



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Avaliação dos efeitos do óleo de cânhamo em cães com osteoartrite

Micael Matos Morado

Coimbra, dezembro de 2021



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Avaliação dos efeitos do óleo de cânhamo em cães com osteoartrite

Coimbra, dezembro de 2021

Micael Matos Morado

Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri:

Professora Doutora Maria Eduarda Moreno da
Silveira

Arguente:

Professor Doutor Pedro Miguel Pires de
Carvalho

Orientador:

Professora Doutora Anabela Maduro de
Almeida Francisco

Orientador Interno

Professora Doutora Anabela Maduro de
Almeida Francisco

Coorientador Interno

Dr. Pedro Olivério Monteiro Sanches Pinto

Orientador Externo

Professora Doutora Ana Catarina Pais dos
Santos Figueira

(Hospital Veterinário Universitário de Coimbra)

Agradecimentos

Aos meus orientadores Professora Doutora Anabela Almeida, Dr. Pedro Pinto, pela confiança depositada em mim ao sugerirem este tema, pelo apoio prestado ao longo destes meses de preparação bem como implementação deste estudo, pela disponibilidade no auxílio de recolha, preparação, processamento, análise e interpretação das amostras e resultados, por todo o trabalho de revisão e orientação prestados nesta dissertação.

A todos os funcionários e docentes da Escola Universitária Vasco da Gama por todo o conhecimento transmitido bem como apoio, esclarecimento de dúvidas de carácter científico ou sociopedagógico, sempre com disponibilidade e boa disposição por parte de todos.

A toda a equipa do Hospital Veterinário Universitário de Coimbra pelo apoio nestes 6 meses árduos com constantes mudanças, obstáculos, onde apesar de todos os problemas estavam sempre presentes de modo a prestar tanto conhecimento como aconselhamento, ao ambiente de entreajuda por parte dos profissionais desta equipa que glorificam o trabalho realizado em Medicina Veterinária, ao conhecimento e à vontade de transmitir o mesmo para com qualquer elemento presente no funcionamento do Hospital, à amabilidade de todos e sobretudo na confiança e responsabilidade depositada por parte de todos os elementos.

Ao Dr. Pedro Pinto pela obtenção do produto utilizado no estudo bem como no auxílio da implementação do estudo e acompanhamento de cada caso de modo a que fosse possível a realização na sua plenitude, com o apoio também do Dr. João Monteiro.

Aos meus pais pelo apoio desde o primeiro dia desta jornada, às palavras de conforto, à confiança depositada, por fazerem de tudo de modo a chegar a este local independentemente dos altos e baixos de todos os eventos que levaram a esta conclusão.

À minha família por todas as vivências aconselhamento e apoio que sempre me incentivaram a chegar onde acreditava ser impossível.

A todos os colegas de curso pela amizade, entreajuda, companheirismo, vivências que sem vocês seria muito diferente.

À minha namorada e à sua família pelo apoio nos maus momentos, desabafos e todo o apoio inabalável.

A todos os amigos que me levaram a realizar este percurso.

Aos tutores que permitiram a realização deste estudo.

A todos vós um muito obrigado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS.....	viii
PÁGINA DE TÍTULO.....	1
RESUMO	2
PALAVRAS-CHAVE	2
ABSTRACT	3
KEY-WORDS	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS	5
2.1 ANIMAIS.....	5
2.2 DESENHO DO ESTUDO	5
2.3 ABORDAGEM TERAPÊUTICA.....	6
2.4 AMOSTRAS	7
2.5 ANÁLISE DE IL-6	7
3. RESULTADOS.....	7
3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	7
3.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA	8
3.3 PERFÍS ANALÍTICOS DOS ANIMAIS	8
3.3 NÍVEIS DE IL-6 DOS ANIMAIS	9
4. DISCUSSÃO	10
5. CONCLUSÃO	12
ANEXOS.....	14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Concentrações de IL-6 observada nos animais em estudo, no dia 0 e no dia 30. Comparação com média dos animais padrão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Planograma de procedimentos

Tabela 2 Caracterização dos animais submetidos ao estudo

Tabela 3 Inquéritos de claudicação e de dor

Tabela 4 Análises sanguíneas realizadas no dia 0 do estudo

Tabela 5 Resultados dos níveis séricos de IL-6 (ng/ml)

Tabela 6 Concentrações de IL-6 (ng/ml) nos animais em estudo

Tabela 7 Caracterização dos animais padrão

Tabela 8 Concentrações de IL-6 (ng/ml) nos animais padrão

LISTA DE ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

AINES – Anti-inflamatórios Não Esteróides

BID – Duas vezes ao dia

CBD – Canabidiol

CBPI – Questionário de avaliação de dor em cães (*Canine Brief Pain Inventory*)

CP – Comprimido

IL – Interleucina

LOAD – Questionário de mobilidade em cães (*Liverpool Osteoarthritis in Dogs*)

MG – Miligramas

NGF – Fator de crescimento de nervo (*Nerve Grow Factor*)

OA – Osteoartrite

SID – Uma vez por dia

TNF – Fator de necrose tumoral

PÁGINA DE TÍTULO

Avaliação dos efeitos do óleo de cânhamo em cães com osteoartrite

Micael Morado ^a, Pedro Pinto ^{a,b}, Ana Catarina Figueira ^{a,b}, Anabela Almeida ^{a,c}

^a Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG)/ Departamento de Medicina Veterinária. Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal. (micael_morado@hotmail.com; anabela.almeida@euvg.pt)

^b Hospital Veterinário Vasco da Gama (HVUC), Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal. (pedro.pinto@euvg.pt; ana.figueira@euvg.pt)

^c Coimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research (CIBIT), University of 10 Coimbra, Edifício do ICNAS, Polo 3 Azinhaga de Santa Comba 3000-548 Coimbra, Portugal. (anabela.almeida@euvg.pt)

RESUMO

O óleo de cânhamo é um derivado de plantas do género *Cannabis*. As formulações contendo óleo de cânhamo têm sido estudadas de modo a compreender as suas propriedades terapêuticas. O óleo de cânhamo enriquecido com canabidiol (CBD) têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias através da diminuição dos níveis de interleucinas. Atualmente, existem disponíveis no mercado vários nutracêuticos contendo óleo de cânhamo para animais de companhia, mas existem poucas evidências científicas sobre a dosagem oral, segurança e eficácia. Adicionalmente, são escassos os estudos que avaliam o efeito destes suplementos na osteoartrite, em cães.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de uma formulação de óleo de cânhamo em cães com osteoartrite. Para tal, foi realizado um estudo prospetivo para avaliação da resposta clínica/eficácia em animais para alívio da dor em cães com osteoartrite. Pretendeu-se ainda quantificar a Interleucina 6 (IL-6) sérica, como possível biomarcador, de forma a correlacionar os seus níveis séricos com a resposta clínica.

Foram incluídos no estudo 5 animais, de idades compreendidas entre os 5 e os 13 anos, de raça labrador retriever ou golden retriever. Os animais envolvidos no estudo apresentavam diagnóstico de osteoartrite, tanto em membros anteriores como nos membros posteriores, com sinais clínicos. Foram realizados questionários de mobilidade em cães (*Liverpool Osteoarthritis in Dogs*) e de avaliação de dor em cães (*Canine Brief Pain Inventory*). A IL-6 foi quantificada no soro dos animais através de um método imunoenzimático.

Os resultados obtidos demonstraram uma tendência a melhorar o conforto dos animais incluídos no estudo. Contudo, dadas as limitações, nomeadamente o número reduzido de animais que integraram o estudo, não foi possível retirar conclusões sobre a eficácia destes produtos nos animais com osteoartrite.

Neste estudo foi possível caracterizar o perfil do biomarcador IL-6 no soro dos animais, contudo não foram identificadas diferenças a sublinhar entre animais com e sem patologia, antes e após tratamento.

Parece evidente a necessidade de realizar mais estudos de modo a investigar os efeitos dos nutracêuticos à base de óleo de cânhamo na osteoartrite canina, bem como identificar possíveis biomarcadores que possam contribuir para o conhecimento desta doença.

PALAVRAS-CHAVE

Articulação, *Cannabis*, Inflamação, Interleucina 6, Óleo de cânhamo, Osteoartrite.

ABSTRACT

Hemp oil is derived from Cannabis genus plants. Hemp oil-containing formulations have been studied in order to understand their therapeutic properties. Cannabidiol (CBD) enriched hemp oil formulations have shown anti-inflammatory properties by decreasing interleukins levels. Several hemp oil-containing nutraceuticals for companion animals are currently available on the market, but there is little scientific evidence regarding oral dosage, safety, and efficacy. Additionally, there are few studies evaluating the effect of these supplements on osteoarthritis in dogs.

This study aimed to investigate the effect of the use of hemp oil formulation on dogs with osteoarthritis. To this end, a prospective study was carried out to evaluate the clinical response/efficacy in animals for pain relief in dogs with osteoarthritis. It was also intended to quantify serum Interleukin 6 (IL-6) as a possible biomarker, in order to correlate its serum levels with the clinical response.

Five animals were included in the study, aged between 5 and 13 years old, labrador retriever or golden retriever. The animals involved in the study had a diagnosis of osteoarthritis, both in the forelimbs and in the hind limbs, with clinical signs. Mobility (Liverpool Osteoarthritis in Dogs) and pain assessment (Canine Brief Pain Inventory) questionnaires were performed. IL-6 was quantified in the animals' serum using an immunoenzymatic method.

The results obtained showed a tendency to improve the comfort of the animals included in the study. However, given the limitations, namely the small number of animals involved in the study, it was not possible to draw conclusions about the effectiveness of these products in animals with osteoarthritis.

This study was able to characterize the profile of the IL-6 biomarker in the serum of the animals, however, no differences were identified to be highlighted between animals with and without pathology, before and after treatment.

Further studies to investigate the effects of hemp oil-based nutraceuticals in canine osteoarthritis are needed, as well as biomarkers that may contribute to the knowledge of this disease.

KEY-WORDS

Cannabidiol, *Cannabis*, Hemp Oil, Inflammation, Interleukin 6, Joint, Osteoarthritis.

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite consiste numa doença degenerativa das articulações, caracterizada pela existência de dor e claudicação associada a alterações patológicas das estruturas articulares. A instabilidade, a incongruência articular, o suporte de peso desigual e a lesão das estruturas podem ser fatores predisponentes da doença, levando a um stress anormal na cartilagem intra-articular que resulta em inflamação crónica (Anderson et al., 2018). Adicionalmente, as alterações congénitas estruturais e de síntese da articulação, bem como lesões traumáticas e outras condições inflamatórias podem levar também ao desenvolvimento de osteoartrite (Aragon et al., 2007).

Esta doença é multifatorial e apresenta uma forte componente genética, podendo ser exacerbada pelo estilo de vida de cada animal, incluindo a dieta e os níveis de atividade física (Anderson et al., 2018). A osteoartrite afeta cães de todas as raças (Anderson et al., 2018; Rychel, 2010). Embora esta patologia possa surgir em qualquer idade é considerada uma patologia associada ao envelhecimento (Pettitt & German, 2016). A osteoartrite torna-se mais significativa numa fase da vida mais tardia e por isso pode ser diagnosticada também mais tarde (Anderson et al., 2018). Contudo, são fatores de risco identificados nesta doença a idade superior a 8 anos, o sexo masculino, o estado reprodutivo alterado (castrados/esterilizados) e a condição corporal mais elevada (Anderson et al., 2018; Pettitt & German, 2016).

As alterações produzidas e consequentes lesões promovem o desenvolvimento de modificações a nível celular com os condrócitos a remodelar e a aumentar a produção de moléculas da matriz. Estes efeitos aumentam a destruição celular e também a produção de citocinas pró-inflamatórias, designadamente IL-1 e TNF- α (Lories & Luyten, 2011). Nas células da articulação as citocinas IL-1 e TNF- α amplificam e perpetuam o processo da doença da osteoartrite, induzindo a produção de outras citocinas como IL-6 e IL-8. Em condições normais ocorre a produção de IL-6 a níveis muito baixos pelos condrócitos, no entanto na presença de lesão todo este mecanismo leva ao seu aumento (Kapoor et al., 2011). Os efeitos no osso subcondral devido às alterações do metabolismo levam à diferenciação dos osteoclastos e resultam na reabsorção óssea, esclerose e posterior remodelação devido à presença de níveis elevados de IL-6 (Kapoor et al., 2011; Lories & Luyten, 2011). Com estas alterações ocorre hipertrofia das articulações, acompanhado pela calcificação da matriz extracelular levando a uma diminuição da membrana articular (Lories & Luyten, 2011). Estas alterações da matriz e das estruturas envolventes levam a atrito ósseo, e todas as alterações conjugadas levam à dor associada à patologia (Lories & Luyten, 2011).

O tratamento atualmente baseia-se na abordagem da dor e inflamação através da utilização de anti-inflamatórios e analgésicos, no entanto existem também outras opções como a terapia cirúrgica (Pettitt & German, 2016). Recentemente têm surgido novas abordagens complementares ao tratamento cujo objetivo é melhorar a qualidade de vida do animal, designadamente as terapias baseadas no uso de nutracêuticos. O objetivo destes nutracêuticos é coadjuvar ou mesmo surgir como tratamento definitivo. O óleo de cânhamo é um desses exemplos, sendo este um derivado de plantas do género *Cannabis*.

As formulações contendo óleo de cânhamo têm sido estudadas de modo a compreender as suas propriedades. Outros produtos como óleo de cânhamo enriquecido com canabidiol (CBD) têm demonstrado propriedade anti-inflamatória através da diminuição dos níveis de TNF e IL-10 (Hobbs et al., 2020; Verrico et al., 2020). Outros marcadores de lesão e inflamação também sofrem alterações nos seus níveis devido à introdução do tratamento com óleo de cânhamo enriquecido com CBD, além disso estes animais incorrem num aumento do seu conforto bem como nos seus níveis de atividade graças a este tratamento. (Gamble et al., 2018). A curto prazo a administração de óleos enriquecidos com CBD demonstrou uma melhoria na qualidade de vida dos animais (Verrico et al., 2020).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização do óleo de cânhamo em cães com osteoartrite. Para tal, foi realizado um estudo prospetivo para avaliação da resposta clínica/eficácia em animais para alívio da dor em cães com osteoartrite. Pretendeu-se ainda quantificar no soro a IL-6 como biomarcador, de forma a correlacionar os seus níveis séricos com a resposta clínica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Os animais incluídos neste estudo foram submetidos aos seguintes critérios de inclusão: os cães que se apresentaram com evidência radiográfica de OA, com sinais de dor de acordo com a perceção dos seus proprietários, ou com claudicação detetável na avaliação visual da marcha e articulação(s) dolorosa(s) na palpação.

Foram considerados como critério de exclusão a toma de outros medicamentos, designadamente analgésicos, como gabapentina e tramadol, que foram descontinuados pelo menos 2 semanas antes da toma da formulação em estudo. Foram também excluídos os cães que manifestaram evidências de doença renal, endócrina, neurológica ou neoplásica e os que se encontraram em fisioterapia.

Este estudo foi apresentado à Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Escola Universitária Vasco da Gama, tendo sido aprovada a sua realização (parecer da aprovação 001/2021).

2.2 DESENHO DO ESTUDO

O desenho do estudo está descrito na Tabela 1, tendo sido estes procedimentos aprovados pela Comissão de Ética. Os animais com diagnóstico definitivo de osteoartrite foram submetidos a duas consultas, uma no início do estudo para introdução da medicação e outra no término da mesma. O estudo foi realizado apenas após consentimento informado (Anexo 1). Foram realizados inquéritos (Anexo 2) ao tutor na primeira e na última consulta para caracterização da perceção de claudicação e da dor, tendo sido utilizada a escala de Liverpool de animais com osteoartrite (Walton et al., 2013) e a escala “Canine Brief Pain Inventory”. (Brown et al., 2013), respetivamente. A apresentação e preenchimento dos inquéritos foi realizado sempre na presença do médico veterinário, sendo que foi sempre o mesmo profissional a acompanhar o animal no período de estudo.

Os inquéritos realizados no término de tratamento ocorreram sem a apresentação dos inquéritos do início do estudo de modo a evitar enviesamento nas respostas. Os inquéritos apresentaram sempre a mesma formatação, e as respostas foram dadas sempre pelo mesmo tutor.

Tabela 1 Planograma de procedimentos

	Tratamento					
Semana	1	2	3	4		
	Dia 0	Dia 0-7	Dia 8-14	Dia 15-21	Dia 22-28	Dia 28
Procedimento 1 Avaliação clínica do animal – Exame Físico e Ortopédico	X	-	-	-	-	X
Procedimento 2 Colheita de sangue 5ml	X	-	-	-	-	X
Procedimento 3 Administração do produto (SID)	-	X	X	X	X	-

Procedimento 1 - Avaliação clínica do animal e exame Físico e Ortopédico, Procedimento 2 - Colheita de sangue 5ml

Em virtude das limitações associadas à dificuldade de compreensão do uso de um placebo por parte dos tutores, foi necessário implementar um plano de contingência no decorrer do estudo. Para tal, procedeu-se à colheita de amostras de sangue de animais sem diagnóstico de osteoartrite, que se apresentaram à consulta no hospital noutros âmbitos. Estes animais não apresentavam qualquer doença documentada pelos registos médicos, não se prevendo qualquer patologia do foro inflamatório, tendo sido seleccionados apenas animais que se apresentaram à consulta por motivos de profilaxia ou procedimentos eletivos. Estas amostras foram colhidas previamente a qualquer tratamento profilático ou intervenção, com um propósito alheio a este estudo, sendo que nenhuma das amostras foi colhida propositadamente para este efeito. Estes animais apresentavam idades compreendidas entre os 6 meses e os 8 anos, diferentes raças e porte, bem como indivíduos de ambos os sexos. O estudo deste grupo de animais surgiu então como um método alternativo de modo a avaliar e compreender diferenças de níveis inflamatórios.

As análises hematológicas e bioquímicas foram todas realizadas no dia da primeira consulta, aquando da introdução da medicação. Foram analisados os parâmetros hematológicos, o hematócrito, a contagem de células brancas e contagem de plaquetas. No âmbito das análises bioquímicas séricas foram realizadas as seguintes provas/marcadores: creatinina, ureia, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, glucose, proteínas totais e albumina.

2.3 ABORDAGEM TERAPÊUTICA

O nutracêutico utilizado no estudo é um produto à base de óleo de cânhamo já em comercialização (Evexia® do laboratório KimiPharma). O produto continha a seguinte composição qualitativa: levedura de cerveja; óleo de cânhamo 3,0%; estearato de magnésio; mono e diglicerídeos de ácidos gordos destilados com ácidos orgânicos; produtos obtidos do processamento de vegetais (melão); farinha de cânhamo.

Estes produtos seguem uma legislação específica introduzida recentemente nos últimos 3 anos, inicialmente esta surgiu apenas associada à medicina humana pela Lei n.º 33/2018 e Decreto-Lei n.º 8/2019, no entanto foi também introduzida legislação para medicina veterinária pelo Despacho n.º 10953/2020 e Decreto Regulamentar n.º 2/2020.

2.4 AMOSTRAS

As amostras de sangue foram obtidas todas através da recolha de cerca de cinco mililitros de sangue por venopunção da jugular. Esse sangue foi transferido para um tubo seco de modo a obter pelo menos um mililitro de soro e para um tubo de EDTA de um mililitro sangue total. Estas foram posteriormente armazenadas em temperaturas de congelação para análise dos níveis de IL-6 e refrigeração para restantes análises.

2.5 ANÁLISE DE IL-6

Para a avaliação do perfil inflamatório foi escolhida a realização da análise dos níveis sanguíneos da IL-6. Foi utilizado o método imunoenzimático para analisar os níveis de IL-6 através do kit RayBio® Canine IL-6 ELISA Kit (Laboratório RayBiotech). As amostras utilizadas na análise foram todas de soro. Todas as amostras foram analisadas em duplicado seguindo todos os procedimentos indicados pelo fabricante.

As concentrações foram obtidas através da curva de calibração $y=0,6058 \ln(x) + 0,9562$. O limite de detenção do teste é de 0.1 ng/ml.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

A caracterização dos animais incluídos no estudo encontra-se resumida na Tabela 2. Os animais apresentavam idades compreendidas entre 5 e 13 anos. Todos os animais apresentavam ser de porte médio/grande, 4 deles de raça Labrador Retriever e um Golden Retriever. Dos cinco animais apenas um é de sexo masculino. Os animais tinham estilos de vida e de atividade diferentes, sendo alguns animais de interior, interior com acesso ao exterior e outros de exterior. Estes animais estavam também sujeitos a outros produtos constituídos por glicosaminoglicanos, condroitina e outras substâncias condroprotetoras (Animal 2 e 5). Os animais apresentavam lesão tanto nos membros anteriores como posteriores, sendo que todos eles apresentavam já algum grau de claudicação.

Tabela 2 Caracterização dos animais submetidos ao estudo

Identificação	Raça	Idade (Anos)	Sexo	Peso (KG)	Condição Corporal	Terapias Implementadas
Animal 1	Labrador Retriever	5	F	27,2	5 em 10	-
Animal 2	Labrador Retriever	5	F	28,2	5 em 10	Wejoint Plus® Raças Grandes 1 Cp SID
Animal 3	Labrador Retriever	5	F	37,7	7 em 10	Omnicondro® ½ Cp SID
Animal 4	Labrador Retriever	13	M	41	7 em 10	-
Animal 5	Golden Retriever	12	F	35	6 em 10	Wejoint Plus® Raças Grandes 1 Cp SID

Wejoint Plus® e Omnicondro® são produtos constituídos por glicosaminoglicanos, condroitina e outras substâncias condroprotetoras; F=Fêmea, M=Macho

3.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

Os inquéritos realizados aos tutores tinham como objetivo caracterizar os níveis de dor e de claudicação de cada animal no seu dia a dia. Estes inquéritos foram sempre preenchidos na presença de um médico veterinário, e em caso de necessidade foram estes que auxiliaram no preenchimento dos inquéritos.

Tabela 3 Inquéritos de claudicação e de dor

Identificação	Dia 0		Dia 30		Diferença	
	LOAD	CBPI	LOAD	CBPI	LOAD	CBPI
1	22	72	22	55	0	-22
2	19	22	19	22	0	0
3	27	67	25	37	-2	-30
4	32	20	31	37	-1	17
5	26	69	16	69	-10	0

LOAD – Questionário de mobilidade em cães (Liverpool Osteoarthritis in Dogs) escala de 0 a 52, CBPI – Questionário de avaliação de dor em cães (Canine Brief Pain Inventory) escala de 0 a 104

3.3 PERFÍS ANALÍTICOS DOS ANIMAIS

De forma a caracterizar os animais que integraram o estudo quanto ao seu perfil hematológico e bioquímico, foram realizadas análises sanguíneas presentes na Tabela 4.

Tabela 4 Análises sanguíneas realizadas no dia 0 do estudo

Parâmetros	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Valores de Referência	Unidades
GPT/ALT	NR	47	NR	167	47	17 – 78	U/L
ALP	NR	45	NR	625	53	13 – 83	U/L
CRE	NR	0,92	NR	0,5	0,52	0,40 – 1,40	mg/dL
BUN	NR	14,7	NR	NR	9,9	9,2 – 29,2	mg/dL
TP	NR	6,5	NR	6,9	6,5	5,0 – 7,2	g/dL
ALB	NR	3,7	NR	NR	NR	2,8 – 4,0	g/dL
GLU	NR	110	NR	105	100	75 – 128	mg/dL
HTC	NR	NR	NR	53,7	42	33,0 – 56,0	%
WBC	NR	NR	NR	9,16	7,72	6,00 – 17,00	10 ³ /μL
PLT	NR	NR	NR	128	269	117 – 490	10 ³ /μL

NR não realizado, ALT alanina aminotransferase, ALP Fosfatase Alcalina, CREA creatinina, BUN Ureia, TP Proteínas totais, ALB Albumina, GLU Glucose, HTC hematócrito, WBC contagem de células brancas, PLT contagem de plaquetas; U/L unidades por litro, mg/dL miligramas por decilitro, g/dL gramas por decilitro, % percentagem, 10³/uL mil células por microlitro

3.3 NÍVEIS DE IL-6 DOS ANIMAIS

Os resultados relativos aos níveis séricos de IL-6 encontram-se na Figura 2. Nesta figura é possível observar os valores obtidos em cada dia de estudo para os cinco animais com osteoartrite. Os valores de IL-6 encontram-se compreendidos entre 0,31 e 0,439. Estes resultados foram ainda comparados com os valores de IL-6 obtidos nas amostras dos animais sem OA.

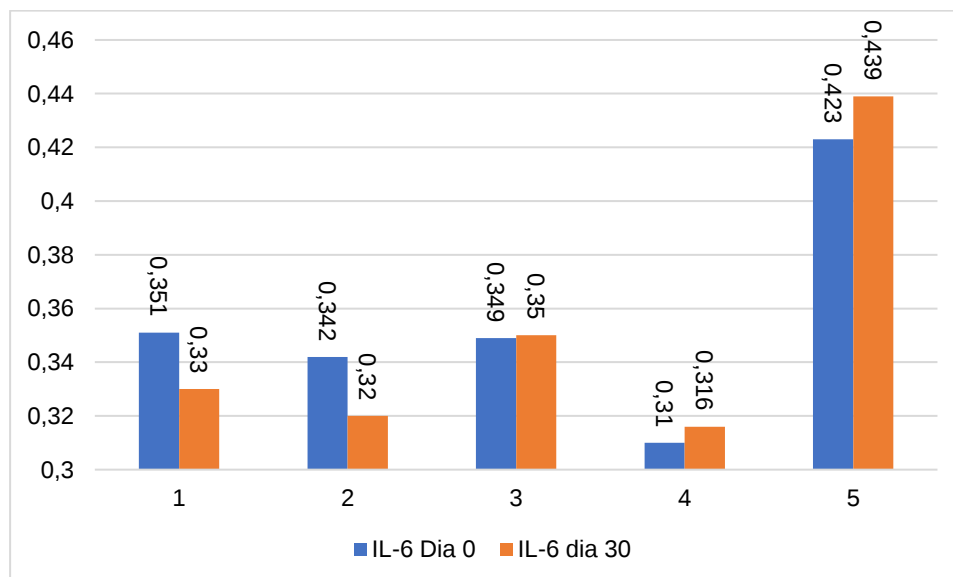


Figura 1 Comparação dos níveis de IL-6 observados nos animais em estudo, no dia 0 e no dia 30.

Tabela 5 Resultados níveis de IL-6 (ng/ml)

Animais	Média ± Desvio Padrão	N
Com osteoartrite Dia 0	0,355±0,034	5
Com osteoartrite Dia 30	0,351±0,042	5
Sem osteoartrite	0,337±0,019	9

4. DISCUSSÃO

O tratamento atualmente baseia-se na abordagem da dor e inflamação através da utilização de anti-inflamatórios, no entanto existem também outras opções farmacológicas e cirúrgicas (Pettitt & German, 2016). Recentemente têm surgido novas abordagens complementares ao tratamento cujo objetivo é melhorar a qualidade de vida do animal, designadamente as terapias baseadas no uso de nutracêuticos. O objetivo destes nutracêuticos é coadjuvar ou mesmo surgir como tratamento definitivo. O óleo de cânhamo é um derivado de plantas do género *Cannabis*. A aplicação da *Cannabis* tem sido referida nos últimos anos onde têm surgidos diversos estudos de modo a compreender as suas propriedades medicinais.

No decorrer deste trabalho uma das maiores dificuldades foi obter a adesão dos tutores ao estudo, nos termos em que este foi desenhado. Apesar da explicação detalhada realizada no âmbito dos consentimentos informados, alguns tutores acabaram por não permitir a participação do animal, fazendo com que o número de animais inicialmente proposto se reduzisse aos cinco animais cujos resultados foram aqui discutidos. Outra limitação relevante do estudo foi o custo associado ao tratamento com o produto à base de óleo de cânhamo, uma vez que apenas parte do tratamento foi gentilmente cedido pelo fabricante. Similarmente, o uso do placebo, tal como inicialmente desenhado, foi recusado pelos tutores. Por esse motivo foi necessário aplicar um plano de contingência face ao não cumprimento do desenho inicial, relativamente ao uso de um placebo, que acabou por não ser possível neste trabalho.

A apresentação dos inquéritos em diferentes formatações pode demonstrar resultados muito divergentes entre si, além disso pode também ocorrer diferentes resultados quando são apresentados aos tutores os resultados anteriores, sendo que estes tendem a ser mais enviesados devido a estes usarem os anteriores como comparativo, no entanto o mesmo não se constatou.

O inquérito LOAD avalia os níveis de claudicação enquanto CBPI os níveis de dor associados aos animais com diagnóstico de osteoartrite (Tabela 3). Quando avaliada a diferença entre o dia 0 e o dia 30, um resultado negativo indica uma melhoria, enquanto um valor positivo ou igual a zero indicia uma deterioração da condição clínica ou manutenção do estado clínico, respetivamente. De acordo com os resultados dos inquéritos foi possível verificar uma condição clínica mais favorável na avaliação do dia 30, após tratamento, em três dos animais; num dos animais parece ocorrer manutenção dos seus níveis de claudicação e de dor, sendo que apenas um dos animais parece apresentar uma condição mais

desfavorável depois da introdução do produto. A Tabela 4 mostra as análises sanguíneas realizadas pelos animais em estudo. Uma vez que o produto se encontra comercializado, não se realizou uma análise detalhada do seu perfil de segurança. Contudo foi realizado o perfil hematológico e bioquímico aos animais 2, 4 e 5.

Todos estes inquéritos vão ao encontro da informação fornecida pelos tutores na avaliação aos trinta dias, à exceção do animal 5 onde o tutor referiu que o mesmo parecia apresentar relutância a alguns movimentos comprovada pela avaliação médica. Destes animais apenas um optou pela manutenção da medicação posterior à participação no estudo.

A IL-6 é uma citocina pro inflamatória à qual é atribuída ação no desenvolvimento patológico da osteoartrite, aumentando o número de células inflamatórias no tecido sinovial, estimulando a proliferação de condrócitos e também amplificando os efeitos de IL-1 na síntese de metaloproteases (Alaaeddine et al., 1999). Várias interleucinas são altamente expressas em pacientes com osteoartrite, como IL-1, IL-6, IL-7 e TNF- α , sendo estas proinflamatórias, enquanto IL-4, IL-8 e IL-10 são anti-inflamatórias, produzidas pelos condrócitos osteoblastos e membranas sinoviais (Kumavat et al., 2021). Num estudo realizado por Musco et al 2019 a citocina IL-6 foi a que demonstrou melhores resultados razão pela qual foi selecionada para avaliação destes animais.

Os resultados da Figura 1, relativa aos níveis de IL-6, obtidos nos animais com osteoartrite demonstram alguma correlação com os resultados dos inquéritos da Tabela 3 relativos aos scores de claudicação e dor obtidos para cada animal. Os valores mais elevados obtidos nos inquéritos estão associados a animais em que também manifestaram valores mais altos de IL-6 sérica e vice-versa. Os animais 2 e 4 que apresentam os valores de IL-6 mais baixos e também os scores mais baixos. De salientar que o animal 5 que apresenta os valores mais elevados de IL-6 é também o que apresenta os scores mais elevados de CBPI. Estes resultados corroboram também a avaliação clínica realizada pelo médico veterinário.

Neste estudo, no âmbito analítico, foi possível caracterizar o perfil do biomarcador IL-6 em animais com osteoartrite e em animais sem registo de patologia inflamatória. Contudo, e não obstante o número baixo, parece não haver diferenças a assinalar entre valores de animais com osteoartrite e sem patologia evidente. Nestes animais os valores variam entre 0,310 e 0,439 enquanto os animais sem registo de patologia inflamatória variam entre 0,304 e 0,358 (Tabela 6 e Tabela 8 respetivamente, presentes nos anexos). Estes resultados poderão estar relacionados também com a composição do produto utilizado. Estes produtos à base de óleo de cânhamo não possuem compostos fitoativos (canabidiol) em níveis suficientes para exercerem a ação que lhes é atribuída.

Apesar de não ser possível retirar conclusões em virtude do número limitado de amostras, a verdade é que, de forma geral verificou-se um aumento do conforto dos animais, pela diminuição dos resultados observados nos inquéritos, tal como verificado por outros estudos pela aplicação de nutracêuticos (Gamble et al., 2018; Musco et al., 2019; Philpott et al., 2017; Verrico et al., 2020).

5. CONCLUSÃO

Este estudo utilizou um produto já disponível no mercado de modo a compreender as suas propriedades anti-inflamatórias no âmbito da osteoartrite. Surgiu em virtude da escassez de estudos sobre a efetividade destes produtos.

Contudo dadas limitações do estudo, nomeadamente o número reduzido de animais que integraram o estudo, não foi possível retirar conclusões sobre a eficácia destes produtos nos animais com osteoartrite.

Neste estudo, no âmbito analítico, foi possível caracterizar o perfil do biomarcador IL-6 no soro dos animais, contudo não foram identificadas diferenças a sublinhar entre animais com e sem patologia antes e após tratamento.

Parece evidente a necessidade de realizar mais estudos de modo a investigar os efeitos dos nutracêuticos à base de óleo de cânhamo, bem como identificar possíveis biomarcadores que possam contribuir para o conhecimento da doença.

REFERÊNCIAS

- Alaaeddine, N., Battista, J. A. Di, Pelletier, J., Kiansa, K., Cloutier, J., & Martel-pelletier, J. (1999). Differential Effects of Il-8 , Lif (Pro-Inflammatory) and Il-11 Pge 2 Release and on Signalling Pathways in Human Oa Synovial. *Cytokine*, 11(12), 1020–1030.
- Alves, J. C., Santos, A., Jorge, P., Lavrador, C., & Carreira, L. M. (2020). Clinical and diagnostic imaging findings in police working dogs referred for hip osteoarthritis. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02647-2>
- Anderson, K. L., O'Neill, D. G., Brodbelt, D. C., Church, D. B., Meeson, R. L., Sargan, D., Summers, J. F., Zulch, H., & Collins, L. M. (2018). Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23940-z>
- Aragon, C. L., Hofmeister, E. H., & Budsberg, S. C. (2007). Systematic review of clinical trials of treatments for osteoarthritis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(4), 514–521. <https://doi.org/10.2460/javma.230.4.514>
- Brown, D. C., Bell, M., & Rhodes, L. (2013). Power of treatment success definitions when the Canine Brief Pain Inventory is used to evaluate carprofen treatment for the control of pain and inflammation in dogs with osteoarthritis. *American Journal of Veterinary Research*, 74(12), 1467–1473. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.12.1467>
- Gamble, L.-J., Boesch, J. M., Frye, C. W., Schwark, W. S., Mann, S., Wolfe, L., Brown, H., Berthelsen, E. S., & Wakshlag, J. J. (2018). Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00165>
- Hobbs, J. M., Vazquez, A. R., Remijan, N. D., Trotter, R. E., McMillan, T. V., Freedman, K. E., Wei, Y., Woelfel, K. A., Arnold, O. R., Wolfe, L. M., Johnson, S. A., & Weir, T. L. (2020). Evaluation of pharmacokinetics and acute anti-inflammatory potential of two oral cannabidiol preparations in healthy adults. *Phytotherapy Research*, 34(7), 1696–1703. <https://doi.org/10.1002/ptr.6651>
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P., & Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(1), 33–42. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>
- Katsikis, B. P. D., Chu, C., Brennan, F. M., Maini, R. N., & Feldmann, M. (1994). *I* ~. 179(May).
- Kumavat, R., Kumar, V., Malhotra, R., Pandit, H., Jones, E., Ponchel, F., & Biswas, S. (2021). Biomarkers of Joint Damage in Osteoarthritis: Current Status and Future Directions. *Mediators of Inflammation*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5574582>

- Lories, R. J., & Luyten, F. P. (2011). The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(1), 43–49. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.197>
- Musco, N., Vassalotti, G., Mastellone, V., Cortese, L., della Rocca, G., Molinari, M. L., Calabrò, S., Tudisco, R., Cutrignelli, M. I., & Lombardi, P. (2019). Effects of a nutritional supplement in dogs affected by osteoarthritis. *Veterinary Medicine and Science*, 5(3), 325–335. <https://doi.org/10.1002/vms3.182>
- Pettitt, R. A., & German, A. J. (2016). Investigation and management of canine osteoarthritis. *In Practice*, 38(November), 1–8. <https://doi.org/10.1136/inp.h5763>
- Philpott, H. T., O'Brien, M., & McDougall, J. J. (2017). Attenuation of early phase inflammation by cannabidiol prevents pain and nerve damage in rat osteoarthritis. In *Pain* (Vol. 158, Issue 12). <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001052>
- Rychel, J. K. (2010). Diagnosis and Treatment of Osteoarthritis. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(1), 20–25. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2009.10.005>
- Venable, R. O., Stoker, A. M., Cook, C. R., Cockrell, M. K., & Cook, J. L. (2008). Examination of synovial fluid hyaluronan quantity and quality in stifle joints of dogs with osteoarthritis. *American Journal of Veterinary Research*, 69(12), 1569–1573. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.12.1569>
- Verrico, C. D., Wesson, S., Konduri, V., Hofferek, C. J., Vazquez-perez, J., Blair, E., Jr, K. D., Salimpour, P., Decker, W. K., & Halpert, M. M. (2020). Study of Daily Cannabidiol for the Treatment of Canine Osteoarthritis Pain. *Pain*, 00(00).
- Walton, M. B., Cowderoy, E., Lascelles, D., & Innes, J. F. (2013). Evaluation of Construct and Criterion Validity for the “Liverpool Osteoarthritis in Dogs” (LOAD) Clinical Metrology Instrument and Comparison to Two Other Instruments. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058125>

ANEXOS

ANEXO 1 CONSENTIMENTO INFORMADO

Sr.(a) Proprietário(a),

No âmbito do Ciclo de Estudos Integrado Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária, na Escola Universitária Vasco da Gama, em parceria com o Hospital Veterinário Universitário de Coimbra será realizado um estudo de investigação, cujo objetivo principal é avaliar os efeitos anti-inflamatórios do canabidiol em canídeos que apresentem patologia articular.

Neste sentido solicitamos a sua colaboração através da autorização para que seja feito um questionário acerca do seu animal bem como a implementação de uma nova terapia e análises sanguíneas, sem que lhe sejam imputados quaisquer custos.

A análise de sangue é um procedimento que exige a recolha de sangue, no qual é retirado 5 ml de sangue para análise de múltiplos parâmetros de modo a avaliar a resposta à nova terapia. Este procedimento não representa qualquer risco para o seu animal.

Mais solicitamos a sua colaboração no preenchimento do questionário apenso, cujos dados recolhidos se destinam exclusivamente aos fins académicos explicitados, sendo que a confidencialidade dos mesmos é assegurada.

Finalmente sublinhamos que poderá, em qualquer momento, retirar o seu animal do estudo. Antecipadamente gratos pela sua colaboração subscrevemo-nos com os melhores cumprimentos,

O Investigador:

Micael Morado,

(Estudante de Medicina Veterinária, EUVG)

Processamento:	Código interno:		
Descrição do procedimento:			
Responsáveis do Estudo:	Dr Pedro Pinto (Médico Veterinário, HVUC) Micael Morado (Estudante de Medicina Veterinária, EUVG)		
Nome do CAMV	Hospital Veterinário Universitário de Coimbra	Nome do MV responsável pelo preenchimento:	
Nome do Animal			
Nome do Tutor do animal			

Por favor, leia com atenção todo o conteúdo deste documento. Não hesite em solicitar mais informações ao Médico Veterinário assistente se não estiver completamente esclarecido. Verifique se todas as informações estão corretas. Se entender que tudo está em conformidade e se estiver de acordo com a proposta que lhe é feita, então assine este documento.

1. Por este meio eu asseguro que sou o Tutor (ou respetivo representante autorizado) do animal supra identificado.
2. Declaro ter compreendido os objetivos de que me foi proposto e explicado pelo Médico Veterinário que assina este documento, tendo-me sido dada oportunidade de fazer todas as perguntas sobre o assunto e para todas elas ter obtido resposta esclarecedora.
3. Informe o Médico Veterinário Assistente sobre todos os medicamentos e/ou medidas profiláticas que foram administrados/implementados sob o meu conhecimento, assim como dos procedimentos médico-cirúrgicos realizados até ao momento, no meu animal.
4. Autorizo voluntariamente que o meu Animal seja envolvido no Estudo.
5. Comprometo-me em comunicar ao meu Médico Veterinário Assistente qualquer sinal de doença ou alteração de comportamento demonstrado pelo meu animal, assim como qualquer ocorrência estranha.
6. Concordo que os dados pessoais que constam nos formulários que assinei possam ser processados e utilizados para propósitos de Estudos relevantes, sem que, em momento algum, tais dados sejam tratados de forma individual. Serão sempre representativos de um grupo, enquanto amostra.

Indique o primeiro e último nome:.....

Indique o seu e-mail (opcional):..... @

Indique o seu número de telemóvel (opcional):

Data:

Assinatura conforme C.C/ B.I:

Anexo 2 Inquéritos de claudicação e dor

Inquérito sobre avaliação de dor adaptado de Canine Brief Pain Inventory (CBPI) e Liverpool Osteoarthritis in Dogs (LOAD)

LOAD

Dados tutor – Nome: _____ Data: __/__/____

Dados animal – Nome: _____ Idade: _____ Raça: _____

Sexo: M_ F_

Membro de referencia: MAD ____ MAE ____ MPD ____ MPE ____

Anamnese

Há quanto tempo seu animal de estimação sofre com problemas de mobilidade?

Menos de 6 meses ____ 6 a 12 meses ____ 12 a 24 meses ____ 24 a 36 meses ____ Mais de 36 meses ____

O seu cão foi diagnosticado com algum outro problema além da sua doença ortopédica?

Não ____ Sim ____ Se sim qual/quais:

Se possível, liste todos os medicamentos que seu animal está recebendo no momento, informando quando ele recebeu a última dose de cada:

Estilo de Vida

Na última semana, em média, quanto o seu cão exercitou por dia?

0 a 1km ____ 1 a 2km ____ 2 a 3km ____ 3 a 4 km ____ Mais de 4 km ____

Na última semana, em média, quantas caminhadas seu cão deu por dia?

0 ____ 1 ____ 2 ____ 3 ____ Mais de 4 ____

Existem determinados dias da semana nos quais seu cão faz muito mais exercícios?

(Selecione mais que uma opção, se necessário.)

segunda-feira terça-feira quarta-feira quinta-feira sexta-feira sábado domingo

Em que tipo de terreno o seu cão exercita com mais frequência?

Em relva ____ Na floresta ____ Na rua ____ Em terreno acidentado ____

No exercício, como seu cão é tratado?

Com trela ____ Sem trela ____ Trote ____ Correr livremente ____

Quem limita a duração do exercício do seu cão?

Você ____ O seu cão ____

Mobilidade

Como é a mobilidade do seu cão em geral?

Muito boa Boa Normal Fraca Muito Fraca

Quão incapacitado é seu cão por sua claudicação?

De modo nenhum Ligeiramente Moderadamente Severamente Extremamente

Quão ativo é o seu cão?

Extremamente Muito Moderadamente Ligeiramente De modo nenhum

Qual é o efeito do tempo frio e humidade na claudicação de seu cão?

Sem efeito Efeito ligeiro Efeito moderado Efeito severo Efeito extremo

Até que ponto o seu cão mostra rigidez na perna afetada depois de um 'deitar'?

Sem rigidez Rigidez ligeira Rigidez moderada Rigidez severa Rigidez extrema

Em exercício

Em exercício o quão ativo é o seu cão?

Extremamente Muito Moderadamente Ligeiramente De modo nenhum

O quão predisposto é o seu cão para o exercício?

Extremamente Muito Moderadamente Ligeiramente De modo nenhum

Como você avalia a capacidade de exercícios do seu cão?

Muito boa Boa Normal Fraca Muito Fraca

Qual o efeito geral do exercício sobre a claudicação do seu cão?

Sem efeito Efeito ligeiro Efeito moderado Efeito severo Efeito extremo

Com que frequência seu cão descansa (para / senta) durante o exercício?

Nunca Quase nunca Ocasionalmente Frequentemente Muito frequentemente

Qual é o efeito do tempo frio e humidade na capacidade de exercício do seu cão?

Sem efeito Efeito ligeiro Efeito moderado Efeito severo Efeito extremo

Até que ponto o seu cão mostra rigidez na perna afetada após exercício ao deitar?

Sem rigidez Rigidez ligeira Rigidez moderada Rigidez severa Rigidez extrema

Qual é o efeito da claudicação do seu cão em sua capacidade de se exercitar?

Sem efeito Efeito ligeiro Efeito moderado Efeito severo Efeito extremo

LOAD Score:

CBPI

Descrição da dor

Selecione com uma cruz o número que melhor descreve a pior dor nos últimos 7 dias.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem dor extrema									Dor

Selecione com uma cruz o número que melhor descreve a dor pelo menos nos últimos 7 dias.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem dor extrema									Dor

Selecione com uma cruz o número que melhor descreve a média da dor nos últimos 7 dias.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem dor extrema									Dor

Selecione com uma cruz o número que melhor descreve a dor no momento.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem dor extrema									Dor

Descrição da função:

Selecione com uma cruz o número que melhor descreve como durante os últimos 7 dias a dor interferiu com o seu cão:

Atividade geral

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem afeção completa									Afeção

Satisfação da Vida

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem afeção completa									Afeção

Capacidade de se levantar para ficar de pé depois de estar deitado

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem afeção completa									Afeção

Capacidade para andar

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem afeção completa									Afeção

Capacidade para correr

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem afeção completa									Afeção

Capacidade para subir e descer escadas, pequenos degraus, passeio, etc.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sem afeção completa									Afeção

Impressão geral

Selecione a opção que melhor descreve a qualidade de vida geral do seu cão durante os últimos 7 dias.

Muito boa	Boa	Normal	Fraca	Muito Fraca
_____	_____	_____	_____	_____

Anexo 5, Tabela 6 Resultados Concentrações de IL-6 (ng/ml) nos animais em estudo

Animal	IL-6 Dia 0	IL-6 dia 30
1	0,351	0,330
2	0,342	0,320
3	0,349	0,350
4	0,310	0,316
5	0,423	0,439
Média	0,355	0,351
Desvio Padrão	0,034	0,042

Anexo 6, Tabela 7 Caracterização dos animais padrão

Identificação	Raça	Idade	Sexo	Peso
B1	Labrador	2,5 A	M	38,3 KG
B2	SRD	6 M	M	24,8 KG
B3	SRD	2,5 A	M	25,4 KG
B4	Pastor Alemão	8 M	M	30,2 KG
B5	Beagle	2,5 A	M	13 KG
B6	SRD	6 M	F	19,5 KG
B7	Pinscher	2 A	M	6,5 KG
B8	SRD	5 A	F	7,6 KG
B9	Bulldog Inglês	3 A	M	25 KG

Anexo 7, Tabela 8 Resultados Concentrações de IL-6 (ng/ml) nos animais padrão

Animal	IL-6
B1	0,355
B2	0,342
B3	0,317
B4	0,324
B5	0,321
B6	0,304
B7	0,355
B8	0,356
B9	0,358
Média	0,337
Desvio Padrão	0,019