da administração intra-articular do iodoacetato no joelho esquerdo. Os registros de sono foram monitorados durante o período claro e escuro, com a duração de 12 horas cada, e foram avaliados no início do estudo (antes da administração) e nos dias 1, 10, 15, 20 e 28 após a injeção do iodoacetato. A OA foi comparada aos grupos SHAM (administração de veículo) e grupo controle (não manipulado). O limiar da dor foi avaliado no teste da placa quente com um adicional grupo de animais nos mesmos dias. Os resultados demonstraram que a OA induziu a uma redução significativa no limiar da dor térmica a partir do 10º dia até ao final do experimento. As análises dos registros de sono mostraram que os ratos com a OA tiveram alterações no padrão de sono, como a redução da eficiência de sono, do sono de ondas lentas e do sono paradoxal, assim como um aumento do número de despertares durante o período claro comparado com o período basal e com os grupos SHAM e controle. Estas mudanças no padrão de sono ocorreram principalmente entre os 10º e 28º dia. No período escuro, os distúrbios de sono também foram observados uma vez que houve uma diminuição da eficiência de sono, do sono de ondas lentas e do sono paradoxal. Nossos resultados sugerem que a dor associada com o modelo animal com a OA provoca marcantes alterações na arquitetura de sono nos ratos.























**ARTIGO 2****DIFERENÇAS DO GÊNERO NO PADRÃO DE SONO EM UM MODELO  
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE**

Silva A, Andersen ML, Araujo P, Zager A, Tufik S

A osteoartrite (OA) é um dos grandes problemas de saúde e é caracterizada pela degeneração da cartilagem articular e está associada à dor crônica e aos distúrbios do sono. O presente estudo analisou o efeito da dor crônica articular no padrão de sono em um modelo experimental com a OA em ratos machos e fêmeas. Para o registro do eletrocorticograma e do eletromiograma foram implantados eletrodos nos ratos. A OA foi induzida nesses animais pela administração intra-articular do iodoacetato de (2mg) no joelho esquerdo de ratos machos e das fêmeas (estro e diestro). Os registros de sono foram monitorados durante o período claro e escuro com duração de 12h cada um e foram avaliados nos dias 1, 10, 15, 20 e 28 após a injeção de iodoacetato, SHAM ou controle. Os resultados demonstraram alterações na arquitetura do sono de forma geral em ambos os gêneros. Estas alterações, que ocorreram no período claro e escuro, e iniciaram-se no dia 1 (D1) e persistiram até ao final do estudo. Os ratos OA, independentemente do gênero apresentaram uma fragmentação no padrão de sono com uma redução da eficiência de sono, do sono de ondas lentas e do sono paradoxal, bem como uma menor duração nos episódios de sono paradoxal. No entanto, os machos apresentaram uma menor eficiência de sono e de ondas lentas do sono, em comparação com as fêmeas no período escuro. Além disto, a OA afetou os níveis hormonais nos machos, uma vez que os níveis da testosterona foram reduzidos em comparação com os grupos controle e SHAM. Nas fêmeas, a progesterona e o estradiol permaneceram inalterados durante o estudo. Nossos resultados sugerem que o modelo crônico da OA influencia o padrão de sono de ambos os gêneros, porém os machos parecem ser mais afetados.

**Submetido, 2009**

**GENDER DIFFERENCES IN SLEEP PATTERN OF RATS IN AN  
EXPERIMENTAL MODEL OF OSTEOARTHRITIS**

Silva A, Andersen ML\*, Araujo P, Zager A and Tufik S

Department of Psychobiology – Universidade Federal de São Paulo, Escola  
Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), São Paulo, SP, Brazil

**Running title:** Sleep and gender in osteoarthritic rats

**Corresponding author\*:**

Monica Levy Andersen

Department of Psychobiology - Universidade Federal de São Paulo

Rua Napoleão de Barros, 925

Vila Clementino - SP- 04024-002

São Paulo – SP – Brazil

Phone # (55-11) 2149-0155

Fax # (55-11) 5572-5092

E-mail address: [mandersen@psicobio.epm.br](mailto:mandersen@psicobio.epm.br)

**ABSTRACT**

**Objective:** Osteoarthritis (OA) is a major healthcare burden with increasing incidence, characterized by degeneration of articular cartilage. OA is associated with chronic pain and sleep disturbance. The current study examined the long-term effect of chronic articular pain on sleep patterns in an experimental model of OA in female as compared to male rats. **Methods:** Rats were implanted with electrodes for electrocorticography and electromyography and assigned to control, sham or OA groups. OA was induced by the intra-articular administration of (2mg) monosodium iodoacetate into the left knee joint in male and female (at estrus and diestrus phases) rats. Sleep was monitored at days 1, 10, 15, 20 and 28 after iodoacetate injection during light and dark periods. **Results:** The results showed that the overall sleep architecture changed in both genders. These alterations occurred during the light and dark periods, beginning on D1 and persisting until the end of the study. OA rats regardless of gender showed a fragmented sleep pattern with reduced sleep efficiency, slow-wave sleep, and paradoxical sleep, with fewer paradoxical sleep bouts. However, the males showed lower sleep efficiency and reduced slow-wave sleep as compared to females during the dark period. Additionally, OA affected hormonal levels in the male rats, as testosterone levels were reduced in comparison to the control and sham groups. In females, progesterone and estradiol remained unchanged throughout the study. **Conclusion:** Thus, our results suggest that the chronic model of OA influenced sleep pattern in both genders; however, males appeared to be more affected.

**INTRODUCTION**

Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative disease of the joints, affecting at least 50% of people over 65 years of age, and occurring in younger individuals following joint injury (Bove et al., 2009). This proportion is set to rise as OA prevalence increases with obesity and as the aged population expands. OA is characterized initially by cartilage degradation which precedes changes in the underlying subchondral bone. Patients often present pain and disability after a significant loss of articular cartilage (Bove et al., 2009).

Until recently, mechanisms of pain generation in OA were not well understood, due to a lack of clinically relevant animal models and sensitive methods for measuring pain behavior (Pomonis et al., 2005; Bove et al., 2009). For instance, recent data from our group indicate that male rats with OA induced by sodium iodoacetate exhibited significantly altered sleep architecture directly associated with increased pain. The alterations in sleep pattern occurred mainly during the light period, beginning on 10<sup>o</sup> day after injection of monosodium iodoacetate and persisting until the end of the study (Silva et al., 2008a). Indeed, the single intra-articular injection of monosodium iodoacetate into the femorotibial joint is a reliable model of OA in rats (Fernihough et al., 2004) as it results in chondrocyte death and the development of OA resembling human disease (Guzman et al., 2003).

It has been documented that gender may play a role in a wide array of orthopedic diseases, including OA (Srikanth et al., 2005). The gender difference is of particular concern when it comes to the development of OA as the condition continues to be diagnosed more frequently in women than men (Fillingim et al., 2009). Incidence will likely continue to increase as the population increases in both age and weight (Mokdad et al., 2003; Price and Herndon, 2009). Notwithstanding, in sleep surveys women report considerably more sleep problems than men (Lindberg et al., 1997; Silva et al., 2008b). Therefore, it is expected that women that suffer OA would present a higher prevalence of sleep problems. For instance,



women participants frequently reported that OA pain had a negative impact on sleep, including both sleep onset and sleep maintenance (Hawker et al., 2008). Only a few studies have examined the presence of sleep disorders in conjunction with OA in women patients.

To our knowledge, no study has been conducted to investigate whether gender distinctly influences the sleep architecture under an OA paradigm in an animal model. Thus, the purpose of the present study was to examine long-term sleep pattern in an experimental model of OA in female as compared to male rats.

## **METHODS**

### ***Subjects***

The study was performed using adult male and female Wistar rats (250-350 g) that were bred in the animal facility of CEDEME (Universidade Federal de São Paulo, Brazil). Rats were maintained in a temperature-controlled room ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) with a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 7 a.m.) from birth and allowed access to food and water *ad libitum* in standard polypropylene cages. Rats used in this study were maintained and treated in accordance with the Ethical and Practical Principles of the Use of Laboratory Animals guidelines (Andersen et al., 2004a) and the experimental protocol was approved by the Ethical Committee of UNIFESP (CEP N° 1292/06).

### ***Development of osteoarthritis in the rat***

Female and male rats were randomly distributed to the following three groups (N=6): control (CTRL), SHAM or OA. Joint damage was induced by a single intra-articular injection of 2 mg of sodium iodoacetate into the left knee joint of lightly anaesthetized (halothane) rats at a total volume of 25  $\mu\text{L}$  (Fernihough et al., 2004). For the SHAM operation, saline was injected into the knee, while the CTRL

group did not receive any intervention. This protocol was used in our previous study (Silva et al., 2008a).

With the leg flexed at the knee at a 90° angle, sodium iodoacetate solution was injected through the patellar ligament using a 26GX3/8 needle. The 2 mg dose produced strong, reproducible hyperalgesia and allodynia with no effects on the general health of the animals (Fernihough et al., 2004). Robust hyperalgesia was observed until day 28 (Guingamp et al., 1997). Iodoacetate causes joint pathology via inhibition of glycolysis in vascular cartilage results in chondrocyte death (Janusz et al., 2002). The general health of the animals was monitored daily.

### ***Determination of the estrous phase***

Smearing was conducted for 14 days prior to the experimental period. Vaginal smear cytology was used to determine the phase of the estrous cycle, and all samples were taken between 0800 and 0900 h. Changes in vaginal epithelial cell morphology were used to indicate the phase of the estrus cycle in terms of the occurrence of the following three cell types in the vaginal smears: leukocytes, cornified cells, and nucleated epithelial cells. Estrus (E) was represented by many cornified cells and no leukocytes, and diestrus (D) by the presence of a few nucleated epithelial cells and many leukocytes.

### ***Groups and experimental design***

Sleep recordings and hormonal evaluation were conducted in the same groups of rats at baseline and at 1, 10, 15, 20 and 28 days after injection. These time-points were based on the protocol of Fernihough et al. (2004).

All females were smeared daily and the rats that exhibited two regular cycles were selected. Similarly to males, female rats were randomly assigned to the CTRL, SHAM or OA group. On the day of sodium iodoacetate injection, the female rats were randomly distributed to the following groups: CTRL-Diestrus, SHAM-Diestrus, OA-Diestrus, CTRL-Estrus, SHAM-Estrus and OA-Estrus.

**Experiment 1 – Evaluation of sleep pattern****a) Stereotaxic surgery**

Another group of naive rats were anesthetized with diazepam (10 mg/kg, i.p.) and ketamine (90 mg/kg, i.p.) and mounted in a classic stereotaxic frame (Insight Instruments, Brazil) for assessment of their sleep-wake cycles. Two bipolar electrodes with four stainless-steel screws ( $\varnothing$  0.9 mm) were placed into the skull through small holes bored into the right lateral fronto-parietal region (one pair) and in the left medial fronto-parietal region (another pair) in order to monitor the bipolar electrocorticogram (ECoG). The free ends of the electrodes were soldered to a socket that was attached to the skull with acrylic dental cement. Two nickel-chromium flexible wires were inserted into the neck muscles in order to record the electromyogram (EMG). All rats received penicillin (20,000 U in 0.1 ml, i.m.) and sodium diclofenac (25 mg/ml, i.m.) after surgery. One week after surgery, the sockets were connected via flexible recording cables and a commutator to a polygraph and computer. The rats habituated to the apparatus (with the wires attached) over the course of three days, at which point their 48 h basal sleep-wake states were recorded. The mean values from two days of baseline recordings were used for further comparisons. The single intra-articular injection of saline/sodium iodoacetate into the knee joint occurred the next day (at 7 a.m.) after the baseline recording.

**b) Sleep recording**

The recordings were performed on a Nihon Koden Co. (Tokyo, Japan) model QP-223A apparatus using three channels for each animal: two for ECoG readings and one for head-muscle activity (EMG). The ECoG signals were amplified and filtered with a low-pass filter at 0.5 Hz and higher cutoff of 35 Hz, as the EEG frequency band between 0.5 and 30 Hz has the most clinical relevance in the conscious state (Sinha, 2008). The EMG activity was filtered with a low-pass filter at 5.3 Hz as this protocol allows recording of the fast range of frequencies.

Sleep recordings were monitored during light and dark periods lasting 12 h each (food and water were available *ad libitum*) and were evaluated at baseline (prior to administration) as well as on days 1, 10, 15, 20 and 28 after the injection of saline or iodoacetate, or assignment to SHAM or CTRL groups. During the experimental period, rats were kept continuously in their own cage, which had been placed inside a Faraday chamber. The ECoG traces were visually and manually scored blindly for 30 s periods. All recordings were scored by one researcher, thus assuring consistency of the data. The sleep stages were identified and scored according to Timofeiev et al. (1970).

The following sleep parameters were assessed: sleep efficiency (the total sleep time percentage during the recording time); slow-wave sleep (SWS, the deep sleep time percentage throughout recording); paradoxical sleep (PS, the PS time percentage throughout the recording); and PS episodes and microarousal (events at least 15 s long with abrupt modification of baseline ECoG frequency accompanied by high amplitude EMG activity followed by SWS). PS episodes and microarousal values were expressed as absolute numbers.

### ***Hormonal analysis***

At the end of the experiment, all animals were brought to an adjacent room and decapitated between 10am-12pm. Blood was collected in glass tubes and centrifuged (3,500rpm/10min) to obtain samples of serum or plasma. Intra-assay coefficients of variation are given in parentheses. The serum testosterone (7.7%) and progesterone (6.5%) were measured by chemiluminescent enzyme immunoassay (Advia Centaur, Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA). The radioimmunoassay technique was used to determine concentrations of estradiol (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA).

### ***Statistical analysis***

Data with homogeneity of variance were analyzed using three-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures with recording, behavior (D1

until D28), group (CTRL, SHAM and OA) and gender (male, estro and diestro) as the main factors. Multiple post hoc comparisons were performed using the Duncan test. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### ***Sleep Parameters***

#### ***Light period***

##### ***Sleep efficiency***

ANOVA revealed group effects [ $F_{(2,45)}=673.88$ ;  $p < 0.0001$ ] and an effect for time of recording [ $F_{(4,180)}=42.18$ ;  $p < 0.0001$ ], as well as an interaction effect between these factors [ $F_{(8,180)}=31.56$ ;  $p < 0.0001$ ]. When sleep efficiency was evaluated from D10 to D28, OA male rats displayed decreased sleep efficiency when compared to D1 ( $p < 0.01$ ), D10 ( $p < 0.001$ ), D15 ( $p < 0.01$ ) and CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ) (Figure 1A). The injection of sodium iodoacetate into the left knee joint in both groups (diestrus and estrus) of female OA modified the sleep efficiency, as revealed when these rats were compared with D1 ( $p < 0.001$ ), and CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ). The sleep efficiency was also lower in female OA estrus rats at D20 and D28 when compared to D10 ( $p < 0.01$ ) and D15 ( $p < 0.01$ ) (Figure 1A). No interaction was observed between gender and sleep parameters.

##### ***Slow-wave sleep (SWS)***

As shown in Figure 1B, main group effects [ $F_{(2,45)}=518.16$ ;  $p < 0.0001$ ] and an effect of time of recording [ $F_{(4,180)}=30.33$ ;  $p < 0.0001$ ], as well as an interaction effect between these factors [ $F_{(8,180)}=18.30$ ;  $p < 0.0001$ ] were observed. We found that only female OA diestrus D1 rats differed compared to CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ). OA in male and female rats resulted in significantly less

SWS from D10 to D28 as compared with D1 ( $p<0.01$ ), D10 ( $p<0.01$ ), D15 ( $p<0.01$ ) and CTRL and SHAM groups ( $p<0.01$ ). No interaction was observed between gender and sleep parameters.

#### *Paradoxical sleep (PS)*

Statistical analysis revealed main group effects [ $F_{(2,45)}=86.34$ ;  $p<0.0001$ ], gender [ $F_{(2,45)}=11.890$ ;  $p<0.0001$ ] and time of recording [ $F_{(4,180)}=2.82$ ;  $p<0.02$ ], as well as an interaction effect between group and time factors [ $F_{(8,180)}=7.09$ ;  $p<0.00001$ ]. During the light periods, a decreased percentage of PS in the male and female OA groups was observed from D10 to D28 when compared to D1 ( $p<0.01$ ) and CTRL and SHAM groups ( $p<0.01$ ). OA rats at D1 also differed from the female OA diestrus group at D1 ( $p<0.01$ ), as shown in Figure 1C.

#### *Paradoxical sleep episodes*

There was a statistically significant difference among the groups [ $F_{(2,45)}=139.35$ ;  $p<0.0001$ ] and time-points [ $F_{(4,180)}=6.22$ ;  $p<0.0001$ ], as well as an interaction effect between these factors [ $F_{(8,180)}=8.00$ ;  $p<0.0001$ ]. The number of PS episodes from D10 to D28 decreased in OA males, as well as in diestrus OA and estrus OA groups when compared with CTRL and SHAM groups ( $p<0.01$ ). From D15 until D28 all groups differed at D1 ( $p<0.01$ ), and the female OA estrus D10 rats differed from those at D1 ( $p<0.01$ ). Fewer PS episodes were observed in the female OA diestrus group between D20 and D28 when compared to D10 ( $p<0.01$ ). And yet, the male OA group differed between D28 and D10 ( $p<0.01$ ) (Table 1A).

#### *Paradoxical sleep duration*

Statistical analysis revealed main effects of gender [ $F_{(2,45)}=9.04$ ;  $p<0.001$ ] as well as an interaction effect between time and gender factors [ $F_{(8,180)}=2.26$ ;  $p<0.02$ ]. The PS duration is longer in the male OA D1 and D10 rats when compared to female OA diestrus rats ( $p<0.01$ ). The female OA diestrus group at D10 demonstrated shorter PS duration when compared to the female OA estrus group ( $p<0.01$ ), as shown in Table 1B.

---

*Microarousal*

ANOVA revealed a significant group effect [ $F_{(2,45)}=83.33$ ;  $p<0.0001$ ] and significant time-point differences [ $F_{(4,180)}=9.19$ ;  $p<0.0001$ ], as well as an interaction effect between these factors [ $F_{(8,180)}=5.76$ ;  $p<0.0001$ ]. The number of microarousals was significantly increased in the male OA group on D15, D20 and D28 as compared with the respective D1 ( $p<0.01$ ) and CTRL and SHAM groups ( $p<0.01$ ). And yet, the male OA group measurements at D20 and D28 also differed from those at D10 ( $p<0.01$ ) and D15 ( $p<0.01$ ). The male OA group values at D28 differed from those at D20 ( $p<0.01$ ). The injection of sodium iodoacetate administered to female rats in the OA diestrus group increased the number of microarousal bouts at D20 when compared with CTRL and SHAM groups ( $p<0.01$ ); the female OA diestrus group measurements from D28 differed from those obtained on D1 ( $p<0.01$ ), D10 ( $p<0.01$ ) and D15 ( $p<0.01$ ). The female OA estrus rats showed an increase in microarousal from D15 until D28 as compared with CTRL and SHAM groups ( $p<0.01$ ). At D20, this same group differed from D1 ( $p<0.01$ ), as shown in Table 3A.

*Dark period**Sleep efficiency*

ANOVA revealed group effects [ $F_{(2,45)}=349.52$ ;  $p<0.0001$ ], effects for gender [ $F_{(2,45)}=11.427$ ;  $p<0.0001$ ] and time of recording [ $F_{(4,180)}=28.53$ ;  $p<0.0001$ ], as well as an interaction effect between gender and group factors [ $F_{(4,45)}=2.66$ ;  $p<0.04$ ] and an interaction effect between time and group [ $F_{(8,180)}=30.84$ ;  $p<0.0001$ ]. From D10 to D28, OA male and female rats displayed decreased sleep efficiency when compared to D1 ( $p<0.01$ ) and respective CTRL and SHAM groups ( $p<0.01$ ) (Figure 2A). Sleep efficiency was also lower in male OA rats at D10, D15 and D28 when compared to female OA estrus rats ( $p<0.01$ ), and male OA rats at D15 and D28 differed from female OA diestrus rats ( $p<0.01$ ). In females with OA, D20

differed from D10 ( $p < 0.01$ ), and the diestrus female OA rat measurements at D20 differed from those at D15 ( $p < 0.01$ ). Sleep efficiency was also lower in female OA diestrus rats at D28 when compared to D10 ( $p < 0.01$ ), D15 ( $p < 0.01$ ) and D20 ( $p < 0.01$ ). The male OA rats differed at D28 when compared with D10 ( $p < 0.01$ ) (Figure 2A).

#### *Slow-wave sleep*

As shown in Figure 2B, main group effects [ $F_{(2,45)}=7.82$ ;  $p < 0.001$ ], effects of gender [ $F_{(2,45)}=239.27$ ;  $p < 0.0001$ ] and time of recording [ $F_{(4,180)}=18.23$ ;  $p < 0.0001$ ], as well as an interaction effect between gender and group factors [ $F_{(4,45)}=3.63$ ;  $p < 0.01$ ] and an interaction effect between gender and time [ $F_{(8,180)}=21.19$ ;  $p < 0.0001$ ], were observed. We observed that from D10 to D28, male and female OA rats displayed decreased SWS when compared to D1 ( $p < 0.01$ ) and CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ) (Figure 2B). The male OA group showed significantly less SWS when compared with the female OA estrus group at D10, D15, D20 and D28 ( $p < 0.01$ ).

#### *Paradoxical sleep*

Statistical analysis revealed main effects of group [ $F_{(2,45)}=73.15$ ;  $p < 0.0001$ ] and time of recording [ $F_{(4,180)}=4.01$ ;  $p < 0.01$ ], as well as an interaction effect between these factors [ $F_{(8,180)}=3.47$ ;  $p < 0.001$ ]. Less PS was observed in OA rats (male and female) from D10 to D28 as compared to the respective D1 rats ( $p < 0.01$ ), and as compared to the CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ), as shown in Figure 2C.

#### *Paradoxical sleep episodes*

As shown in Table 2A, we observed main effects of group [ $F_{(2,45)}=82.21$ ;  $p < 0.0001$ ] and time of recording [ $F_{(4,180)}=5.16$ ;  $p < 0.001$ ], as well as an interaction effect between gender and group factors [ $F_{(4,45)}=4.93$ ;  $p < 0.01$ ] and an interaction effect between group and time [ $F_{(8,180)}=3.85$ ;  $p < 0.001$ ]. From D10 to D28, both groups of female OA rats displayed decreased PS episodes when



compared to D1 ( $p < 0.01$ ), and CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ). The female OA estrus group at D1 and male OA group at D15 and D28 differed from respective CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ). The male OA group differed at D10 and D20 from D1 ( $p < 0.01$ ), and CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ).

#### *Paradoxical sleep duration*

There was a statistically significant difference among the groups [ $F_{(2,45)} = 23.28$ ;  $p < 0.0001$ ]. The PS duration decreased in the male OA group when compared with CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ), as shown in Table 2B.

#### *Microarousal*

ANOVA revealed a significant effect of group [ $F_{(2,45)} = 9.57$ ;  $p < 0.001$ ]. The number of microarousals was significantly increased in the male and female OA estrus groups on D1 as compared with CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ). The female OA estrus group values from D10 until D28 differed from D1 values ( $p < 0.01$ ), as shown in Table 3B.

#### ***Hormone concentrations***

ANOVA revealed a significant effect of gender [ $F_{(2,46)} = 19.95$ ;  $p < 0.0001$ ] and Duncan test indicated that progesterone concentrations were higher in all female groups ( $p < 0.01$ ) as compared with the male rats at the end of the protocol (D28) (Figure 3A). The same effect was observed for the estradiol concentrations [ $F_{(2,46)} = 12.29$ ;  $p < 0.0001$ ] (Figure 3B). For testosterone, the statistical analysis revealed main effects of gender [ $F_{(2,46)} = 302.69$ ;  $p < 0.0001$ ] and an interaction effect between gender and group [ $F_{(4,46)} = 5.73$ ;  $p < 0.0001$ ]. The testosterone concentrations were lower in all female groups as compared with the male rats ( $p < 0.01$ ) (Figure 3C). OA affected hormonal levels in the male rats, as testosterone levels were reduced compared with the CTRL and SHAM groups ( $p < 0.01$ ). In females, progesterone and estradiol remained unchanged ( $p > 0.05$ ).

**DISCUSSION**

In this current study, we have investigated the gender differences in sleep pattern in an experimental model of OA in the knee. We also expanded the investigation in order to examine the influence of phases of the estrous cycle on sleep architecture under an OA paradigm. Our main findings showed a fragmented sleep pattern with reduced sleep efficiency, SWS, and PS, and with fewer paradoxical sleep bouts in males and females. These alterations occurred mainly in the light period, and began on D1 and persisted until the end of the study. The results indicate that the overall sleep architecture changed in both genders. Interestingly, the males were more affected by OA during the dark periods of recording as they showed lower sleep efficiency and SWS compared to females. Hormonal measurements indicate that OA affected the hormonal levels in the male rats, as testosterone levels were reduced compared with the CTRL and SHAM groups. Female rats with OA did not exhibit any changes in progesterone or estradiol levels.

Chronic pain associated with OA can have a significant impact on normal sleep, which can in turn affect multiple aspects of daily life. Because greater pain intensity has been associated with a host of sleep disturbances (such as decreased sleep time, reduced sleep satisfaction, delayed sleep onset, and more frequent awakenings), greater understanding of the relationship between chronic pain and sleep is vital to successful patient management (Turk and Cohen, 2009). This altered sleep pattern can be mainly attributed to the difficulties of sleep maintenance and sleep disruption. Indeed, sleep disturbances are common among people with OA (Abad et al., 2008; Turk and Cohen, 2009). In a survey of 429 subjects with OA, problems with sleep onset, sleep maintenance, and early morning awakenings were reported by 31%, 81%, and 51% of the participants, respectively. Greater sleep disturbances were correlated with more arthritic joints, knee pain, poorer self-rated health, poorer physical functioning, and poorer physical performance (Wilcox et al., 2000). Furthermore, polysomnography conducted in 14

male patients with OA demonstrates an increase in the proportion of stage 1 NREM sleep, reduced stage 2 sleep, and increased sleep fragmentation as compared to the sleep patterns seen in 16 matched healthy controls (Leigh et al., 1988). These data are in line with our findings of more microarousal events observed in male and female OA groups (Table 3).

Our group has investigated this complex interaction between sleep and pain in animal models as well as clinical conditions (Andersen and Tufik, 2000, 2003; Andersen et al., 2006a; Nascimento et al., 2007; Roizenblatt et al., 2001; Schütz et al., 2007, 2009; Smith et al., 2009). For instance, it has been demonstrated that arthritis induced by Freund's adjuvant injected into rat hind-paws causes reduced sleep efficiency, SWS and PS, as well as increased latency to the first sleep episode and arousal events (Andersen and Tufik, 2000). The data from this study corroborate previous studies suggesting that sleep disturbances attributable to pain suggest a bidirectional relationship between sleep disturbance and pain (Moldofsky, 2001; Schutz et al., 2003; Silva et al., 2008a; Abernethy et al., 2008).

A recent meta-analysis on sex differences in OA indicated that females as compared with males are at significantly increased risk for OA in the knee and hand (Srikanth et al., 2005). Some studies have documented sex differences in pain prevalence, ratings, and depression in OA (Fillingim et al., 2009). For instance, two studies have reported sex differences in the prevalence of OA-related pain. For instance, the prevalence of persistent knee pain was estimated as 24% for females and 18% for males (Andersen et al., 1999).

In our study, we observed that the sleep architecture changed in both genders. OA animals showed a fragmented sleep pattern with reduced sleep efficiency, SWS, and PS, as well as fewer PS bouts, regardless of gender. Similarly to our previous study (Silva et al., 2008a), these alterations occurred in both light and dark periods. Interestingly, males had more PS than females on the first day during the light phase: the duration of PS episodes increased on D1 and D10. Males also showed lower sleep efficiency and SWS during the dark period. These

data could suggest that chronic OA has a stronger effect on sleep pattern in males than in females. With respect to the sex differences in the effect of pain on sleep, Schütz and colleagues (2009) also observed that the sleep pattern was more affected in male rats with temporomandibular disorder than in female counterparts. In the present study, we expanded the investigation regarding sex difference, to verify whether the sleep pattern would change across the estrous cycle in OA rats. This elucidated the previously-reported relationship between the reproductive cycle and the sleep architecture (Antunes et al., 2006; Andersen et al., 2008) under pain conditions. In this sense, our main results demonstrated that female OA rats in diestrus showed more changes in sleep efficiency and microarousals during the dark period than did female OA rats at estrous.

In women, a different scenario has been found. Higher pain is reported in work settings, but not only in this context (Rollman and Lautenbacher, 2001). Unruh (1996) noted that women are more likely than men to experience a variety of recurrent pain; women also report more severe levels of pain, more frequent pain and pain of longer duration than do men. Berkley (1997) stated that, for endogenous pain, women report more multiple pains in more body regions than men. In fact, with no obvious underlying rationale, some painful diseases are more prevalent among females, while others are more common among males. For many diseases, symptoms differ between females and males. These differences are particularly noteworthy for numerous forms of musculoskeletal pain, including fibromyalgia, temporomandibular disorders, and myofascial pain, even into old age (Gallagher et al., 2000) and OA (Price and Herndon, 2009). Empirical attention to these issues will further advance knowledge regarding gender, pain and sleep management in OA.

In a meta-analytic review of 16 publications related to pain perception across the menstrual cycle, Riley and colleagues (1999) concluded that pain thresholds for mechanical, thermal, and ischemic muscle pain were higher during the follicular phase of the menstrual cycle (low to moderate levels of estradiol and

progesterone) than during perimenstrual phases of the cycle (decreasing levels of estradiol and progesterone) (Riley et al., 1999). The effect sizes were generally small to moderate. Recently, Cairns and Gazerani (2009) described the association of pain symptoms in musculoskeletal pain conditions with the reproductive cycle in women. The authors suggest that estrogens and/or progesterone cause sex-related differences in pain. Nevertheless, an alternative suggestion that testosterone, the major male sex hormone, protects men from these chronic musculoskeletal pain conditions, has also been advanced (Cairns and Gazerani, 2009). As testosterone concentrations were reduced in OA males, who showed reduced sleep efficiency, these findings could suggest that the pain condition observed in these males (Silva et al., 2008a and present data) led to sleep disruption, which caused the decrease in testosterone levels found in the OA rats. In fact, our laboratory has consistently observed decreased concentrations of testosterone in sleep-deprived male rats (Andersen et al., 2003; 2004b; 2005; for review see Andersen and Tufik, 2008). Because sleep loss induces such profound changes in secretory patterns in distinct endocrine axes, further studies are warranted in order to provide insights into the neuroendocrine alterations related to pain.

In females, it has also been reported that PS deprivation induces hormonal alterations (Andersen et al., 2004b, 2005, 2006b, 2007; Antunes et al., 2006, 2007) and that sleep-wake cycles in female rats are dramatically altered when endogenous levels of hormones undergo rapid fluctuations (Kleinlogel, 1975; Andersen et al., 2008). Thus, under a pain condition, it is expected that greater variability in crossing through phases will produce more pronounced results. Curiously and in contrast to human studies, female rats were less affected than male rats, as represented by higher sleep efficiency and SWS in the dark period.

Finally, it is important to conduct sleep studies using different pain models and sex-related differences. The results indicate that pain associated with the OA model causes altered sleep architecture in both genders. Interestingly, the males were more affected for certain sleep parameters. The mechanistic basis for

these sex-related differences is not entirely understood, but sex hormones have been cited as important factors involved in sleep physiology (Van Cauter et al., 2007; Andersen et al., 2006c; Andersen and Tufik, 2006, 2008). Emerging evidence suggests that distinct hormonal profiles may contribute to sex-related differences in the occurrence of certain musculoskeletal pain conditions and sleep parameters.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to express their thanks to Waldemarks Leite, Marilde Costa, Francieli Ruiz and Roberto Frussa Filho. This work was supported by grants from Associação Fundo de Incentivo à Psicofarmacologia (AFIP) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (CEPID #98/14303-3 to S.T., #07/56620-6 to A.S. and #06/58275-1 to A.Z.). Sergio Tufik and Monica Andersen are recipients of fellowships from CNPq.

**REFERENCES**

- Abad VC, Sarinas PS, Guilleminault C. Sleep and rheumatologic disorders. *Sleep Med Rev* 2008;12:211-28.
- Abernethy AP. Pain and sleep: establishing bi-directional association in a population-based sample. *Pain* 2008;137:1-2.
- Andersen ML, Tufik S. Altered sleep and behavioral patterns of arthritic rats. *Sleep Res Online* 2000;3:161-67.
- Andersen ML, Tufik S. Sleep patterns over 21-day period in rats with chronic constriction of sciatic nerve. *Brain Res* 2003;984:84-92.
- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Influence of paradoxical sleep deprivation and cocaine on development of spontaneous penile reflexes in rats of different ages. *Brain Res* 2003; 968:130-38.
- Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S. Experimental Procedure. In: Univ Fed São Paulo-UNIFESP, ed. *Ethical and Practical Principles of the Use of Laboratory Animals*. São Paulo, Brazil, 2004a. pp. 45-69.
- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Hormone treatment facilitates penile erection in castrated rats after sleep deprivation and cocaine. *J. Neuroendocrinol* 2004b;16:154-59.
- Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* 2005;14:83-90.
- Andersen ML, Tufik S. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res Rev* 2006;1:136-43. Review.
- Andersen ML, Nascimento DC, Machado RB, Roizenblatt S, Moldofsky H, Tufik S. Sleep disturbance induced by substance P in mice. *Behav Brain Res* 2006a;167:212-18.

- 
- Andersen ML, Antunes IB, Tufik S. Effects of paradoxical sleep deprivation on genital reflexes in five rat strains. *Horm Behav* 2006b; 49:173-80.
- Andersen ML, Bittencourt LR, Antunes IB, Tufik S. Effects of progesterone on sleep: a possible pharmacological treatment for sleep-breathing disorders? *Curr Med Chem*. 2006c;13:3575-82.
- Andersen ML, Antunes IB, Silva A, Alvarenga TA, Baracat EC, Tufik S. Effects of sleep loss on sleep architecture in Wistar rats: gender-specific rebound sleep. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:975-83.
- Andersen ML, Tufik S. The effects of testosterone on sleep and sleep-disordered breathing in men: its bidirectional interaction with erectile function. *Sleep Med Rev* 2008;12:365-79.
- Andersen RE, Crespo CJ, Ling SM, Bathon JM, Bartlett SJ. Prevalence of significant knee pain among older Americans: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Am Geriatr Soc* 1999;47:1435-38.
- Antunes IB, Andersen ML, Baracat EC, Tufik S. The effects of paradoxical sleep deprivation on estrous cycles of the female rats. *Horm Behav* 2006;49:433-40.
- Antunes IB, Andersen ML, Alvarenga TA, Tufik S. Effects of paradoxical sleep deprivation on blood parameters associated with cardiovascular risk in intact and ovariectomized rats compared with male rats. *Behav Brain Res* 2007;6:187-92.
- Berkley KJ. Sex differences in pain. *Behav Brain Sci* 1997;20:371-80.
- Bove SE, Flatters SJ, Inglis JJ, Mantyh PW. New advances in musculoskeletal pain. *Brain Res Rev* 2009;60:187-201.
- Cairns BE, Gazerani P. Sex-related differences in pain. *Maturitas*, 2009, (in press).
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Foxa A, Rediske J, Pellasb T, Kiddc B, Bevana S, Wintera J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 2004;112:83-93.
-



Filligim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL. Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. *Critical Review. The Journal of Pain* 2009;10:447-85.

Gallagher RM, Verma S, Mossey J. Chronic pain. Sources of late-life pain and risk factors for disability. *Geriatrics* 2000;55:40-47.

Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 1997;40:1670-9.

Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Monoiodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 2003;31:619-24.

Hawker GA, Stewart L, French MR, Cibere J, Jordan JM, March L. Understanding the pain experience in hip and knee osteoarthritis – an OARSI/OMERACT initiative. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:415-22.

Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:785-91.

Kleinlogel H. The rat's in estrous. *Experientia* 1975;31:712-13.

Leigh TJ, Hindmarch I, Bird HA, Wright V. Comparison of sleep in osteoarthritic patients and age and sex matched healthy controls. *Ann Rheum Dis* 1988;47:40-2.

Lindberg E, Janson C, Gislason T, Bjornsson E, Hetta J, Boman G. Sleep disturbances in a young adult population: can gender differences be explained by differences in psychological status? *Sleep* 1997;20:381-87.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003;1:76-9.

Moldofsky H. Sleep and pain. *Sleep Med Rev* 2001;5:385-96.

- Nascimento DC, Andersen ML, Hipólido DC, Nobrega JN, Tufik S. Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain mu-opioid receptors. *Behav Brain Res* 2007;178:216-20.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T, Walker K. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 2005;114:339-46.
- Price MD, Herndon JH. Gender differences in osteoarthritis. *Menopause* 2009;16:666-70.
- Riley JLI, Robinson ME, Wise EA, Price DD. A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain* 1999;81:225-35.
- Roizenblatt S, Moldofsky H, Benedito-Silva AA, Tufik S. Alpha sleep characteristics in fibromyalgia. *Arthritis Rheum* 2001;44:222-30.
- Rollman GB, Lautenbacher S. Sex Differences in Musculoskeletal Pain. *The Clinical Journal of Pain* 2001;17:20-24.
- Schütz TC, Andersen ML, Tufik S. Sleep alterations in an experimental orofacial pain model in rats. *Brain Res* 2003;993:164-71.
- Schütz TC, Andersen ML, Tufik S. Effects of COX-2 inhibitor in temporomandibular joint acute inflammation. *J Dent Res* 2007;86:475-79.
- Schütz TC, Andersen ML, Silva A, Tufik S. Distinct gender-related sleep pattern in an acute model of TMJ pain. *J Dent Res* 2009;88:471-76.
- Silva A, Andersen ML, Tufik S. Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. *Pain* 2008a 140:446-55.
- Silva A, Andersen ML, De Mello MT, Bittencourt LR, Peruzzo D, Tufik S. Gender and age differences in polysomnography findings and sleep complaints of patients referred to a sleep laboratory. *Braz J Med Biol Res* 2008b;41:1067-75.
- Sinha RK. EEG power spectrum and neural network based sleep-hypnogram analysis for a model of heat stress. *J Clin Monit Comput* 2008;22:261-8.

- Smith AK, Togeiro SM, Tufik S, Roizenblatt S. Disturbed sleep and musculoskeletal pain in the bed partner of patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2009, (in press).
- Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:769-81.
- Timo-laria C, Negrão N, Schmidek WR, Rocha TL, Hoshino K. Phases and states of sleep in the rat. *Physiol Behav* 1970;5:1057-62.
- Turk DC, Cohen MJ. Sleep as a Marker in the Effective Management of Chronic Osteoarthritis Pain with Opioid Analgesics. *Semin Arthritis Rheum* 2009 (in press).
- Unruh AM. Gender variations in clinical pain experience. *Pain* 1996;65:123-67.
- Van Cauter E, Holmback U, Knutson K, Leproult R, Miller A, Nedeltcheva A, et al. Impact of sleep and sleep loss on neuroendocrine and metabolic function. *Horm Res* 2007;67:2-9.
- Wilcox S, Brenes GA, Levine D, Sevick MA, Shumaker SA, Craven T. Factors related to sleep disturbance in older adults experiencing knee pain or knee pain with radiographic evidence of knee osteoarthritis. *J Am Geriatr Soc* 2000;48:1241-51.

---

**Figure legends**

**Figure 1.** Mean  $\pm$  SEM percentage of sleep efficiency (panel A), slow-wave sleep (panel B) and paradoxical sleep (panel C) at different time-points in male and female rats during the light period. \*Different from control (CTRL) and SHAM; #Different from D1; ¥Different from D10; †Different from D15; ºDifferent from Diestro (ANOVA followed by Duncan test). N=6/group.

**Figure 2.** Mean  $\pm$  SEM percentage of sleep efficiency (panel A), slow-wave sleep (panel B) and paradoxical sleep (panel C) at different time-points in male and female rats during the dark period. \*Different from control (CTRL) and SHAM; #Different from D1; ¥Different from D10; †Different from D15; ‡Different from D20; ºDifferent from Diestro; §Different from Estro (ANOVA followed by Duncan test). N=6/group.

**Figure 3.** Mean  $\pm$  SEM concentrations of serum progesterone (panel A), estradiol (panel B) and testosterone (panel C) in male and female rats. \*Different from control (CTRL) and SHAM; ºDifferent from Diestro; §Different from Estro (ANOVA followed by Duncan test). N=6/group.

**Table 1.** Mean  $\pm$  SEM paradoxical sleep episodes (panel A) and paradoxical sleep duration (panel B) at different time-points in male and female rats during the light period. \*Different from control (CTRL) and SHAM; #Different from D1; ¥Different from D10; ºDifferent from Diestro; §Different from Estro (ANOVA followed by Duncan test). N=6/group.

**Table 2.** Mean  $\pm$  SEM paradoxical sleep episodes (panel A) and paradoxical sleep duration (panel B) at different time-points in male and female rats during the dark period. \*Different from control (CTRL) and SHAM; #Different from D1 (ANOVA followed by Duncan test). N=6/group.

**Table 3.** Mean  $\pm$  SEM microarousals (panel A) during the light period and microarousals (panel B) during the dark period at different time-points in male and female rats. \*Different from control (CTRL) and SHAM; #Different from D1; ¥Different from D10; †Different from D15; ‡Different from D20 (ANOVA followed by Duncan test). N=6/group.

Figure 1

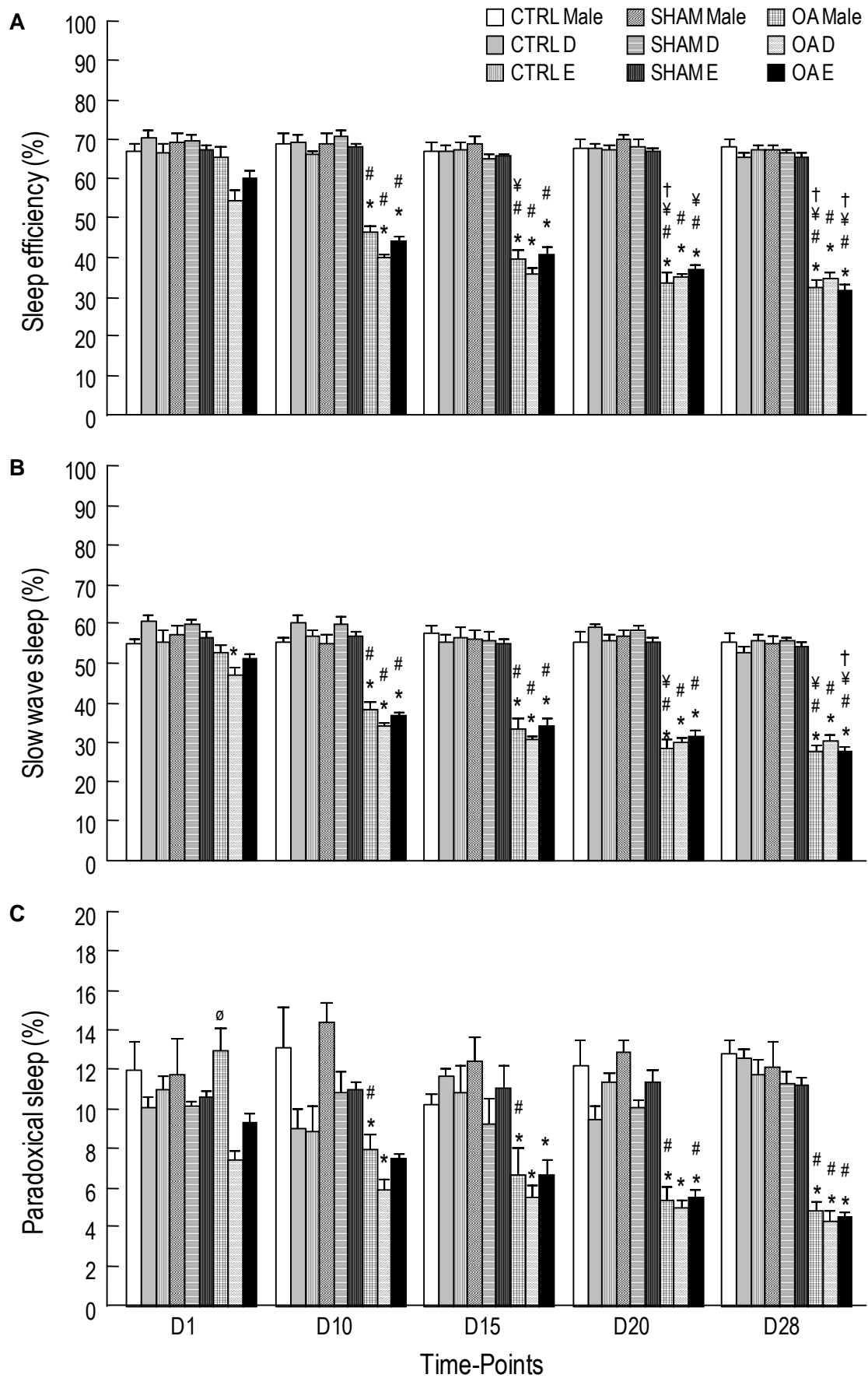


Figure 2

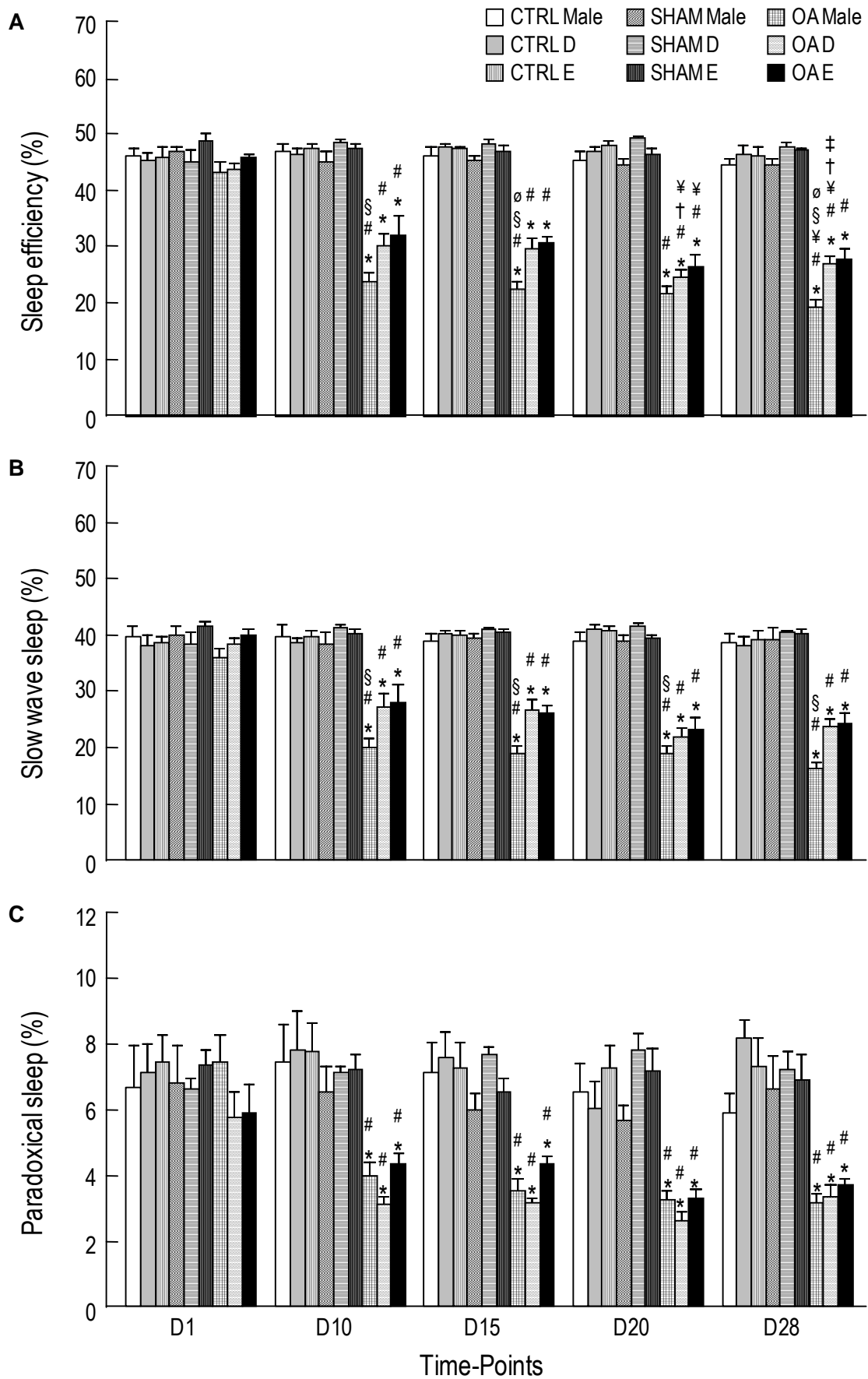


Figure 3

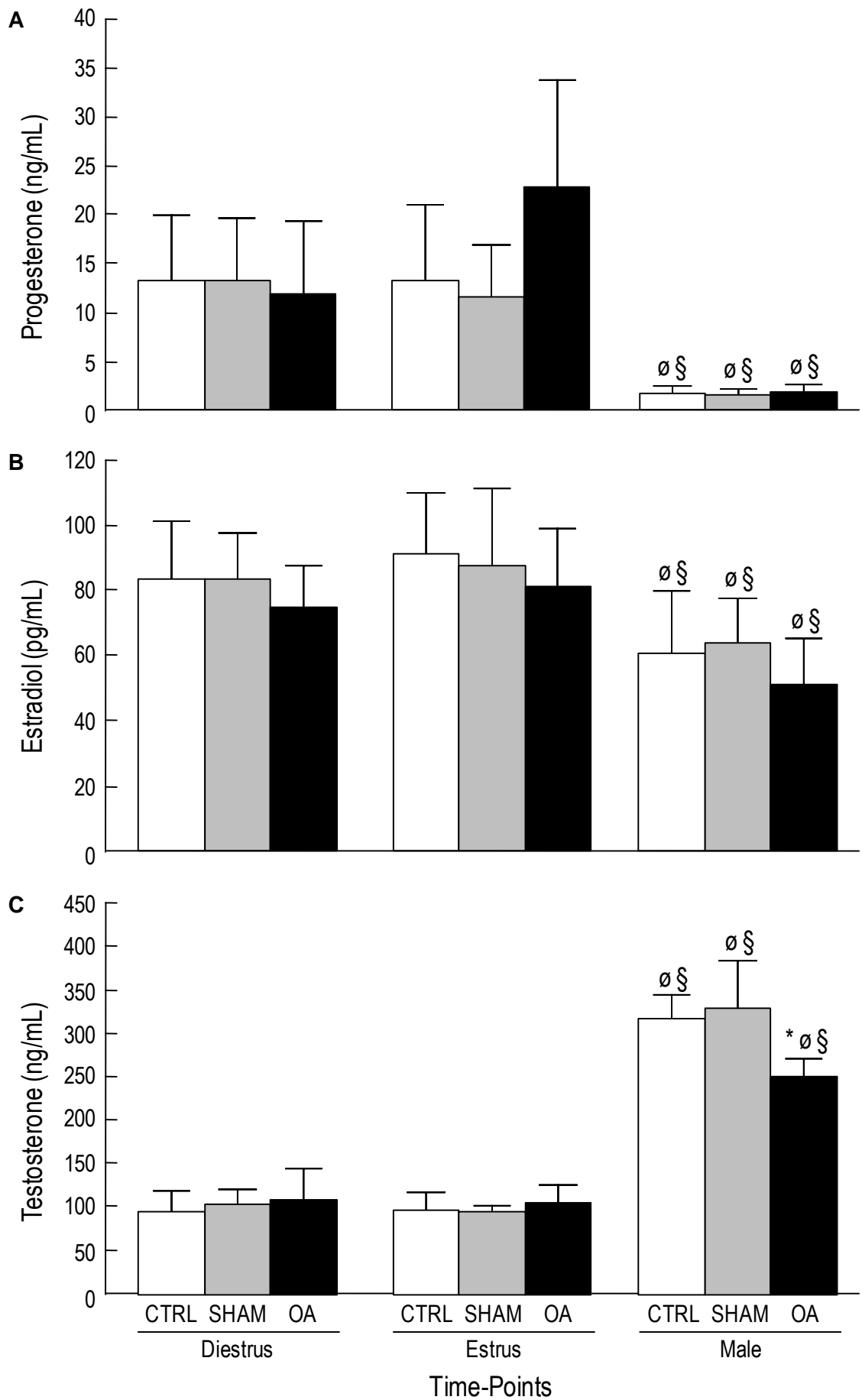


Table 1

Groups		1D	10D	15D	20D	28D	
A) PS Epiloses	Male	CTRL	31.3±2.1	30.5±1.8	31.0±1.5	31.0±1.6	33.2±2.7
		SHAM	30.7±1.2	32.7±2.0	30.2±3.5	32.8±1.8	31.2±1.9
		OA	28.2±1.6	22.3±1.3 *	19.3±2.6 <sup>#</sup>	1.5±1.4 <sup>**</sup>	15.3±1.4 <sup>***</sup>
	Female D	CTRL	30.7±1.5	28.8±2.6	30.3±1.7	28.5±2.7	32.7±1.0
		SHAM	29.2±1.9	31.5±2.8	28.5±0.9	28.2±0.9	30.8±0.5
		OA	27.0±1.5	22.3±1.0*	18.7±0.9 <sup>#</sup>	14.7±1.0 <sup>***</sup>	13.7±1.2 <sup>***</sup>
	Female E	CTRL	30.0±3.2	28.7±2.4	30.3±1.3	31.2±2.6	29.7±1.8
		SHAM	29.7±1.8	28.3±1.1	29.8±2.3	28.3±1.8	31.3±1.4
		OA	26.8±1.0	18.8±0.6 <sup>#</sup>	19.2±1.6 <sup>#</sup>	13.2±1.8 <sup>#</sup>	15.0±1.1 <sup>#</sup>
B) PS duration	Male	CTRL	2.5±0.2	2.7±0.3	2.3±0.2	2.6±0.2	2.6±0.2
		SHAM	2.8±0.3	2.8±0.2	2.9±0.1	2.5±0.1	2.8±0.1
		OA	2.9±0.1 <sup>o</sup>	2.4±0.2 <sup>o</sup>	2.3±0.1	2.2±0.1	2.2±0.1
	Female D	CTRL	2.1±0.2	2.2±0.3	2.6±0.1	1.9±0.2	2.5±0.1
		SHAM	2.3±0.2	2.3±0.4	2.1±0.3	2.3±0.1	2.4±0.1
		OA	1.6±0.2	1.6±0.1 <sup>s</sup>	1.8±0.2	2.5±0.2	2.5±0.2
	Female E	CTRL	2.5±0.2	2.1±0.3	2.3±0.3	2.5±0.2	2.6±0.1
		SHAM	2.3±0.1	2.5±0.1	2.5±0.3	2.7±0.2	2.3±0.1
		OA	2.1±0.1	2.5±0.1	2.5±0.1	3.1±0.5	2.1±0.1



Table 2

Groups		1D	10D	15D	20D	28D	
A) PS Epiloses	Male	CTRL	22.8±4.0	24.0±3.7	23.2±2.9	22.7±2.8	21.8±4.0
		SHAM	23.3±3.6	20.8±2.6	21.2±3.3	21.0±1.5	23.3±3.2
		OA	26.5±2.7	14.2±1.4*#	14.8±1.0*	13.2±1.1*#	14.8±1.2*
	Female D	CTRL	25.2±3.9	24.5±1.6	23.8±2.6	26.3±2.8	29.8±2.3
		SHAM	24.8±1.6	25.7±2.5	28.7±0.8	25.0±1.4	26.2±2.1
		OA	20.0±1.0	11.4±1.1*#	10.6±0.9*#	10.9±0.2*#	10.3±1.1*#
	Female E	CTRL	29.7±2.4	27.7±2.7	26.0±2.2	24.5±2.6	28.2±3.2
		SHAM	29.8±2.1	23.8±1.8	24.3±1.9	26.0±1.7	28.7±0.8
		OA	19.0±1.3*	11.8±0.4*#	10.2±0.6*#	9.8±0.5*#	10.7±0.9*#
B) PS duration	Male	CTRL	3.0±0.5	2.5±0.2	2.3±0.2	2.2±0.1	2.1±0.1
		SHAM	2.4±0.2	2.5±0.2	2.2±0.1	2.4±0.2	2.3±0.1
		OA	2.0±0.2*	1.8±0.2*	1.7±0.1*	1.8±0.1	1.5±0.1
	Female D	CTRL	2.1±0.4	2.3±0.3	2.4±0.3	2.2±0.3	2.0±0.2
		SHAM	2.1±0.2	2.1±0.1	2.3±0.1	2.2±0.2	2.0±0.1
		OA	2.0±0.2	1.8±0.1	2.2±0.2	1.9±0.1	1.7±0.1
	Female E	CTRL	2.2±0.2	2.6±0.4	2.4±0.3	2.5±0.2	2.1±0.2
		SHAM	2.2±0.2	2.2±0.2	2.0±0.2	2.1±0.3	2.2±0.3
		OA	1.8±0.1	2.0±0.2	2.0±0.2	2.0±0.2	1.9±0.2

Table 3

Groups		1D	10D	15D	20D	28D	
A) PS Epiloses	Male	CTRL	27.2±1.8	26.5±2.5	24.3±2.2	28.8±1.7	25.7±2.5
		SHAM	27.8±0.9	25.5±2.6	26.2±2.0	27.5±2.7	26.7±1.3
		OA	27.8±2.7	35.0±2.2	37.3±1.7 <sup>#</sup>	47.3±4.9 <sup>***†</sup>	55.7±5.9 <sup>***††</sup>
	Female D	CTRL	26.0±0.9	27.5±1.9	29.7±2.3	28.7±1.7	33.7±1.5
		SHAM	27.2±1.6	25.2±1.2	28.8±0.7	28.2±1.5	29.5±1.7
		OA	33.8±1.3	33.4±1.7	37.1±1.3	41.0±1.3 <sup>*</sup>	44.7±2.6 <sup>***†</sup>
	Female E	CTRL	31.7±1.9	31.0±1.1	28.5±2.5	28.7±2.0	29.0±1.2
		SHAM	29.5±0.8	29.3±2.2	28.0±1.6	29.8±1.5	29.3±2.5
		OA	37.5±0.8	35.2±1.2	39.3±2.4 <sup>*</sup>	43.5±1.7 <sup>***†</sup>	41.3±3.4 <sup>*</sup>
B) PS duration	Male	CTRL	30.8±2.6	31.3±3.1	30.5±1.9	30.0±4.0	26.8±4.7
		SHAM	29.8±2.2	30.0±3.3	28.2±1.8	29.0±1.4	29.7±2.8
		OA	40.8±3.5 <sup>*</sup>	34.0±3.4	37.5±2.5	35.3±3.3	36.3±3.3
	Female D	CTRL	29.7±4.3	32.5±1.3	30.3±2.5	29.2±2.2	32.7±3.4
		SHAM	28.8±2.6	31.5±1.9	32.8±1.3	29.8±0.9	33.5±1.0
		OA	33.0±2.7	32.7±2.9	38.0±2.2	35.3±1.3	34.7±3.2
	Female E	CTRL	34.5±2.2	33.0±2.0	28.7±1.9	29.3±0.5	30.8±3.4
		SHAM	32.5±1.9	32.2±1.4	30.3±2.0	29.7±2.1	32.0±1.2
		OA	24.1±2.3 <sup>*</sup>	35.3±2.8 <sup>#</sup>	35.3±1.3 <sup>#</sup>	33.9±2.1 <sup>#</sup>	35.5±1.5 <sup>#</sup>

## *6 DISCUSSÃO*

---

**Artigo 1**

Em primeiro lugar investigou-se os efeitos da OA nos parâmetros de sono dos ratos machos. Este estudo demonstrou que os ratos submetidos ao modelo de degeneração articular exibiram uma arquitetura de sono significativamente alterada. Os animais com OA apresentaram um padrão de sono fragmentado com uma redução da eficiência de sono, do sono de ondas lentas (SOL) e do sono paradoxal (SP), assim como um menor número dos episódios de SP. Essas alterações ocorreram principalmente no período claro, e iniciaram no décimo dia persistindo até o final do estudo. Paralelamente às alterações do padrão de sono, observamos diminuição do limiar de dor por estimulação térmica nociceptiva do décimo ao 28º dia. Prejuízos no padrão de sono também ocorreram no período escuro, uma vez que a eficiência de sono, SOL e SP foram reduzidas significativamente.

Os distúrbios de sono, devido à dor sugerem uma relação bidirecional entre o sono e a dor (Moldofsky, 2001; Abernethy, 2008), pela qual ambos podem interagir de forma complexa causando impacto nas atividades biológica e comportamental (Roehrs e Roth, 2005). Tem sido documentado que o sono perturbado ou não-reparador influencia o tratamento dos distúrbios dolorosos (Moldofsky, 2001). Especificamente, nosso grupo tem estudado essa complexa associação com diferentes modelos animais, assim como em condições clínicas (Andersen e Tufik, 2000, 2003; Roizenblatt et al., 2001; Andersen et al., 2006a; Nascimento et al., 2007; Schutz et al., 2003, 2004, 2007). Por exemplo, tem sido demonstrado que, a indução da artrite pelo adjuvante de Freund injetado nas patas posteriores de ratos, causa redução da eficiência de sono, do SOL e do SP, assim como aumento da latência para o primeiro episódio de sono e para os despertares (Andersen e Tufik, 2000). Alguns estudos anteriores, realizados com ratos com artrite, também chegaram a conclusões similares, as quais foram caracterizadas pelo aumento da vigília, a diminuição do SOL e do SP e fragmentação do sono (Landis et al., 1989).

Nós observamos que o modelo da OA nos ratos acarretou uma redução da eficiência de sono, provavelmente devido ao aumento de 98,1% no número de despertares e à redução do SP no período claro e escuro. Nossos achados demonstraram que tanto o SOL como o SP foram afetados nesse modelo e que, adicionalmente, o sono não foi recuperado no período escuro. Os dados mostram ainda que, durante o período claro, ocorreu um prejuízo progressivo de sono do décimo ao 28º dia. Considerando o período escuro, o sono foi similarmente prejudicado, e as alterações permaneceram consistentes ao longo dos dias avaliados. Notou-se que, enquanto o modelo da artrite das patas afetou agudamente o padrão de sono, o qual é normalizado dentro de poucos dias (Andersen e Tufik, 2000), as alterações na arquitetura do sono dos ratos com a OA ocorreram somente dez dias após a injeção, tendo persistido até ao final do protocolo experimental.

O modelo com o iodoacetato de sódio tem sido investigado como um modelo de dor da OA (Guingamp et al., 1997; Bove et al., 2003; Guzman et al., 2003). Esse modelo reproduz as características clínicas e patológicas da OA em animais através de um método minimamente invasivo. Esse modelo pode ser uma ferramenta útil para estudar a dor associada com a OA em diversos contextos (Pomonis et al., 2005). Por exemplo, as alterações patológicas induzidas pelo iodoacetato compartilham muitas similaridades com as patologias associadas com a OA nos seres humanos (Guingamp et al., 1997; Guzman et al., 2003; Fernihough et al., 2004), incluindo a perda significativa da cartilagem e as alterações no osso subcondral. Esta degeneração crônica da articulação está associada com o comportamento da dor crônica (Vermeirsch et al., 2007), atingindo a cartilagem articular onde causa a morte dos condrócitos, proporcionando assim uma base para o estudos dos mecanismos da dor no desenvolvimento da OA (Guzman et al., 2003; Fernihough et al., 2004).

No modelo animal da OA induzida pelo iodoacetato de sódio, a inflamação sinovial transitória é observada no período inicial após a injeção (Figura

21). Uma semana após o tratamento com o iodoacetato de sódio, a inflamação nas articulações está presente, sendo a sensação de dor causada, provavelmente, por forças biomecânicas que afetam a cartilagem articular e o osso subcondral (Beyreuther et al., 2007). Portanto, o modelo de iodoacetato reflete com precisão os diferentes estágios da dor nos pacientes com a OA (Beyreuther et al., 2007). Fernihough e colaboradores (2004) relataram que no quinto dia após a indução da OA com o iodoacetato, o comportamento dos animais foi caracterizado pela hiperalgesia e pela alodínea. Os pacientes com a OA também apresentam resposta hiperalgésica aos estímulos nocivos aplicados no joelho com a OA (Wessel, 1995; Bajaj et al., 2001). Apesar de não termos encontrado diferenças significativas no teste de latência na placa quente na primeira semana, encontramos mudanças claras após o décimo dia. Especificamente, o limiar de dor térmico ainda não tem sido amplamente investigado sob protocolos de longa duração. Recentemente, Vermeirsch e colaboradores (2007), utilizando o teste de Hargreave's da retirada da pata para a hipersensibilidade ao calor, descreveram que a sensibilidade térmica em cobaias estava aumentada no último estágio da OA, porém nos ratos não foi observada nenhuma mudança. A hipersensibilidade ao calor sugere uma falta de hiperalgesia secundária consistente, a qual tem sido relatada em alguns pacientes humanos que sofrem de OA (Kosek e Ordeberg, 2000; Bajaj et al., 2001). Estes dados indicam uma tendência para os próximos estudos sobre a sensibilidade térmica neste modelo, como em pacientes com a OA, indicando o aumento da sensibilidade da dor ao calor encontrada por Kosek e Ordeberg (2000). A inflamação neurogênica tem sido relatada como um possível mecanismo de indução à dor durante a OA (Marshall et al., 1990); isto é indiretamente sustentado pelas descobertas da elevada concentração de substância P no líquido sinovial (Marabini et al., 1991). Nosso estudo anterior demonstrou que o sono paradoxal é insuficiente para despolarizar motoneurônios da medula espinhal em camundongos testados na placa quente, embora seja capaz de prejudicar o padrão de sono (Andersen et al., 2006a). As alterações na arquitetura de sono, observadas no grupo injetado com a substância P,

provavelmente estão mais relacionadas à sua ação direta no ciclo vigília-sono. Tomados em conjunto, estas descobertas indicam uma forte associação entre a redução do limiar da dor e a interrupção do sono durante a OA, sendo que o aumento da sensibilidade dolorosa é provavelmente responsável pelos distúrbios de sono que, por sua vez, causam uma redução mais expressiva do limiar da dor.

Tem sido proposto que a fragmentação do padrão de sono pode promover a privação de sono (Hicks et al., 1979), que, por sua vez, aumenta as respostas comportamentais aos estímulos mecânicos (Andersen e Tufik, 2000), térmicos (Nascimento et al., 2007) e elétricos (Onen et al., 2000) dolorosos. A privação de sono pode afetar a homeostase do sono e pode ter um papel importante na nocicepção. Assim, Nascimento e colaboradores (2007) mostraram que o limiar para retirada da pata após estímulo nociceptivo térmico foi reduzido após 96 horas de privação de sono paradoxal e que esse efeito persistiu após 24 horas de recuperação do sono. Os nossos dados sugerem que o modelo de dor crônica pode apresentar um quadro valioso para o estudo das influências recíprocas entre o sono não-reparador e a dor.

Recentemente, um estudo relatou que a dor da OA tem efeitos negativos no sono dos humanos (Hawker et al., 2008). Este achado é consistente com os estudos transversais prévios que observaram que os distúrbios de sono são comuns em indivíduos com a OA, estando associados não somente com uma maior percepção da dor, mas também com uma maior fadiga, depressão ou alterações de humor (Pawlikowska et al., 1994; Loge et al., 1998). Além do efeito da dor no início e manutenção do sono, também se pode especular que o sono exarceba a dor nos indivíduos com dores crônicas como, por exemplo, a causada pela OA (Moldofsky et al., 1975, 1987).

Sabe-se que o sono é um fenômeno altamente sensível que pode ser alterado por fatores intrínsecos e extrínsecos (Foo e Mason, 2003). A perda do sono pode resultar em alterações na regulação hormonal (Andersen et al., 2002, 2004b; Van Cauter et al., 2007) e na resposta imunológica (Palma et al., 2006;

Ruiz et al., 2007; Zager et al., 2007, 2009). Portanto, condições como uma dor articular pode desorganizar o ciclo vigília-sono (Hicks et al., 1979; Landis et al., 1989; Heppelmann e Pawlak, 1997).

Ressalta-se a importância de realizar estudos eletrofisiológicos pré-clínicos, usando diversas modalidades de dor, para que as informações obtidas das pesquisas com animais possam ser extrapoladas, ampliando o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos processos dolorosos e sobre as possíveis abordagens terapêuticas.



**Artigo 2**

Neste estudo, nós avaliamos as diferenças entre os gêneros no padrão do sono em um modelo experimental da OA no joelho. Nós expandimos a investigação a fim de analisar se, as fases do ciclo estral, poderiam exercer uma influência sobre a arquitetura do sono sob o paradigma da OA. Os principais resultados mostraram um padrão de sono fragmentado com a redução da eficiência de sono, SOL e do SP, bem como menos episódios do SP nos machos e nas fêmeas. Estas alterações ocorreram no período claro e escuro, tendo-se iniciado no primeiro dia e persistindo até ao final do estudo. Os resultados indicaram que a arquitetura do sono se alterou de forma geral para ambos os gêneros. Interessantemente, os machos, quando comparado com as fêmeas, foram os mais afetados pela OA no registro do período escuro, uma vez que apresentaram uma menor eficiência de sono e SOL. As medidas hormonais indicaram que, novamente, a OA afetou mais os ratos machos, uma vez que as concentrações de testosterona, quando comparadas com os grupos controle (CTRL) e SHAM, foram reduzidas. As fêmeas com a OA não tiveram alterações significativas nos seus níveis hormonais (progesterona e estradiol).

A dor crônica associada com a OA pode ter um impacto significativo sobre o sono normal, o que, por sua vez, pode afetar vários aspectos da vida cotidiana. A intensidade dolorosa tem sido associada a uma série de alterações de sono, como a diminuição do tempo de sono, a redução da satisfação do sono, o atraso para o início do sono e o aumento na frequência dos despertares. Uma maior compreensão da relação entre a dor crônica e o sono é fundamental para o sucesso na conduta com o paciente (Turk e Cohen, 2009). Estas alterações no padrão de sono podem ser atribuídas principalmente às dificuldades da manutenção e das perturbações do sono. De fato, distúrbios de sono são comuns em pessoas com a OA (Abad et al., 2008; Turk e Cohen, 2009). Em um levantamento com 429 indivíduos com a OA, problemas com o início e a manutenção do sono, bem como o despertar precoce foram relatados,

respectivamente, por 31%, 81% e 51% dos participantes. Observou-se também existir uma correlação dos distúrbios de sono com as articulações artríticas, a dor no joelho, a piora da auto-percepção de saúde, a função e o desempenho físico (Wilcox et al., 2000). Além disto, um estudo que realizou polissonografia em 14 pacientes com OA, demonstrou um aumento do estágio 1 do sono NREM, redução do estágio 2 e aumento da fragmentação do sono em comparação com 16 indivíduos saudáveis (Leigh et al., 1988). Estes dados estão de acordo com os nossos achados, no qual ocorreu um aumento dos eventos de despertares observado nos machos e nas fêmeas dos grupos com OA (Tabela 3).

O nosso grupo tem investigado, em modelos animais, esta complexa interação entre o sono e a dor, bem como as condições clínicas (Andersen e Tufik, 2000, 2003, Andersen et al., 2006a; Nascimento et al., 2007; Roizenblatt et al., 2001; Schütz et al., 2007, 2009, Smith et al., 2009). Por exemplo, tem sido demonstrado que a artrite induzida pelo adjuvante de Freund injetado na pata posterior de ratos, provoca a redução da eficiência de sono, do SOL e do SP, bem como o aumento da latência para o primeiro episódio de sono e os despertares (Andersen e Tufik, 2000). Os dados do presente trabalho corroboram com os estudos anteriores, os quais sugerem que a alteração do sono atribuída à dor, leva a uma relação bidirecional entre os distúrbios de sono e a dor (Moldofsky, 2001; Schutz et al., 2003; Silva et al., 2008a; Abernethy et al., 2008).

Uma recente meta-análise sobre as diferenças do gênero na OA indica que as mulheres, quando comparadas com os homens têm um risco significativamente aumentado para a OA no joelho e nas mãos (Srikanth et al., 2005). Alguns estudos têm documentado as diferenças entre os gêneros quanto à prevalência da dor, às classificações e à depressão na OA (Fillingim et al., 2009, Andersen RE et al., 1999). Por exemplo, a prevalência da dor persistente no joelho foi estimada em 24% para o gênero feminino e 18% para o masculino (Andersen RE et al., 1999).

Em nosso estudo, observamos que a arquitetura do sono se alterou de forma significativa em ambos os gêneros. Os animais com a OA, independentemente do gênero, apresentaram um padrão de sono fragmentado, uma redução da eficiência de sono, do SOL e do SP, bem como menos eventos de SP. Estes resultados estão de acordo com nosso estudo anterior (Silva et al., 2008a), tendo essas alterações ocorrido tanto no período claro como no escuro. Curiosamente, os machos tiveram mais SP que as fêmeas no primeiro dia do período claro, como também a duração dos episódios de sono paradoxal foram maiores no primeiro e no décimo dia. Os machos, no período escuro, também apresentaram uma menor eficiência de sono e do SOL do que as fêmeas. Estes dados podem sugerir que a OA crônica tem um efeito mais forte sobre o padrão de sono dos machos do que das fêmeas. No que diz respeito às diferenças entre os gêneros na resposta da dor sobre o sono, Schütz e colaboradores (2009) também observaram que o padrão do sono nos machos foi mais afetado do que nas fêmeas com disfunção temporomandibular. No presente estudo, nós expandimos a investigação quanto às diferenças do gênero, a fim de se verificar se o padrão do sono poderia ser alterado de acordo com ciclo estral nas fêmeas com a OA. Isto nos permite investigar a relação entre o ciclo reprodutivo e a arquitetura de sono, como previamente relatados (Antunes et al., 2006; Andersen et al., 2008), sob uma condição dolorosa. Neste sentido, os nossos principais resultados demonstraram que as fêmeas com a OA diestro apresentaram mais alterações na eficiência de sono e nos despertares no período escuro do que as fêmeas coma OA estro.

Um cenário diferente foi observado nas mulheres. Unruh (1996) observou que, para uma variedade de dores recorrentes, as mulheres são mais susceptíveis à dor do que os homens, uma vez que elas relataram mais altos níveis de dor e maior frequência e duração de dor do que os homens. Berkley (1997) afirmou que, para a dor endógena, as mulheres relataram dores em mais regiões do corpo do que os homens. Embora as causas sejam desconhecidas, algumas doenças são mais dolorosas e prevalentes entre as mulheres e outras entre os homens, sendo que para muitas doenças os sintomas diferem entre

mulheres e homens. Estas diferenças são particularmente relevantes para as numerosas formas de dor, incluindo a fibromialgia, a disfunção temporomandibular, a dor miofascial (Gallagher et al., 2000) e a OA (Price e Herndon, 2009). Atenções empíricas a estas questões irão proporcionar avanço no conhecimento para uma melhor compreensão da relação do gênero, da dor e do sono na conduta de pacientes com a OA.

Em uma revisão da meta-análise com 16 publicações relacionadas à percepção dolorosa em torno do ciclo menstrual, Riley e colaboradores (1999) concluíram que o limiar da dor para o estímulo mecânico, o térmico e a dor muscular isquêmica, foram maiores durante a fase folicular do ciclo menstrual (baixa moderada dos níveis do estradiol e da progesterona) do que durante a fase do ciclo peri-menstrual (diminuição dos níveis do estradiol e da progesterona), tendo os efeitos sido modestos (Riley et al., 1999). Recentemente, Cairns e Gazerani (2009) descreveram a associação dos sintomas da dor, nas condições da dor musculoesquelética, com o ciclo reprodutivo das mulheres. Os autores sugeriram que o papel do estrogênio e/ou da progesterona estava relacionado ao gênero em relação às diferenças da dor. No entanto, uma explicação alternativa que também tem sido relatada é que a testosterona, o principal hormônio sexual masculino, protege os homens dessas condições de dor musculoesqueléticas (Gazerani e Cairns, 2009). Como as concentrações da testosterona foram reduzidas nos machos com a OA, eles apresentaram menor eficiência de sono. Estes resultados podem sugerir que a condição de dor observada nesses machos (Silva et al., 2008a e presentes dados) levaram à interrupção do sono, que, conseqüentemente, causou a diminuição dos níveis da testosterona observada nos machos com a OA. De fato, o nosso laboratório tem consistentemente observado diminuição das concentrações de testosterona em ratos machos privados de sono paradoxal (Andersen et al., 2003; 2004b; 2005; Andersen e Tufik, 2008). A falta de sono induz a tais profundas mudanças no padrão da secreção nos eixos endócrinos, no entanto, mais estudos são necessários a fim de proporcionar possíveis explicações sobre as alterações neuroendócrinas relacionadas à dor.

Nas fêmeas também tem sido relatado que a privação de SP induz a alterações hormonais (Andersen et al., 2004b, 2005, 2006b, 2007; Antunes et al., 2006, 2007), bem como o ciclo vigília-sono é influenciado pelos níveis dos hormônios endógenos (Kleinlogel de 1975, Andersen et al., 2008). Assim, sob uma condição dolorosa, espera-se que uma maior variabilidade ocorra entre as diferentes fases do ciclo estral. Curiosamente, e ao contrário de estudos com seres humanos, as fêmeas foram menos afetadas do que os machos, como pode ser visto pela maior eficiência de sono e do SOL no período escuro.

Assim, é importante conduzir estudos sobre o sono, utilizando diferentes modelos de dor e diferenças relacionadas ao gênero. Os presentes resultados indicaram que a dor associada ao modelo da OA causou alterações na arquitetura do sono para ambos os gêneros. Interessantemente, os machos foram mais afetados em alguns parâmetros do sono. Os processos envolvidos no mecanismo para essas diferenças relacionadas ao gênero ainda não estão totalmente elucidados, porém os hormônios sexuais têm sido apontados como importantes fatores envolvidos na fisiologia do sono (Van Cauter et al., 2007; Andersen et al., 2006c; Andersen e Tufik, 2006, 2008). As evidências sugerem que um perfil hormonal distinto pode contribuir para as diferenças relacionadas ao gênero e na ocorrência de certas condições de dor musculoesquelética e parâmetros do sono.

## *7 CONCLUSÕES*

---

O estudo dos efeitos da OA sobre o padrão de sono, sensibilidade dolorosa, influência do gênero e do perfil hormonal, demonstrou que:

1. A dor associada ao modelo de OA em ratos machos causou marcantes alterações na arquitetura do sono tanto durante o período claro como no período escuro, além de uma redução significativa no limiar de dor térmico a partir do décimo dia até ao final do experimento.
2. O gênero influencia o padrão de sono no modelo crônico de OA, porém, os machos parecem ser mais afetados. Além disso, a OA afetou os níveis hormonais nos machos, uma vez que as concentrações de testosterona foram reduzidas. Nas fêmeas com OA, as concentrações de progesterona e estradiol permaneceram inalterados durante o estudo.

Com base nesses resultados obtidos e nas condições experimentais do presente trabalho, conclui-se que a OA é um fator relevante para o ciclo vigília-sono promovendo marcantes alterações na arquitetura de sono desses animais. Além disso, o gênero também foi um fator importante nessas alterações no padrão de sono. Assim, tem-se buscado em modelos animais a compreensão das respostas fisiológicas e dos sistemas biológicos envolvidos na interação entre dor e distúrbios de sono.

## *8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---



- Abad VC, Sarinas PS, Guilleminault C. Sleep and rheumatologic disorders. *Sleep Med Rev* 2008; 12:211-28.
- Abernethy AP. Pain and sleep: establishing bi-directional association in a population-based sample. *Pain* 2008; 137:1-2.
- Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986; 29:1039-49.
- Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, et al. Criteria for classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1601-10.
- Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 1991; 34:505-14.
- Ameys LG, Young MF. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the Holy Grail. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18:537-47. Review.
- Andersen ML, Tufik S. Altered sleep and behavioral patterns of arthritic rats. *Sleep Res Online* 2000; 3:161-67.
- Andersen, M.L., Valle, A.C.d., Timo-laria, C., Tufik, S. Registro e identificação das fases do ciclo vigília-sono-análise dos eletroscilogramas. In: Implantação de elétrodos para o estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato. 2001. CLR Balieiro Ed. Ltda, São Paulo.
- Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Does paradoxical sleep deprivation and cocaine induce penile erection and ejaculation in old rats? *Addict Biol* 2002; 7:285-90.
- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Influence of paradoxical sleep deprivation and cocaine on development of spontaneous penile reflexes in rats of different ages. *Brain Res* 2003; 968:130-38.

- Andersen ML, Tufik S. Sleep patterns over 21-day period in rats with chronic constriction of sciatic nerve. *Brain Res* 2003; 984:84-92.
- Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S. Experimental Procedure. In: Univ Fed São Paulo-UNIFESP, ed. *Ethical and Practical Principles of the Use of Laboratory Animals*. São Paulo, Brazil, 2004a. pp. 45-69.
- Andersen ML, Bignotto M, Tufik S. Hormone treatment facilitates penile erection in castrated rats after sleep deprivation and cocaine. *J Neuroendocrinol* 2004b; 16:154-59.
- Andersen ML, Martins PJ, D'Almeida V, Bignotto M, Tufik S. Endocrinological and catecholaminergic alterations during sleep deprivation and recovery in male rats. *J Sleep Res* 2005; 14:83-90.
- Andersen ML, Tufik S. Does male sexual behavior require progesterone? *Brain Res Rev* 2006; 1:136-43. Review.
- Andersen ML, Nascimento DC, Machado RB, Roizenblatt S, Moldofsky H, Tufik S. Sleep disturbance induced by substance P in mice. *Behav Brain Res* 2006a; 167:212-18.
- Andersen ML, Antunes IB, Tufik S. Effects of paradoxical sleep deprivation on genital reflexes in five rat strains. *Horm Behav* 2006b; 49:173-80.
- Andersen ML, Bittencourt LR, Antunes IB, Tufik S. Effects of progesterone on sleep: a possible pharmacological treatment for sleep-breathing disorders? *Curr Med Chem* 2006c; 13:3575-82.
- Andersen ML, Antunes IB, Silva A, Alvarenga TA, Baracat EC, Tufik S. Effects of sleep loss on sleep architecture in Wistar rats: gender-specific rebound sleep. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008; 32:975-83.

- Andersen ML, Tufik S. The effects of testosterone on sleep and sleep-disordered breathing in men: its bidirectional interaction with erectile function. *Sleep Med Rev* 2008; 12:365-79.
- Andersen RE, Crespo CJ, Ling SM, Bathon JM, Bartlett SJ. Prevalence of significant knee pain among older Americans: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Am Geriatr Soc* 1999; 47:1435-38.
- Anderson JJ, Felson DT. Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol* 1988; 128:179-89.
- Antunes IB, Andersen ML, Alvarenga TA, Tufik S. Effects of paradoxical sleep deprivation on blood parameters associated with cardiovascular risk in intact and ovariectomized rats compared with male rats. *Behav Brain Res* 2007; 6:187-92.
- Antunes IB, Andersen ML, Baracat EC, Tufik S. Effects of paradoxical sleep deprivation on estrous cycles of the female rats. *Hormones Behavior* 2006; 49:433-40.
- Aserinsky E, Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 1953; 118:273-74.
- Bagge E, Bjelle A, Svanborg A. Radiographic osteoarthritis in the elderly: a cohort comparison and a longitudinal study of the 70-year-old people in Goteborg. *Clin Rheumatol* 1992; 11:486- 91.
- Bajaj P, Bajaj P, Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L. Osteoarthritis and its association with muscle hyperalgesia: an experimental controlled study. *Pain* 2001; 93:107-14.
- Berger RJ. The sleep and dream cycle. In: KALES A, ed: *Sleep Physiology and Pharmacology - A symposium*. Philadelphia, JB. Lippincott Company, 17-32, 1969.

- Bergmann MB, Kushida CA, Everson CA, Gilliland MA, Obermeyer W, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: II. Methodology. *Sleep* 1989; 12:5-12
- Berkley KJ. Sex differences in pain. *Behav Brain Sci* 1997; 20:371-80.
- Beyreuther B, Callizot N, Stohr T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:R14.
- Bolles RC, Fanselow MS. Endorphins and behavior. *Annu Ver Psychol* 1982; 33:87-101.
- Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11:821-30.
- Bove SE, Flatters SJ, Inglis JJ, Mantyh PW. New advances in musculoskeletal pain. *Brain Res Rev* 2009; 60:187-201.
- Branchey M, Branchey L, Nadler RD. Effects of estrogen and progesterone on sleep patterns of female rats. *Physiol Behav* 1971; 6:743-746.
- Brentegani LG, Brentegani MR, Lico MC. Dental pain and sleep. Experimental study on guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Braz Dent J* 1992; 2:129-33.
- Buckwalter JA, Lane LE. Athletics and osteoarthritis. *Am J Sports Med* 1997; 25:873-81.
- Burger H, van Daele PLA, Odding E, et al. Association of radiographically evident osteoarthritis with higher bone mineral density and increased bone loss with age. *Arthritis Rheum* 1996; 39:81-6.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo, NW. Plasma concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-Day Estrous Cycle of the rat. *Endocrinology* 1974; 94:1704.

- Cahue S, Dunlop D, Hayes K, et al. Varus-valgus alignment in the progression of patellofemoral osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2184-90.
- Cairns BE, Gazerani P. Sex-related differences in pain. *Maturitas* 2009, (in press).
- Camargo Filho, José Carlos Silva. Caracterização da cartilagem articular do joelho de ratos submetidos a esforços de repetição em esteira rolante. Tese de Doutorado. Campinas, SP, 2006.
- Carli G, Montesano A, Rapezzi S, Paluffi G. Differential effects of persistent nociceptive stimulation on sleep stages. *Behavioural Brain Research* 1987; 26:89-98.
- Carman WJ, Sowers M, Hawthorne VM, et al. Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am J Epidemiol* 1994; 139:119-29.
- Chaisson CE, Zhang Y, McAlindon TE, et al. Radiographic hand osteoarthritis: incidence, patterns, and influence of pre-existing disease in a population based sample. *J Rheumatol* 1997; 24:1509-13.
- Chambers MG, Suri N, Cover P, Buckingham J, Visco D, Mason RM. Aggrecan degradation and osteoarthritis in STR/ort mice occur independently of sex and sex hormone status. *Orthop Res Soc Trans* 1999; 24:447.
- Cicuttini F, Wluka A, Hankin J, et al. Longitudinal study of the relationship between knee angle and tibiofemoral cartilage volume in subjects with knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43:321-4.
- Clark AG, Jordan JM, Vilim VV, et al. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2356-64.
- Coggon D, Kellingray S, Inskip H, Croft P, Campbell L, Cooper C. Osteoarthritis of the hip and occupational lifting. *Am J Epidemiol* 1998; 147:523-8.

- Coggon D, Martyn C, Palmer KT, Evanoff B. Assessing case definitions in the absence of a diagnostic gold standard. *Int J Epidemiol* 2005; 34:949-52.
- Croft P, Cooper C, Coggon D. Case definition of hip osteoarthritis in epidemiologic studies. *J Rheumatol* 1994; 21:591-2.
- De Hooge AS, Van de Loo FA, Bennink MB, et al. Male IL-6 gene knockout mice developed more advanced osteoarthritis upon aging. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13:66-73.
- Dement W, Kleitman N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility, and dreaming. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1957; 9:673-90.
- Dieppe PA, Lim K. Osteoarthritis and related disorders; clinical features and diagnostic problems. In: Dequeker J, Dieppe PA, editors. *Rheumatology*, 2<sup>nd</sup> ed. London: Mosby; 2000; p: 831-6.
- Doherty M, Watt II, Dieppe P. Influence of primary generalised osteoarthritis on development of secondary osteoarthritis. *Lancet* 1983; 2:8-11.
- Drewes AM, Svendsen L, Taagholt SL, Bjerregard K, Nielsen KD, Hansen B. Sleep in rheumatoid arthritis: a comparison with healthy subjects and studies of sleep/wake interactions. *Br J Rheumatol* 1998, 37:71-81.
- Eddy NB, Leim Bach D. Synthetic analgesics III. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J Pharm Exp Ther* 1953; 107:385-93.
- Ellingson RJ. Development of sleep spindle bursts during the first year of life. *Sleep* 1982; 5:39-46.
- Felson DF, Zhang Y, Anthony JM, et al. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women The Framingham Study. *Ann Intern Med* 1992; 116:535-9.

- Felson DT, Hannan MT, Naimark A, et al. Occupational physical demands, knee bending, and knee osteoarthritis: results from the Framingham Study. *J Rheumatol* 1991; 18:1587-92.
- Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention *Arthritis Rheum* 1998; 41:1343-55.
- Fernihough J, Gentrya C, Malcangioa M, Foxa A, Rediske J, Pellasb T, Kiddc B, Bevana S, Wintera J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 2004; 112:83-93.
- Fillingim RB, King CD, Ribeiro-Dasilva MC, Rahim-Williams B, Riley JL. Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. Critical Review. *The Journal of Pain* 2009; 10:447-85.
- Foo H, Mason P. Brainstem modulation of pain during sleep and waking. *Sleep Med Rev* 2003; 7:145-54.
- Friedrichs ES, Broen D. Pain and Sleep. *Wiscosin Medical Journal* 1997; 96:8-9.
- Gallagher RM, Verma S, Mossey J. Chronic pain. Sources of late-life pain and risk factors for disability. *Geriatrics* 2000; 55:40-47.
- Gencosmanoglu BE, Eryavuz M, Dervisoglu S. Effects of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs on articular cartilage of rats in an experimental model of osteoarthritis. *Res Exp Med* 2001; 200:215-26.
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum* 2004; 50:2547-58.
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 2005; 434:644-48.
- Gottesmann C. L'estade intermédiaire du sommeil chez le rat. *Rev EEG Neurophysiol* 1973; 3:65-8.

- Greve JM, Plapler PG. Dor articular periférica, diagnóstico e tratamento. In: Andrade Filho, ACC. Dor - Diagnóstico e tratamento. São Paulo: Rocca, 2001.
- Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1670-9.
- Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K: Monoiodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol Pathol* 2003; 31:619-24.
- Haapala J, Arokoski JPA, Hyttinen MM, Lammi M, Markky T, Kovanen V, et al. Remobilization does not fully restore immobilization induced articular cartilage atrophy. *Clin Orthop* 1999; 1:218-29.
- Hadler NM, Gillings DB, Imbus HR, et al. Hand structure and function in an industrial setting *Arthritis Rheum* 1978; 21:210-20.
- Haim S, Shkhar G, Rossene GE, ANTaylor NA, Bem-eliyahu S. Serum levels of sex hormones and corticosterone throughout 4- and 5- day estrus cycles in fischer 344 rats and their stimulation in ovariectomized females. *J Endocrinol Invest* 2003; 26:1013-22.
- Hannan MT, Anderson JJ, Zhang Y, et al. Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1993; 36:1671-80.
- Hart DJ, Doyle DV, Spector TD. Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study. *Arthritis Rheum* 1999; 42:17-24.
- Hart DJ, Mootosamy I, Doyle DV, Spector TD. The relationship between osteoarthritis and osteoporosis in the general population: the Chingford Study. *Ann Rheum Dis* 1994; 53:158-62.



- Hashimoto S, Creighton-Achermann L, Takahashi K, Amiel D, Coutts RD, Lotz M. Development and regulation of osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:180-7.
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1632-38.
- Hashimoto S, Takahashi K, Ochs RL, Coutts RD, Amiel D, Lotz M. Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2123-31.
- Hawker GA, Stewart L, French MR, Cibere J, Jordan JM, March L. Understanding the pain experience in hip and knee osteoarthritis - an OARSI/OMERACT initiative. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16:415-22.
- Haythornthwaite JA, Hegel MT, Kerns RD. Development of a sleep diary for chronic pain patients. *J Pain Symptom Manage* 1991; 6:65-72.
- Heppelmann B, Pawlak M. Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed knee joints of the rat. *Pain* 1997; 73:377-82.
- Hicks RA, Coleman DD, Ferrante F, Sahatjian M, Hawkins J. Pain thresholds in rats during recovery from REM sleep deprivation. *Percept Mot Skills* 1979; 48:687-90.
- Hoegh-Andersen P, Tanko LB, Andersen TL, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* 2004; 6:169-80.
- Hulth A, Lindberg L, Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. Preliminary report. *Acta Orthop Scand* 1970; 41:522-30.
- Hunter DJ, Snieder H, March L, Sambrook PN. Genetic contribution to cartilage volume in women: a classical twin study. *Rheumatology* 2003; 42:1495-500.

- Janusz MJ, Bendele AM, Brown KK, Taiwo YO, Hsieh L, Heitmeyer SA. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: Inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:785-91.
- Janusz MJ, Hookfin EB, Heitmeyer SA, Woessner JF, Freemont AJ, Hoyland JA, Brown KK, Hsieh LC, Almstead NG, De B, Natchus MG, Pikul S, Taiwo YO. Moderation of iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats by matrix metalloproteinase inhibitors. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9:751–60.
- Jimenez SA.;Williams CJ.;Karasick D. Hereditary osteoarthritis. *Osteoarthritis*. Edited by Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS. Oxford University Press: Oxford, 1998; 31-49.
- Jordan JM, Luta G, Renner JB, Dragomir A, Hochberg MC, Fryer JG. Ethnic differences in self-reported functional status in the rural South: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Care Res* 1996; 9:483-91.
- Jouvet M. Recherches sur les stuctures nerveuses et les mecanismes responsables des differents phases du sommeil physiologique. *Archives Italiennes de Biologie* 1962; 100:125-206.
- Kalbhen DA. Chemical model of osteoarthritis—a pharmacological evaluation. *J Rheumatol* 1987; 14:130–31.
- Kallman DA, Wigley FM, Scott WW, et al. The longitudinal course of hand osteoarthritis in a male population. *Arthritis Rheum* 1990; 33:1323-31.
- Kellgren JH, Lawrence JS. Atlas of standard radiographs. Department of Rheumatology and Medical Illustrations, University of Manchester. Oxford: Blackwell 1963.
- Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Arokoski J, Säämänen AM, Helmine HJ. Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the young canine knee joint after remobilization of the immobilized limb. *J Orthop Res* 1994; 12:161-7.

- Kleinlogel H. The rat's in estrous. *Experientia* 1975; 31:712-13.
- Kontinen VK, Ahnaou A, Drinkenburg WH, Meert TF. Sleep and EEG patterns in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Physiol Behav* 2003; 78:241-6.
- Kosek E, Ordeberg G. Lack of pressure pain modulation by heterotopic noxious conditioning stimulation in patients with painful osteoarthritis before, but not following, surgical pain relief. *Pain* 2000; 88:69-78.
- Kuettner K, Thonar E. Cartilage integrity and homeostasis. In: Klippel JH, Dieppe P, eds. *Rheumatology*. 2d ed. St Louis: Mosby, 1998.
- Landis CA, Levine JD, Robinson CR. Decreased slow-wave and paradoxical sleep in a rat chronic pain model. *Sleep* 1989; 12:167-77.
- Landis CA, Robinson CR, Levine JD. Sleep fragmentation in the arthritic rat. *Pain* 1988; 34:93-9.
- Lane NE, Michel B, Bjorkengren A, et al. The risk of osteoarthritis with running and aging: a 5-year longitudinal study. *J Rheumatol* 1993; 20:461-68.
- Lane NE., L. Gore R, Cummings SR., Hochberg MC., Scott JC., Williams EN., Nevitt MC. Serum vitamin D levels and incident changes of radiographic hip osteoarthritis: A longitudinal study. *Arthritis Rheum* 1999; 42:854-60.
- Lautenbacher S, Kundermann B, Krieg JC. Sleep deprivation and pain perception. *Sleep Med Rev* 2006; 10:357-69.
- Lavigne GJ, Velly-Miguel AM, Montplaisir J. Muscle pain, dyskinesia, and sleep. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69:678-82.
- Lawrence JS. Rheumatism in cotton operatives. *Br J Ind Med* 1961; 18:270-6.
- Leigh TJ, Bird HA, Hindmarch I, Wright V. A comparison of sleep in rheumatic and non-rheumatic patients. *Clin Exp Rheumatol* 1987; 5:363-65.

- Leigh TJ, Hindmarch I, Bird HA, Wright V. Comparison of sleep in osteoarthritic patients and age and sex matched healthy controls. *Ann Rheum Dis* 1988; 47:40-2.
- LeRoux MA, Cheung HS, Bau JL, Wnag JY, Howell DS, Setton LA. Altered mechanics and histomorphometry of canine tibial cartilage following joint immobilization. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 19:633-40.
- Lindberg E, Janson C, Gislason T, Bjornsson E, Hetta J, Boman G. Sleep disturbances in a young adult population: can gender differences be explained by differences in psychological status? *Sleep* 1997; 20:381-87.
- Little CB, Mittaz L, Belluoccio D, et al. ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1461-72.
- Loge JH, Ekeberg O, Kaasa S. Fatigue in the general Norwegian population: normative data and associations. *J Psychosom Res* 1998; 45:53-65.
- Maetzel A, Makela M, Hawker G, et al. Osteoarthritis of the hip and knee and mechanical occupational exposure: a systematic overview of the evidence. *J Rheumatol* 1997; 24:1599-607.
- Marabini S, Matucci-Cerinic M, Geppetti P, Del Bianco E, Marchesoni A, Tosi S. Substance P and somatostatin levels in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and psoriatic arthritis synovial fluid. *Ann NY Acad Sci* 1991; 632:435-6.
- Marshall KW, Chiu B, Inman RD. Substance P and arthritis: analysis of plasma and synovial fluid levels. *Arthritis Rheum* 1990; 33:87-90
- Mason RM, Chambers MG, Flannelly J, Gaffen JD, Dudhia J, Bayliss MT. The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9:85-91. Review.
- McAlindon TE, Biggee BA. Nutritional factors and osteoarthritis: recent developments. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 647-52.

- McAlindon TE, Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Aliabadi P, Weissman B, Rush D, Wilson PW, Jacques P. Relation of dietary intake and serum levels of vitamin D to progression of osteoarthritis of the knee among participants in the Framingham Study. *Ann Intern Med* 1996; 125:353-9.
- McAlindon TE, Wilson PW, Aliabadi P, et al. Level of physical activity and the risk of radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham study. *Am J Med* 1999; 106:151-7.
- Menezes RA. Osteoatroses ou osteoartrites. In: Menezes RA. Síndromes dolorosas: diagnósticos – terapêutica – saúde física e mental. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.
- Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003; 1:76-9.
- Moldofsky H, Lue FA, Saskin P. Sleep and morning pain in primary osteoarthritis. *J Rheumatol* 1987; 14:124-28.
- Moldofsky H, Lue FA, Smythe HA. Alpha EEG sleep and morning symptoms in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1983; 10:373-79.
- Moldofsky H, Scarisbrick P, England R, Smythe H. Musculoskeletal symptoms and non-REM sleep disturbance in patients with “fibrositis syndrome” and healthy subjects. *Psychosom Med* 1975; 37:341-51.
- Moldofsky H, Scarisbrick P. Induction of neurasthenic musculoskeletal pain syndrome by selective sleep stage deprivation. *Psychosom Med* 1976; 38:35-44.
- Moldofsky H. The significance of the sleeping-waking brain for the understanding of widespread musculoskeletal pain and fatigue in fibromyalgia syndrome and allied syndromes. *Joint Bone Spine* 2008; 75:397-402. Review.

- Moldofsky H. Sleep and fibrositis syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1989; 15:91-103.
- Moldofsky H. Sleep and pain. *Sleep Med Rev* 2001; 5:385-96.
- Morin CM, Gibson D, Wade J. Self-reported sleep and mood disturbance in chronic pain patients. *Clin J Pain* 1998; 14:311-14.
- Morko JP, Soderstrom M, Saamanen AM, et al. Up regulation of cathepsin K expression in articular chondrocytes in a transgenic mouse model for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:649-655.
- Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Martens M, Baker J, Mayor M, Burstein AH, Frankel VH. Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. *Arthritis Rheum* 1973; 16:397-405.
- Moskowitz RW, Davis W, Sammarco J, Mast W, Chase SW. Experimentally induced corticosteroid arthropathy. *Arthritis Rheum* 1970; 13:236-43.
- Nascimento DC, Andersen ML, Hipólido DC, Nobrega JN, Tufik S. Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain mu-opioid receptors. *Behav Brain Res* 2007; 178:216-20.
- Natchus MG, Bookland RG, De B, Almstead NG, Pikul S, Janusz MJ, et al. Development of new hydroxamate matrix metalloproteinase inhibitors derived from functionalized 4-aminoprolines. *J Med Chem* 2000; 43:4948-63.
- Neogi T, Booth SL, Zhang YQ, Jacques PF, Terkeltaub R, Aliabadi P, Felson DT. Low vitamin K status is associated with osteoarthritis in the hand and knee. *Arthritis Rheum*. 2006; 54:1255-61.
- Nevitt MC, Cummings SR, Lane NE, et al. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. *Arch Intern Med* 1996; 156:2073-80.
- Nevitt MC, Lane NE, Scott JC, et al. Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density. *Arthritis Rheum* 1995; 38:907-16.

of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced

Ohayon MM. Relationship between chronic painful physical condition and insomnia.

J Psychiatr Res 2005; 39:151-59.

Ohta N, Kawai N, Kawaji W, Hirano H. Morphological changes in rabbits articular cartilage experimentally induced by joint contracture in association with aging.

Okajimas Folia Anat 1981; 58:205-20.

Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, et al. Incidence of symptomatic hand, hip and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization.

Arthritis Rheum 1995; 38:1134-41.

Onen SH, Alloui A, Eschaliere A, Dubray C. Vocalization thresholds related to noxious paw pressure are decreased by paradoxical sleep deprivation and increased after sleep recovery in rat.

Neurosci Lett 2000; 291:25-28.

O'Reilly S, Jones A, Muir KR, Doherty M. Quadriceps weakness in knee osteoarthritis: the effect on pain and disability. Ann Rheum Dis 1998; 57:588-94.

Ormel J, Rijdsdijk FV, Sullivan M, et al. Temporal and reciprocal relationship between IADL/ADL disability and depressive symptoms in late life. J Gerontol B Psychol Sci 2002; 57:338-47.

Paiva T, Farinha A, Martins A, Batista A, Guilleminault C. Chronic headaches and sleep disorders. Arch Intern Med 1997; 157:1701-05.

Palma BD, Gabriel A Jr, Colugnati FA, Tufik S. Effects of sleep deprivation on the development of autoimmune disease in an experimental model of systemic lupus

erythematosus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006; 291:1527-32.

Panush RS, Schmidt C, Caldwell JR, et al. Is running associated with degenerative joint disease? JAMA 1986; 255:1152-54.

- Pawlikowska T, Chalder T, Hirsch SR, Wallace P, Wright DJ, Wessely SC. Population based study of fatigue and psychological distress. *BMJ* 1994; 308:763-66.
- Plato CC, Norris AH. Osteoarthritis of the hand: longitudinal studies. *Am J Epidemiology* 1979; 110:740-6.
- Pomonis JD, Boulet JM, Gottshall SL, Phillips S, Sellers R, Bunton T. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. *Pain* 2005; 114:339-46.
- Price MD, Herndon JH. Gender differences in osteoarthritis. *Menopause* 2009; 16:666-70.
- Prinz PN. Sleep and sleep disorders in older adults. *J Clin Neurophysiol* 1995; 12:139-46.
- Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, Gilliland MA. Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. *Sleep* 1989; 12:68-87.
- Rechtschaffen A, Kales A. *A Manual of Standardized Terminology, Techniques and Scoring System for Sleep Stages of Human Subjects*, Brain Information Service/Brain Research Institute, University of California Los Angeles, Los Angeles, 1968.
- Regan E, Flannelly J, Bowler R, et al. Extracellular superoxide dismutase and oxidant damage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3479-3491.
- Rejeski WJ, Miller ME, Foy C, et al. Self-efficacy and the progression of functional limitations and self-reported disability in adults with knee pain. *J Gerontol* 2001; 56:26-35.
- Renner AF, Carvalho E, Soares E, Mattiello-Rosa S. The effect of a passive muscle stretching protocolo on the articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006; 14:196-202.



- Riley JLI, Robinson ME, Wise EA, Price DD. A meta-analytic review of pain perception across the menstrual cycle. *Pain* 1999; 81:225-35.
- Roehrs T, Roth T. Sleep and pain: interaction of two vital functions. *Semin Neurol* 2005; 25:106-16.
- Roizenblatt S, Moldofsky H, Benedito-Silva AA, Tufik S. Alpha sleep characteristics in fibromyalgia. *Arthritis Rheum* 2001; 44:222-30.
- Roizenblatt S., Andersen M.L., Bignotto M., Smith A.K., Tufik S. Impacto da prole artrítica em ratas lactantes: Alterações do sono, comportamento e limiar de dor, submetido.
- Rollman GB, Lautenbacher S. Sex Differences in Musculoskeletal Pain. *The Clinical Journal of Pain* 2001; 17:20-24.
- Ruiz FS, Andersen ML, Zager A, Martins RC, Tufik S. Sleep deprivation reduces the lymphocyte count in a non-obese mouse model of type 1 diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40:633-37.
- Saamanen AM, Tammi M, Jurvelin J, Kiviranta I, Helmine HJ. Proteoglycan alterations following immobilization and remobilization in articular cartilage of young canine knee (Stiffle) joint. *J Orthop Res* 1990; 8:863-73.
- Saxne T, Lindell M, Månsson B, Petersson IF, Heinegård D. Inflammation is a feature of the disease process in early knee joint osteoarthritis. *Rheumatology* 2003; 42:903-4.
- Schütz TC, Andersen ML, Silva A, Tufik S. Distinct gender-related sleep pattern in an acute model of TMJ pain. *J Dent Res* 2009; 88:471-76.
- Schütz TC, Andersen ML, Tufik S. Sleep alterations in an experimental orofacial pain model in rats. *Brain Res* 2003; 993:164-71.
- Schutz TC, Andersen ML, Tufik S. Effects of COX-2 inhibitor in temporomandibular joint acute inflammation. *J Dent Res* 2007; 86:475-79.

- Schutz TC, Andersen ML, Tufik S. Influence of temporomandibular joint pain on sleep patterns: role of nitric oxide. *J Dent Res* 2004; 83:693-97.
- Schwab W, Bilgicyildirim A, Funk RHW. Microtopography of the autonomic nerves in the rat knee: a fluorescence microscopic study. *Anat Rec* 1997; 247:109-18.
- Schwartz BA. EEG and ocular movements in night sleep. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1962; 14:126-8.
- Sharma L, Cahue S, Song J, et al. Physical functioning over 3 years in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:3359-70.
- Sharma L, Kapoor D, Issa S. Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18:147-56.
- Sharma L, Lou C, Felson DT, et al. Laxity in healthy and osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 1999; 42:861-70.
- Sharma L, Song J, Felson DT, et al. The role of knee alignment in disease progression and functional decline in knee osteoarthritis. *JAMA* 2001; 286:188-95.
- Silberberg M, Silberberg R. Age changes of bones and joints in various strains of mice. *Am J Anat* 1941; 68:69-96.
- Silberberg M, Silberberg R. Modifying action of estrogen on the evolution of osteoarthritis in mice of different ages. *Endocrinology* 1963; 72:449-51.
- Silberberg M, Silberberg R. Role of sex hormones in the pathogenesis of osteoarthritis in mice. *Lab Invest* 1963; 12:285-9.
- Silberberg R, Silberberg M. Degenerative joint disease in castrate mice. I Effects of ovariectomy at various ages. *Arch Pathol* 1958; 65:438-41.
- Silberberg R, Silberberg M. Degenerative joint disease in castrate mice. II Effects of orchiectomy at various ages. *Arch Pathol* 1958; 65:442-4.

- Silberberg R, Silberberg M. Degenerative joint disease in mice fed a high fat diet at various ages. *Exp Med Surg* 1952; 10:77-87.
- Silberberg R, Silberberg M. Growth and articular changes in slowly and rapidly developing mice fed a high fat diet. *Growth* 1950; 14:213-30.
- Silberberg R, Silberberg M. Male sex hormone and osteoarthritis in mice. *J Bone Joint Surg* 1961; 43:243-8.
- Silva A, Andersen ML, De Mello MT, Bittencourt LR, Peruzzo D, Tufik S. Gender and age differences in polysomnography findings and sleep complaints of patients referred to a sleep laboratory. *Braz J Med Biol Res* 2008b; 41:1067-75.
- Silva A, Andersen ML, Tufik S. Sleep pattern in an experimental model of osteoarthritis. *Pain* 2008a 140:446-55.
- Silva AB, Bertorini TE, Lemmi H. Polysomnography in idiopathic muscle pain syndrome (fibrositis). *Arq Neuropsiquiatr* 1991; 49:437-41.
- Silva Junior FS. Osteoartrite experimental em ratos: efeito do sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina sobre a incapacitação articular e a lesão da cartilagem. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.
- Sinha RK. EEG power spectrum and neural network based sleep-hypnogram analysis for a model of heat stress. *J Clin Monit Comput* 2008; 22:261-8.
- Slemenda C, Heilman DK, Brandt KD, et al. Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis Rheum* 1998; 41:1951-9.
- Smith MT, Haythornthwaite JA. How do sleep disturbance and chronic pain interrelate? Insights from the longitudinal and cognitive-behavioral clinical trials literature. *Sleep Med Rev* 2004; 8:119-32. Review.

- Smith AK, Togeiro SM, Tufik S, Roizenblatt S. Disturbed sleep and musculoskeletal pain in the bed partner of patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Med* 2009, (in press).
- Sokoloff L, Barile Mf. Obstructive genitourinary disease in male STR/IN mice. *Am J Pathol* 1962; 41:233-46.
- Sokoloff L. Natural history of degenerative joint disease in small laboratory animals. I. Pathologic anatomy of degenerative joint disease in mice. *Arch Pathol* 1956; 62:118-28.
- Sowers M, Zobel D, Weissfeld L, Hawthorne VM, Carman W. Progression of osteoarthritis of the hand and metacarpal bone loss: a twenty year following of incident cases. *Arthritis Rheum* 1991; 34:36-42.
- Spector TD, Hart DJ, Doyle DV. Incidence and progression of osteoarthritis in women with unilateral knee disease in the general population: the effect of obesity. *Ann Rheum Dis* 1994; 53:565-8.
- Srikanth VK, Fryer JL, Zhai G, Winzenberg TM, Hosmer D, Jones G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13:769-81.
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* 2005; 434:648–52.
- Steriade M. Basic mechanisms of sleep generations. *Neurology* 1992; 42:9-18.
- Stoop R, Buma P, van der Kraan PM, Hollander AP, Clark Billingham R, Robin Poole A, van den Berg WB. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2121-31.
- Stoop R, Kotani H, McNeish JD, Otterness IG, Mikecz K. Increased resistance to collagen-induced arthritis in CD44-deficient DBA/1 mice. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2922-31.

- Tepper S, Hochberg MC. Factors associated with hip osteoarthritis: data from the first National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES-I). *Am J Epidemiol* 1993; 137:1081-8.
- Timo-laria C, Kadekaro M. A simple device to align vertically electrodes for stereotaxic implantation. *Physiol Behav* 1970; 5:541-42.
- Timo-laria C, Negrão N, Schmidek WR, Rocha TL, Hoshino K. Phases and states of sleep in the rat. *Physiol Behav* 1970; 5:1057-62.
- Timo-laria C. O sono. *Ciência Hoje* 1985; 4:66-76.
- Turk DC, Cohen MJ. Sleep as a Marker in the Effective Management of Chronic Osteoarthritis Pain with Opioid Analgesics. *Semin Arthritis Rheum* 2009, (in press).
- Unruh AM. Gender variations in clinical pain experience. *Pain* 1996; 65:123-67.
- Van Cauter E, Holmback U, Knutson K, Leproult R, Miller A, Nedeltcheva A. Impact of sleep and sleep loss on neuroendocrine and metabolic function. *Horm Res* 2007; 67:2-9.
- Van den Berg WB. Lessons from animal models of arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4:232-39.
- Van den Berg WB. Lessons from animal models of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13:452-6.
- Van Der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:631-37. Review.
- Van Der Kraan PM, Vitters EL, Van de Putte LBA, Van den Berg WB. Development of osteoarthritic lesions in mice by 'Metabolic' and 'Mechanical' alterations in the knee joints. *Am J Pathol* 1989; 35:1001-14.

- Van Luitelaar ELJM, Coenen AML. An EEG averaging technique for automated sleep-wake stage identification in the rat. *Physiol Behav* 1983; 33:837-41.
- Vermeirsch H, Biermans R, Salmon PL, Meert TF. Evaluation of pain behavior and bone destruction in two arthritic models in guinea pig and rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 87:349-59.
- Werth E, Achermann P, Borbély AA. Fronto-occipital EEG power gradients in human sleep. *J Sleep Res* 1997; 6:102-12.
- Wessel J. The reliability and validity of pain threshold measurements in osteoarthritis of the knee. *Scand J Rheumatol* 1995; 24:238-42.
- Wilcox S, Brenes GA, Levine D, Sevick MA, Shumaker SA, Craven T. Factors related to sleep disturbance in older adults experiencing knee pain or knee pain with radiographic evidence of knee osteoarthritis. *J Am Geriatr Soc* 2000; 48:1241-51.
- Williams JM, Felten DL, Peterson RG, O'Connor BL. Effects of surgical induced instability on rat knee articular cartilage. *J Anat* 1982; 134:103-9.
- Wilson KG, Watson ST, Currie SR. Daily diary and ambulatory activity monitoring of sleep in patients with insomnia associated with chronic musculoskeletal pain. *Pain* 1998; 75:75-84.
- Wilson MG, Michet CJ Jr, Ilstrup DM, et al. Idiopathic symptomatic osteoarthritis of the hip and knee: a population-based incidence study. *Mayo Clin Proc* 1990; 65:1214-21.
- Wluka AE, Davis SR, Bailey M, et al. Users of oestrogen replacement therapy have more knee cartilage than non-users. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:332-6.
- Xu L, Strauch RJ, Ateshian GA, Pawluk RJ, Mow VC, Rosenwasser MP. Topography of the osteoarthritic carpometacarpal joint and its variations with gender, age, site, and osteoarthritic stage. *J Hand Surg* 1998; 23:454-64.


- Yasoshima A, Hayashi H, Iijima S, Sugita Y, Teshima Y, Shimizu T, Hishikawa Y. Potential distribution of vertex sharp wave and saw-toothed wave on the scalp. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1984; 58:73-6.
- Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:380-91.
- Zager A, Andersen ML, Ruiz FS, Antunes IB, Tufik S. Effects of acute and chronic sleep loss on immune modulation of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293:504-9.
- Zager A, Andersen ML, Lima MM, Reksidler AB, Machado RB, Tufik S. Modulation of sickness behavior by sleep: the role of neurochemical and neuroinflammatory pathways in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2009; 19:589-602.
- Zhai G, Ding C, Stankovich J, et al. The genetic contribution to longitudinal changes in knee structure and muscle strength: a sibpair study. *Arthritis Rheum* 2005; 52:2830-34.
- Zhang W, Doherty M. How important are genetic factors in osteoarthritis? Contributions from family studies. *J Rheumatol* 2005; 32:1139-42.
- Zhang Y, Hannan MT, Chaisson CE, et al. Bone mineral density and risk of incident and progressive radiographic knee osteoarthritis in women: the Framingham Study. *J Rheumatol* 2000; 27:1032-7.
- Zhang Y, McAlindon TE, Hannan MT, et al. Estrogen replacement therapy and worsening of radiographic knee osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1867-73.

## *9 ANEXO*

---



**Anexo 1: Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa**

	<p>Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina</p>	<p>Comitê de Ética em Pesquisa Hospital São Paulo</p>
<p>São Paulo, 29 de setembro de 2006. <b>CEP 1292/06</b></p>		
<p>Ilmo(a). Sr(a). Pesquisador(a) MONICA LEVY ANDERSEN Co-Investigadores: Andressa da Silva, Ronaldo Vagner Tomatielli, Marco Tulio de Mello, Sergio Tufik Disciplina/Departamento: Psicobiologia/Medicina e Biologia do Sono da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo Patrocinador: AFIP.</p>		
<p><b><u>PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL</u></b></p>		
<p>Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “<b>Influência da osteoartrite no padrão de sono em ratos</b>”.</p>		
<p>CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental - categoria C - crônico.</p>		
<p>RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.</p>		
<p>OBJETIVOS: O estudo pretende investigar as possíveis alterações no padrão de sono em ratos submetidos ao modelo de osteoartrite induzida por uma dose única de iodoacetato de sódio..</p>		
<p>RESUMO: Serão utilizados 100 ratos da linhagem Wistar, com 90 dias de idade provenientes do INFAR. Os animais serão mantidos em gaiolas coletivas e o estudo será conduzido em condições de ambiente controlado. Os animais serão distribuídos em 5 grupos: controle, sham, experimental 2, 3 e 4. (20 animais cada grupo). Os ratos dos grupos experimentais receberão uma dose única de injeção intra-articular de 0,5, 1,0 ou 2,0 mg de iodoacetato de sódio na articulação do joelho direito. Os animais serão acompanhados por 28 dias após a indução da AO nos seguintes períodos: primeiros 5 dias, décimo, décimo quinto, vigésimo, vigésimo quinto e vigésimo oitavo. Nesses períodos serão realizados o registro polissonográfico, avaliação da massa corporal e avaliação comportamental com placa quente. Após o vigésimo oitavo dia, os animais serão eutanasiados utilizando -se o método da decaptação. A anestesia será realizada através de halotano..</p>		
<p>FUNDAMENTOS E RACIONAL: Os resultados do presente estudo podem contribuir com o entendimento dos mecanismos pelos quais a osteoartrite predispõe as alterações no padrão de sono..</p>		
<p>MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos todos os procedimentos que serão desenvolvidos para a execução do projeto, sendo que trata-se de linha de pesquisa já estabelecida pela equipe participante.</p>		
<p>DETALHAMENTO FINANCEIRO: Patrocinado pela AFIP.</p>		
<p>CRONOGRAMA: 12 meses.</p>		
<p>OBJETIVO ACADÊMICO: NÃO ENVOLVE OBTENÇÃO DE TÍTULO.</p>		
<p>ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: <b>29/09/07 e 28/09/08.</b></p>		
<p>Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162</p>		
		1
		1292



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)