



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**O RANELATO DE ESTRÔNCIO REDUZ DOR ARTICULAR E DANO  
ESTRUTURAL EM ARTRITE EXPERIMENTAL POR UM MECANISMO  
DEPENDENTE DE CITOCINAS**

**LEONARDO RIBEIRO SAMPAIO**

**FORTALEZA**

**2012**

**LEONARDO RIBEIRO SAMPAIO**

**O RANELATO DE ESTRÔNCIO REDUZ DOR ARTICULAR E DANO  
ESTRUTURAL EM ARTRITE EXPERIMENTAL POR UM MECANISMO  
DEPENDENTE DE CITOCINAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

**FORTALEZA**

**2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- S184r Sampaio, Leonardo Ribeiro.  
O ranelato de estrôncio reduz dor articular e dano estrutural em artrite experimental por um mecanismo dependente de citocinas/ Leonardo Ribeiro Sampaio. – 2012.  
50 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2012.  
Orientação: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

1. Citocinas 2. Dor 3. Osteoartrite 4. Estrôncio. I. Título

CDD 616.7223

---

**LEONARDO RIBEIRO SAMPAIO**

**O RANELATO DE ESTRÔNCIO REDUZ DOR ARTICULAR E DANO  
ESTRUTURAL EM ARTRITE EXPERIMENTAL POR UM MECANISMO  
DEPENDENTE DE CITOCINAS**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médicas

**Aprovada em** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha (orientador)  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas  
Universidade Federal do Ceará-UFC

---

Prof. Dr. Carlos Ewerton Maia Rodrigues  
Universidade de Fortaleza-UNIFOR

À minha esposa Sabrina

Aos meus pais

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelo apoio, competência, e orientações preciosas na elaboração desta dissertação;

À Dr. Ana Caroline Rocha de Melo Leite e ao Prof. Dr. Francisco Saraiva da Silva Jr., pela orientação e participação fundamental na execução deste trabalho;

À Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão e à Profa. Dra Margarida Maria Pompeu, pela análise histopatológica das cartilagens;

Aos colegas de laboratório, Natália, Carol, Aline e Rodolfo, pelo excelente convívio e importante ajuda;

Aos meus amigos, Cláudio, Giovany e Alberto, pelos conselhos preciosos.

## RESUMO

O ranelato de estrôncio (RE) é um composto atualmente usado para tratar osteoporose que, da mesma forma que os bifosfonados, talvez possa ter um efeito analgésico. Nós objetivamos avaliar a atividade anti-inflamatória do RE na artrite por zymosan e no modelo de osteoartrite (OA) da transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). Ratos receberam 1 mg de zymosan intra-articular ou salina no joelho. Outros grupos foram submetidos a TLCA ou a uma falsa-operação. Hipernocicepção (dor articular) foi avaliada através dos testes da incapacitação articular e da pressão da pata. O influxo celular e citocinas foram mensurados nos exudatos articulares e a gravidade da OA foi avaliada através da análise histopatológica após 70 dias da TLCA. Os grupos receberam o RE (30 – 300 mg/kg por gavagem) ou salina. RE reduziu significativamente e de forma dose-dependente a dor articular nos dois modelos de artrite, ao mesmo tempo em que não alterou o influxo celular. A administração crônica da mesma dose do RE que teve ação analgésica (300 mg/kg) também reduziu significativamente a gravidade da OA na análise histopatológica. Os níveis articulares de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  mensurados na fase aguda da artrite por zymosan foram significativamente reduzidos pelo RE, enquanto que os níveis de CINC-1 não foram alterados. Trata-se do primeiro relato mostrando que o RE teve efeito analgésico em dois modelos de artrite. Além disso, a administração diária do RE preveniu o dano articular no modelo de OA. Estes efeitos estiveram associados a inibição da liberação de citocinas inflamatórias nas articulações inflamadas. Além de demonstrar que o RE pode operar por um mecanismo dependente de citocinas, estes resultados sugerem um potencial de droga modificadora do curso da doença do RE na OA.

**Palavras-chave:** Citocinas. Dor. Osteoartrite. Ranelato de Estrôncio.

## ABSTRACT

Strontium ranelate (SR) is a compound currently used to treat osteoporosis that, similar to bisphosphonates, may also provide analgesia. We aim to investigate the anti-inflammatory activity of SR in zymosan arthritis and in the anterior cruciate ligament transection (ACLT) osteoarthritis (OA) model. Rats received 1 mg zymosan intra-articularly or saline into the knee. Other groups were subjected to ACLT or a sham procedure. Hypernociception (joint pain) was assessed using the articular incapacitation and paw-pressure tests. Cell influx and cytokines were measured in joint exudates and OA severity was evaluated using histopathology 70 days after ACLT. Groups received either SR (30 – 300 mg/kg *per os*) or saline. SR dose-dependently and significantly inhibited joint pain in both arthritis models, while not altering cell influx. Chronic daily administration of the same dose of SR (300 mg/kg) that was antihypernociceptive significantly reduced OA severity at histopathology. Joint levels of IL-1 $\beta$  and TNF measured in the acute phase of zymosan arthritis were significantly reduced by SR, whereas those of CINC-1 were not altered. This is the first report that SR provides analgesia in two arthritis models. Additionally, daily administration of SR prevented joint damage in an OA model. These effects are associated to inhibition of inflammatory cytokines release into the inflamed joints. In addition to demonstrate that SR may operate through a cytokine-dependent mechanism, these results suggest a potential disease-modifying effect of SR in OA.

**Key words:** Cytokines. Osteoarthritis. Pain. Strontium Ranelate.

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1: Animais deambulando no sistema para avaliação da incapacitação articular.....	24
FIGURA 2: Animal sendo submetido ao teste eletrônico de pressão na pata.....	26
FIGURA 3: Efeito do pré-tratamento com RE (30, 100, 300mg/kg) no teste de incapacitação articular do rato.....	29
FIGURA 4: Efeito do pré-tratamento com RE (30, 100, 300mg/kg) no acúmulo articular de células inflamatórias mensurado após 6 horas da indução da artrite por zymosan.....	30
FIGURA 5: Efeito do pré-tratamento com RE (300 mg/kg) na liberação articular de TNF- $\alpha$ na artrite induzida por zymosan.....	31
FIGURA 6: Efeito do pré-tratamento com RE (300 mg/kg) na liberação articular de IL-1 na artrite por zymosan.....	32
FIGURA 7: Efeito do pré-tratamento com RE (300 mg/kg) na liberação articular de CINC-1 na artrite por zymosan.....	33
FIGURA 8: Efeito do tratamento com RE (300 mg/kg) na hiperalgesia articular induzida pela TLCA.....	35
FIGURA 9: Efeito do tratamento com RE (300 mg/kg) no acúmulo de células inflamatórias na cavidade articular, medido 6 horas após administração da medicação (16 dias após a TLCA).....	36
FIGURA 10: Foto micrografias de cartilagens coradas por H&E das articulações após 70 dias da TLCA.....	38
FIGURA 11: Foto micrografias de cartilagens coradas pela Safranina O das articulações após 70 dias da TLCA.....	39

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>CINC-1</b>	químioatraente de neutrófilos induzido por quimiocina-1
<b>IL</b>	interleucina
<b>MMP</b>	metaloproteinase
<b>NT</b>	não-tratados
<b>OA</b>	osteoartrite
<b>RE</b>	anelato de estrôncio
<b>TLCA</b>	transecção do ligamento cruzado anterior
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>TSP</b>	tempo de suspensão da pata

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. A osteoartrite: aspectos gerais.....	11
1.2. Osteoartrite e inflamação sinovial .....	12
1.3. Osteoartrite e dor .....	14
1.4. O ranelato de estrôncio.....	16
1.5. O modelo experimental da transecção do ligamento cruzado anterior.....	19
1.6. O modelo experimental de artrite induzido pelo zymosan .....	21
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4. RESULTADOS .....	30
4.1. Efeito do RE na dor articular na artrite induzida por zymosan.....	30
4.2. Efeito do RE no influxo celular agudo na artrite induzida por zymosan.....	30
4.3. Efeito do RE na liberação de citocinas na artrite induzida por zymosan.....	30
4.4. Efeito do RE na dor articular no modelo da TLCA .....	36
4.5. Efeito do RE no acúmulo de células inflamatórias na cavidade articular no modelo da TLCA .....	36
4.6. Efeito do RE na histopatologia articular no modelo de osteoartrite da TLCA .....	39
5. DISCUSSÃO.....	42
6. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. A osteoartrite: aspectos gerais

A osteoartrite (OA), antigamente denominada de artrose, é uma doença articular que pode ser definida, de acordo com o colégio americano de reumatologia, como “um grupo heterogêneo de condições que produzem sinais e sintomas associados à integridade defectiva da cartilagem articular e a alterações nas margens do osso subcondral” (ALTMAN *et al.*, 1986).

A OA é considerada a doença osteoarticular mais comum, levando frequentemente a algum tipo de incapacidade e tendo um importante impacto nos sistemas de saúde. Nos Estados Unidos, 10% dos homens e 13% das mulheres acima de 60 anos apresentam OA sintomática do joelho (ZHANG; JORDAN, 2010). Naquele país, a OA já é a segunda maior causa de incapacidade funcional em homens acima de 50 anos, perdendo apenas para a doença arterial coronariana (BROOKS, 2006). A OMS estima que 80% dos pacientes com OA tenham algum tipo de limitação dos movimentos, e 25% não consigam desempenhar plenamente suas atividades da vida diária (SHARMA; KAPOOR; ISSA, 2002). A OA avançada também é a principal indicação para a realização de artroplastia total de joelho e quadril. Estes números tendem a aumentar ainda mais com o envelhecimento da população e a epidemia da obesidade, ambos importantes fatores de risco para a doença (ZHANG; JORDAN, 2010).

A história natural da OA mostrou-se heterogênea, com evolução clínica variável. Hochberg *et al.* (1989) sugeriram que metade dos portadores da doença diagnosticada por exames radiográficos podem ser assintomáticos. A maioria dos pacientes sintomáticos apresentam dor e incapacidade contínuas e frequentemente progressivas no decorrer dos anos (DIEPPE *et al.*, 2000). Entretanto, a correlação entre piora da dor e progressão do dano estrutural nem sempre é linear, com pacientes apresentando discrepâncias nestes quesitos (LANE *et al.*, 2004).

O tratamento da OA permanece insatisfatório apesar das várias modalidades terapêuticas farmacológicas e não-farmacológicas que foram testadas nos últimos anos (HOCHBERG *et al.*, 2012). Até o presente momento a intervenção terapêutica mais eficaz no tratamento da dor decorrente da OA de quadril e joelho ainda é a artroplastia total, ou seja, a substituição da articulação afetada por uma prótese (BRANDT, 2004). Diferentemente da artrite reumatoide, onde já existem várias drogas modificadoras da evolução da doença, na OA não existe uma medicação sequer comprovadamente eficaz em parar sua evolução

(HOCHBERG *et al.*, 2012). Neste contexto, em que uma doença tão prevalente e capaz de provocar um impacto considerável no indivíduo e na sociedade permanece sem tratamento bem estabelecido, faz-se urgente a identificação de novas medicações que possam tratar efetivamente a dor e incapacidade que acompanham a OA, assim como impedir sua progressão.

## 1.2. Osteoartrite e inflamação sinovial

Tradicionalmente, a osteoartrite (OA) tem sido rotulada de doença degenerativa e não-inflamatória. Entretanto, observamos na prática clínica que alguns pacientes apresentam ao exame físico sinais de inflamação sinovial, como edema e calor, ainda que em bem menor intensidade que os pacientes com artrite reumatoide, o que reflete um componente inflamatório da doença.

As evidências encontradas na literatura médica também apontam para uma participação importante da sinovite na patogênese da OA. Um estudo encontrou evidências de inflamação sinovial na maioria dos pacientes com OA de joelho inicial (MYERS *et al.*, 1990). Desde então, vários estudos encontraram evidências histológicas de inflamação sinovial na doença (DE LANGE-BROKAAR *et al.*, 2012). A sinovite da OA é caracterizada por hiperplasia sinovial, com infiltração de células inflamatórias como macrófagos e linfócitos T e B (MARTEL-PELLETIER, 2004). A inflamação sinovial na OA é obviamente menos acentuada do que na artrite reumatoide (DE LANGE-BROKAAR *et al.*, 2012). Um aspecto interessante é que alguns estudos mostraram que o processo inflamatório parece ser ainda mais exuberante no estágio precoce da doença. Benito *et al.* (2005) compararam um grupo com OA inicial com outro com pacientes candidatos a artroplastia total do joelho, ou seja, com a forma bastante avançada da doença. A migração macrofágica, proliferação vascular e número de células produzindo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram significativamente maiores na forma inicial de OA.

A membrana sinovial normal é composta por dois tipos de células: os sinoviócitos tipo A, que se assemelham bastante aos macrófagos em estudos com microscopia eletrônica, e os sinoviócitos tipo B, que tem características similares aos fibroblastos (BRESHIHAN, 1992). De fato, os sinoviócitos tipo A nada mais são do que macrófagos do tecido sinovial, sendo impossível distingui-los dos macrófagos derivados de monócitos circulantes que se instalam na membrana sinovial inflamada (SZEKANECZ; KOCH, 2007). Os macrófagos

representam apenas 20 a 30% das células presentes na membrana sinovial normal. Na sinovite que acompanha a OA as células que compõe a membrana sinovial hipertrofiada passa a ser constituída por uma maioria de macrófagos (BRESHIHAN, 1992).

Os macrófagos e linfócitos T são os tipos celulares mais encontrados na sinovite da OA. Em um estudo os macrófagos representaram 65% das células inflamatórias e os linfócitos T 22%. Linfócitos B, plasmócitos, e mastócitos também são encontrados, porém em menor quantidade. Células dendríticas ocorrem em pequeno número e neutrófilos quase não são encontrados (DE LANGE-BROKAAR *et al.*, 2012). Os macrófagos são predominantemente encontrados dentro da membrana sinovial como relatado acima. Já os linfócitos T foram encontrados predominantemente abaixo da membrana sinovial. Os linfócitos CD4+ são mais abundantes que os linfócitos CD8+. Várias populações de linfócitos T helper (Th) foram encontradas, principalmente Th1, Th2 e Th17. Um estudo encontrou uma relação Th1/Th2 de 1,5 na OA comparado com uma relação de 6,1 na artrite reumatoide. Nesta comparação com a sinovite da artrite reumatóide, os mastócitos são proporcionalmente mais abundantes na OA enquanto que os linfócitos B são relativamente menos encontrados na OA do que na artrite reumatóide (DE LANGE-BROKAAR *et al.*, 2012).

TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são as duas citocinas pró-inflamatórias mais encontradas na sinovite da OA. A origem celular exata destas citocinas na OA ainda não foi estabelecida mas acredita-se que sejam produzidas principalmente por macrófagos e linfócitos T. Outras citocinas como interferon gama, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 e o fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) também foram encontradas em menor quantidade. Em geral as mesmas citocinas encontradas na artrite reumatoide são encontradas na OA. As diferenças no perfil de citocinas encontradas nas duas doenças são quantitativas e não qualitativas, com uma quantidade menor encontrada na OA (DE LANGE-BROKAAR *et al.*, 2012).

As citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , vão ter papel importante na fisiopatologia da OA. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  reduzem a produção de proteoglicanos e colágeno tipo II pelos condrócitos. Ao mesmo tempo, elas estimulam os mesmos condrócitos a liberarem as principais metaloproteinasas (MMP) responsáveis pela destruição da cartilagem que ocorre na OA: MMP-1, MMP-3 e MMP-13. Ambas as citocinas também estimulam a liberação de outros mediadores inflamatórios que participam na patogênese da OA. Elas promovem a liberação de óxido nítrico e anion superóxido que contribuem para a degradação da cartilagem. Ao mesmo tempo, inibem a ação de enzimas antioxidantes que combatem estes produtos do oxigênio (KAPOOR *et al.*, 2011).

As citocinas também participam da secreção de outros mediadores inflamatórios como as prostaglandinas que vão participar da patogênese da OA. Concentrações elevadas de prostaglandina E2 (PGE2) estão presentes no líquido sinovial de pacientes com OA (EGG, 1984). O tecido sinovial parece ser a principal fonte de eicosanóides no líquido sinovial. Sabe-se que células sinoviais produzem PGE2 quando estimuladas com IL-1 *in vitro* (GILMAN *et al.*, 1988). Nas inflamações sinoviais, ocorre um aumento da expressão da COX-2, predominantemente nas células do endotélio vascular, no infiltrado mononuclear e nos fibroblastos sub-sinoviais. Além disso, as células da membrana sinovial expressam constitutivamente a COX-1 (CROFFORD, 1999).

A obesidade é um fator de risco bem estabelecido para OA de joelho. Além da óbvia explicação de que a sobrecarga sobre a articulação levaria ao desgaste da cartilagem articular, evidências recentes sugerem que adiposidade estaria relacionada a mediadores inflamatórios que contribuiriam para fisiopatologia da OA. O tecido adiposo é atualmente reconhecido como um sistema endócrino bastante ativo capaz de secretar adipocitocinas, como a leptina, resistina e adiponectina. Estas citocinas tem sido detectadas no líquido sinovial de pacientes com OA, inclusive com uma associação entre sua presença e o dano a cartilagem articular. Em um estudo, a administração de leptina a condrócitos de pacientes com OA levou a um aumento na produção de IL-1 $\beta$ , MMP-9 e MMP-13. De fato, evidências atuais parecem sugerir que as adipocitocinas podem afetar a patogênese da OA através de ação direta degradando a cartilagem articular ou através de ação indireta controlando a secreção intra-articular de citocinas pró-inflamatórias (SOWERS; KARVONEN-GUTIERREZ, 2010)

A caracterização do envolvimento de mediadores inflamatórias como as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , produzidas principalmente por macrófagos, na patogênese da OA, oferece a perspectiva de testar-se intervenções farmacológicas capazes de agir neste ambiente específico. Mais precisamente, drogas capazes de inibir estas citocinas talvez possam bloquear a evolução natural da doença. Partindo desta premissa, drogas anti-citocinas vem sendo testadas na OA, porém ainda sem papel definido (KAPOOR *et al.*, 2011).

### **1.3. Osteoartrite e dor**

A dor articular é a manifestação clínica central da OA e a principal razão para os indivíduos afetados procurarem assistência médica. Dada a inexistência atual de medicações

comprovadamente capazes de bloquear a progressão estrutural da doença, o tratamento atual da OA consiste no tratamento da dor.

A dor na OA é um fenômeno complexo demonstrado pela falta de correlação bem definida entre dano estrutural e este sintoma. Isto é exemplificado pelo fato de nem todos os pacientes com OA diagnosticada radiograficamente apresentarem dor. Em um estudo com indivíduos entre 65 e 74 anos, a dor no joelho foi relatada por 8,8% das pessoas com radiografia normal, 20,4% daqueles com alterações radiográficas grau 1 pela classificação de Kellgren-Lawrence (K-L), 36,9% dos indivíduos com K-L grau 2, e 60,4% dos indivíduos com K-L graus 3-4 (DAVIS *et al.*, 1992).

A cartilagem, tecido tido como central na OA, não é inervada, não podendo ser a fonte da dor. Já cápsula articular, sinóvia, periósteo, osso subcondral, ligamentos e tendões apresentam fibras nervosas aferentes (FELSON, 2005). Cerca de 20% dessas fibras são mielinizadas, majoritariamente pertencentes ao grupo III de nociceptores finamente mielinizados, enquanto um número relativamente pequeno de fibras do tipo II, com maior diâmetro e baixos limiares de ativação, também inerva a articulação. Os demais 80% são fibras não-mielinizadas, distribuídas equitativamente em fibras que pertencem ao grupo IV (tipo C) e eferentes simpáticos. Fibras dos grupos III e IV constituem os nociceptores primários de elevado limiar, não ativados por estímulos do cotidiano. As fibras de baixo limiar do tipo II estão associadas ao movimento e propriocepção e, sob inflamação, apresentam alterações agudas e transitórias em resposta à manipulação da articulação. Na inflamação, as fibras dos grupos III e IV passam tanto a apresentar atividade espontânea, como tornam-se responsivas a estímulos mecânicos externos aos quais eram previamente insensíveis (GRUBB, 2004).

A inflamação tem importante papel na patogênese da OA como relatado anteriormente. Em tecidos inflamados, nociceptores são sensibilizados de forma que estímulos leves podem levar a uma dor desproporcional (hiperalgesia), e estímulos normalmente não-dolorosos podem provocar dor (alodínia) (VERRI Jr. *et al.*, 2006). A dor relacionada aos movimentos na OA pode ser considerada um exemplo de alodínia mecânica (KIDD; URBAN, 2001).

As prostaglandinas e aminas simpáticas são considerados os principais mediadores inflamatórios a induzir dor nas artrites. Já foi demonstrado que citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , têm papel central na dor articular inflamatória através da liberação destes mediadores inflamatórios. Existem evidências ainda que estas citocinas podem sensibilizar diretamente os nociceptores. O papel nociceptivo destas

citocinas pró-inflamatórias foi reforçado ainda por estudos onde substâncias que bloqueiam a síntese ou ação destas citocinas foram capazes de inibir a nocicepção experimental (VERRI Jr. *et al.*, 2006).

Imagens de ressonância nuclear magnética têm permitido uma avaliação mais detalhada das alterações estruturais na OA, e acrescentado novas informações sobre quais estruturas inervadas da articulação estão envolvidas na gênese da dor. Tem sido demonstrada uma associação de alterações do osso subcondral e dor, reacendendo o debate sobre a importância relativa desse tecido e da cartilagem nos fenômenos da articulação artrósica. Em pacientes com OA de joelhos, edema ósseo esteve presente em 78% dos pacientes sintomáticos, mas em apenas 30% do grupo sem dor (FELSON *et al.*, 2001). Lesões mais extensas estiveram presentes em 36% dos sintomáticos *versus* 2% dos assintomáticos (FELSON *et al.*, 2001). A presença de espessamento sinovial em imagens de ressonância nuclear magnética, sugestivo de sinovite, bem como a presença de efusão articular, também guardam correlação com dor em pacientes com OA de joelhos (FELSON, 2005).

#### **1.4. O ranelato de estrôncio**

O estrôncio é um elemento químico próximo ao cálcio, também tendo alta afinidade pelo tecido ósseo. Este elemento é capaz de produzir efeitos significativos nas células ósseas, sugerindo um potencial uso no tratamento da osteoporose. Neste intuito, foi desenvolvida uma molécula chamada de ranelato de estrôncio (protos) pelo laboratório Servier (França), em que uma fração orgânica, o ácido ranélico, se liga a dois átomos de estrôncio, aumentando a biodisponibilidade deste último (MARIE, 2006).

Estudos experimentais clarificaram os possíveis efeitos do ranelato de estrôncio (RE) no tecido ósseo. Em culturas de ossos longos de camundongos, o RE inibiu a reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos, de acordo com a mensuração da liberação de cálcio, mostrando assim que o RE tem um efeito negativo na reabsorção óssea *in vitro* (TAKAHASHI *et al.*, 2003). Além disso, o RE também seria capaz de romper o citoesqueleto dos osteoclastos e de promover a apoptose destes (MARIE, 2010).

Por outro lado, O RE possui efeitos positivos sobre os osteoblastos. Utilizando-se de calvárias de ratos recém-nascidos, Cannalis *et al.* (1996) mostraram que o RE aumenta a replicação dos osteoblastos. O RE também promoveria a osteogênese através da estimulação da diferenciação dos osteoblastos (MARIE, 2010).

Os medicamentos usados no tratamento da osteoporose podem ser divididos em medicamentos que inibem a reabsorção óssea e os que promovem a neoformação óssea. Os primeiros, que atuam primariamente nos osteoclastos, incluem o hormônio feminino estrógeno, os moduladores seletivos do receptor do estrógeno como o raloxifeno e os bifosfonados. Os últimos, que atuam primariamente nos osteoblastos, incluem a teriparatida (hormônio paratireoide humano recombinante). O ranelato de estrôncio é a primeira droga aprovada para o tratamento da osteoporose com a premissa de agir tanto nos osteoclastos como nos osteoblastos, conforme discutido acima, promovendo assim uma dupla ação no metabolismo ósseo (MARIE, 2006).

O RE mostrou-se eficaz no tratamento da osteoporose pós-menopáusicas na prevenção de fraturas vertebrais e não-vertebrais, estando atualmente aprovado para o uso nestas indicações. Inicialmente, um estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado avaliou 1649 mulheres na pós-menopausa com baixa densidade mineral óssea e pelo menos 1 fratura vertebral que receberam o RE na dose de 2g/dia ou placebo durante 3 anos. Houve uma diminuição no surgimento de novas fraturas vertebrais com o RE, com uma redução no risco relativo de 49% no primeiro ano e de 41% ao final dos 3 anos, com um perfil de segurança idêntico ao placebo (MEUNIER *et al.*, 2004).

Em 2005, 5091 mulheres com pelo menos 70 anos e com densidade mineral óssea no colo do fêmur de  $0.600 \text{ g/cm}^2$  ou menos foram avaliadas em um estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado para prevenção de fraturas não-vertebrais. O RE na mesma dose de 2g/dia diminuiu a incidência de fraturas não-vertebrais com uma redução no risco relativo de 16%. Se considerarmos apenas as mulheres com alto risco de fraturas de quadril (idade  $>74$  anos e com densidade mineral óssea no colo do fêmur apresentando T score  $\leq -3$ ) a redução no risco relativo para fratura de quadril foi de 36%. A incidência de eventos adversos foi similar em ambos os grupos (REGINSTER *et al.*, 2005).

Redução de dor nas costas em pacientes com osteoporose e OA espinal concomitante já foi descrita no uso do RE por Bruyere *et al.* (2008). Eles realizaram uma análise *post-hoc* combinada dos estudos Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention (SOTI) (MEUNIER *et al.*, 2004) e Treatment Of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) (REGINSTER *et al.*, 2005) que incluía 1105 mulheres com osteoporose e OA da coluna lombar concomitante. Mais pacientes que fizeram uso do RE (41,8%) obtiveram uma melhora significativa da dor nas costas ao final de 3 anos de tratamento quando comparados ao grupo placebo (31,3%;  $p=0.03$ ). Esta análise só foi realizada nos pacientes do estudo SOTI pois apenas neste estudo foi realizado um questionário para dor nas costas. Também só foram

analisados as pacientes que não sofreram novas fraturas vertebrais no decorrer do estudo de forma a evitar a influência destas fraturas no escore de dor. Em contrapartida, uma limitação desta análise decorre do fato de que o questionário de dor nas costas não se restringia especificamente a região lombar. As pacientes que fizeram uso do RE também apresentaram uma diminuição da progressão radiológica da OA da coluna lombar (RR, 0.58; 95% CI, 0.42 - 0.79;  $p = 0.0005$ ), levando os autores a sugerirem que o RE possa ter o potencial de uma droga modificadora do curso da doença em OA. Nesta análise foram incluídas mulheres dos dois estudos já que em ambos se dispunha de radiografias da coluna lombar no início do tratamento e ao final de 3 anos. Este estudo abre uma importante possibilidade de uma nova indicação para o uso do RE. Entretanto, principalmente devido ao desenho do estudo em questão, é necessário mais investigações para atribuir um papel ao RE no tratamento da osteoartrite.

Ação anti-nociceptiva também já foi demonstrada com os bifosfonados, outra classe de medicamentos anti-osteoporose com ação em osteoclastos similar ao RE, o que corrobora ainda mais com o potencial analgésico deste último. De fato, a administração do ácido zolendrônico, um potente bifosfonato endovenoso, tem efeito analgésico em pacientes com metástases ósseas, sendo esta uma indicação bem estabelecida desse fármaco (COSTA; MAJOR, 2009). Nosso grupo já demonstrou previamente que o risedronato, um bifosfonato oral de terceira geração, apresenta atividade antinociceptiva intrínseca na artrite experimental, que está associada a uma diminuição na liberação de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e leucotrieno B4 nas articulações inflamadas (CARVALHO *et al.*, 2006).

É possível que este efeito em artrite causado por drogas que inibem osteoclastos possa ser explicado por uma possível ação concomitante em células que participam da inflamação sinovial como os macrófagos. De fato, os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela fusão de precursores mononucleares da família dos monócitos/macrófagos, diferenciados a partir de ação de citocinas como o ligante do Ativador do Fator Nuclear- $\kappa$ B (RANK-L), em presença do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (Teitelbaum, 2000). Portanto, ambos derivam da mesma linhagem macrofágica da medula óssea. Há evidências inclusive que macrófagos presentes na sinovite da AR, e não apenas precursores mononucleares, levariam a formação de osteoclastos, como mostrou um estudo em que macrófagos isolados no líquido sinovial de pacientes com a doença foram capazes de formar osteoclastos, através da estimulação de TNF- $\alpha$  e IL-1. (SZEKANECZ; KOCH, 2007).

### 1.5. O modelo experimental da transecção do ligamento cruzado anterior

Os modelos experimentais de OA são ferramentas de pesquisa muito importantes para estudar a patogênese e potenciais intervenções terapêuticas nesta doença. Diferentemente do estudo em humanos onde, por razões éticas, a obtenção de tecidos acometidos para análise está limitada, os modelos de OA em animais permite uma estudo sistemático destes tecidos. Da mesma forma, uma avaliação cinética extensiva é difícil de ser realizada em humanos. Os modelos experimentais de OA permitem ainda o teste de novos medicamentos antes de usá-los em humanos.

Os modelos experimentais de OA podem ser classificados em espontâneos e induzidos (genética, cirúrgica ou quimicamente). Inexiste atualmente um modelo ideal que englobe de forma precisa todos os aspectos da doença humana (AMEYE; YOUNG, 2006). Animais que desenvolvem OA espontaneamente provavelmente são os melhores para expressar a lenta evolução da doença humana. Contudo, exigem um tempo muito longo de observação, e apresentam progressão variável, dificultando sua utilização para eficácia de tratamentos. Modelos em camundongos geneticamente modificados, como aqueles “knock-out” para os genes *Col2a1* ou para *ADAMTS-5*, permitem avaliar o papel de moléculas específicas na fisiopatologia, mas também são pouco adequados para avaliação de tratamentos. Em modelos induzidos cirúrgica ou quimicamente, o dano articular se desenvolve de forma rápida e previsível. No entanto, esses modelos são mais compatíveis com OA secundária, e os animais podem desenvolver lesão agressiva, distanciando-se da evolução lenta vista em humanos.

O ligamento cruzado anterior garante a estabilidade da articulação do joelho, não permitindo uma translocação anterior e rotação excessivas da tíbia. A perda deste mecanismo com a transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) tem servido como modelo experimental mecânico para estudar alterações articulares que se assemelham aos da OA humana (CASTRO *et al.*, 2006). Em ratos (STOOP *et al.*, 2001), a TLCA produz alterações compatíveis com a OA humana, surgindo edema de matriz e perda de condrócitos, em associação a fibrilação da cartilagem, já aos sete dias de indução. O dano da cartilagem ocorre de modo bifásico: lesões precoces concentradas em regiões periféricas, e uma segunda fase com lesões nas áreas centrais dos côndilos femorais e do platô tibial. As lesões iniciais começam na região superficial e se aprofundam na cartilagem, com redução de proteoglicanos e desnaturação do colágeno tipo II.

Além das alterações na cartilagem, este modelo apresenta remodelação óssea, caracterizada inicialmente por perda do osso subcondral, detectada duas semanas após a cirurgia, com posterior aumento de volume do mesmo, além da presença evidente de osteófitos dez semanas após a TLCA (HAYAMI *et al.*, 2006). De fato, o modelo já foi utilizado para avaliar a relevância dessa remodelação do osso subcondral na progressão do dano da cartilagem articular, e a administração de alendronato aos animais, com supressão da reabsorção óssea inicial e do aumento posterior da formação óssea, foi associada à condroproteção (HAYAMI *et al.*, 2004).

A TLCA é, portanto, um bom modelo experimental de OA, apresentando alterações tanto da cartilagem como do osso subcondral compatíveis com a doença humana, e sendo passível de modificação estrutural por intervenção farmacológica. A utilização do rato neste modelo é adequada pelo baixo custo, facilidade para manutenção e baixa incidência de infecção associada a procedimentos cirúrgicos.

Apesar de dor e limitação de movimentos serem os principais sintomas na OA, tais aspectos não costumavam ser enfocados nos modelos animais. Com o objetivo de estudar uma lesão funcional da articulação, e usando a experiência acumulada no modelo de artrite por zymosan em ratos, nosso grupo aplicou o teste de incapacitação articular para avaliação de ratos submetidos à TLCA (CASTRO *et al.*, 2006). Nossos resultados mostraram de forma inédita a ocorrência de dor articular entre o primeiro e o décimo quarto dia, atingindo valores máximos durante a primeira semana. Neste estudo a dor articular nos ratos que sofreram a TLCA foi efetivamente diminuída pela administração de anti-inflamatórios como indometacina e meloxicam, demonstrando que a dor, e não apenas a instabilidade articular, contribuiu para a alteração observada no teste de incapacitação articular.

Acredita-se que a melhor forma de se avaliar a alodínia mecânica que ocorre nos modelos experimentais de OA seja através do teste de Von Frey (LITTLE; ZAKI, 2012). O problema com o teste tradicional em que se utilizam os filamentos de Von Frey, é que estes são instáveis mecanicamente e sua utilização é difícil de padronizar. Foi, então, desenvolvido o teste eletrônico modificado de mensuração de pressão na pata do rato, um teste de Von Frey modificado, para avaliação da alodínia mecânica. Este teste forneceu um método objetivo e preciso para mensurar as reações dos animais a estímulos mecânicos (VIVANCOS *et al.*, 2004).

### 1.6. O modelo experimental de artrite induzido pelo zymosan

O zymosan é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, cuja administração em tecidos promove intensa reação inflamatória. A administração do zymosan em articulações de animais leva a uma sinovite erosiva grave. Este processo inflamatório cursa com aumento da permeabilidade vascular e migração celular com predomínio de polimorfonucleares até 3 dias após a indução da artrite. Em seguida, tende a predominar um infiltrado mononuclear com proliferação de célula sinoviais, degradação da cartilagem articular e erosões ósseas, reproduzindo assim eventos que ocorrem na artrite reumatóide, inclusive com formação do *pannus* reumatóide (SILVA Jr.; ROCHA, 2006). Acredita-se que este processo seja estimulado pela não granulação de mastócitos e produção de eicosanoides por polimorfonucleares e macrófagos. Ocorre ainda a ativação da via alternativa do complemento promovendo a liberação de enzimas lisossomiais macrofágicas e induzindo a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 por macrófagos e neutrófilos (GEGOUT; GILLET; CHEVRIER, 1994)

Nosso grupo demonstrou que a administração articular do zymosan causa dor levando a um prejuízo máximo da marcha do rato após 3 a 4 horas da indução da artrite, através do teste da incapacitação articular (ROCHA *et al.*, 1999). Também foi demonstrado que após 6 horas da indução da artrite pode ser detectado uma liberação intra-articular importante das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . O efeito de medicamentos sobre esta liberação de citocinas pode, portanto, ser estudado como foi demonstrado em um estudo em que ratos receberam o risedronato, um bifosfonato oral de terceira geração. Como foi dito anteriormente, o grupo de animais que recebeu o risedronato teve uma liberação menor de TNF- $\alpha$  comparado ao grupo placebo, sugerindo que o medicamento inibiu a produção desta citocina (CARVALHO *et al.*, 2006). Esta associação entre diminuição na liberação de citocinas e efeito analgésico provavelmente uma relação de causa e efeito levando-se em consideração o papel hipernociceptivo direto ou indireto destas citocinas conforme discutido anteriormente.

A lesão da cartilagem articular induzida pelo zymosan tem sido estudada através da análise histológica, tendo sido demonstrado toda a sequência de eventos que culmina com a formação do *pannus* reumatóide. Nosso grupo demonstrou ainda uma correlação entre a evolução e gravidade da sinovite na artrite por zymosan com a redução na quantidade de glicosaminoglicanos na cartilagem articular, de tal sorte que a partir dos 7 dias de artrite, a

quantidade de glicosaminoglicanos é significativamente menor em comparação aos valores basais (controles), persistindo reduzida até os 21 dias de artrite (ROCHA *et al.*, 2002).

## **2. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Avaliar o efeito anti-inflamatório do ranelato de estrôncio em ratos submetidos à artrite induzida por zymosan e à transecção do ligamento cruzado anterior.

### **Objetivos específicos**

- Estudar o efeito do ranelato de estrôncio no modelo de artrite por zymosan sobre:
  - hipernocicepção articular;
  - liberação de citocinas;
  - migração celular.
  
- Estudar o efeito do ranelato de estrôncio no modelo de TLCA sobre:
  - hipernocicepção articular;
  - migração celular;
  - lesão histopatológica da cartilagem articular.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **Animais**

Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 180 a 230 g. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes preconizadas pelo Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2003), com todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais. O projeto foi aprovado (número 60/08) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEPA da UFC. Em todos os experimentos foram utilizados 6 a 8 animais por grupo.

#### **Indução da artrite por zymosan**

Os ratos foram submetidos a uma anestesia com inalação de éter etílico e, em seguida, foi induzida a artrite através da injeção intra-articular, no joelho direito, de 1 mg de zymosan dissolvido em solução salina estéril. O grupo *naïve* recebeu apenas solução salina. Após 6 horas, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg) intra-peritoneal e sacrificados.

#### **Indução do modelo experimental da transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)(modificado de STOOP *et al.*, 2001)**

Os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico. A região ventral do joelho direito foi depilada, higienizada e submetida a uma incisão longitudinal. A cápsula articular medial foi exposta por uma incisão perpendicular ao ligamento colateral medial. Em seguida, foram seccionados os ligamentos cruzado anterior e meniscotibial, e o menisco medial. A cápsula articular e pele foram suturadas com Vycril 5/0 e Nylon 4/0, respectivamente. Grupos falso-operados (SHAM) foram submetidos a incisão na pele e a capsulotomia seguida por sutura da pele. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg) intra-peritoneal e sacrificados após 16 dias da cirurgia.

#### **Análise do influxo celular**

Após 6 horas da indução da artrite por zymosan, e 16 dias após a TLCA, procedeu-se à lavagem das cavidades articulares, com o exsudato articular coletado por

aspiração e utilizado para a contagem da celularidade total em câmara de Neubauer. Após centrifugação do exsudato obtido no experimento da artrite por zymosan, os sobrenadantes foram estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

### **Dosagem de citocinas**

Por ensaio imunoenzimático (ELISA), foram feitas as dosagens de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) e quimioatraente de neutrófilos induzido por quimiocina-1 (CINC-1) no sobrenadante obtido dos lavados articulares no experimento da artrite induzida por zymosan.

### **Incapacitação articular no modelo da artrite por zymosan**

O teste de incapacitação articular para ratos foi utilizado conforme descrito por Tonussi e Ferreira (1992). Após injeção de zymosan no joelho direito, os animais foram postos para deambular em um cilindro metálico que gira a uma velocidade de 3 rpm. Colocou-se sapatilhas metálicas em volta das patas traseiras dos animais, que forão postos para deambular para se habituarem. A pata direita foi conectada a um circuito simples computadorizado, para aquisição de dados. O Tempo de Suspensão da Pata (TSP) foi definido como o tempo que o animal deambula sem tocar o cilindro com a pata injetada, por um período de 60 segundos, o qual foi tomado como diretamente proporcional à incapacitação articular (Figura 1).

**Figura 1: Teste de incapacitação articular para ratos.**



Os animais são colocados para deambular em um cilindro metálico que gira 3 rpm, e a pata traseira direita é conectada a um sistema informatizado de aquisição de dados que fornece o tempo durante o qual o animal deambula com a pata levantada (TSP).

### **Avaliação da dor articular no modelo da transecção do ligamento cruzado anterior**

Os ratos foram colocados em caixas de acrílico com uma grade de arame como assoalho, 15 minutos antes do teste, em um local calmo para se habituarem. O teste começou apenas quando os animais estavam quietos, sem estar repousando sobre suas patas. Também não podiam estar defecando ou urinando, e tinham que estar com as 4 patas sobre o assoalho. Foi utilizado o teste eletrônico modificado de mensuração de pressão na pata do rato, um teste de Von Frey modificado, para avaliação da dor articular (GUERRERO *et al.*, 2006; VIVANCOS *et al.*, 2004). O medidor de pressão consistia de um transdutor de força equipado com uma ponta de polipropileno de 4,15 mm<sup>2</sup> (analgesímetro digital, Insight<sup>®</sup>, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O investigador foi treinado para aplicar a ponta de polipropileno perpendicularmente à pata traseira direita do rato com um aumento gradual da pressão. O teste consistiu em tocar a pata do animal para provocar um reflexo de flexão seguido de uma resposta clara de retirada com o recuo da pata. A intensidade do estímulo foi automaticamente registrada quando a pata foi retirada. O teste foi repetido até se obter 3 medições com menos de 1 g de diferença entre elas. O valor da resposta para cada animal foi obtido com a média destas 3 medições. Chamamos esta resposta de limiar mecânico que é expresso em gramas (g). A intensidade da dor é inversamente proporcional ao limiar mecânico (figura 2).

### **Coleta das estruturas articulares no modelo de TLCA para análise histopatológica**

Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg) intra-peritoneal e sacrificados após 70 dias da TLCA. O joelho direito de 6 ratos em cada grupo foi retirado cirurgicamente após dissecação de músculos e ligamentos. Após fixação com formalina a 10% v/v por 24 h, as articulações foram imersas em solução descalcificante por 15 dias. Os joelhos foram em seguida processados para inclusão em parafina e submetidos a coloração com hematoxilina-eosina e safranina O.

A análise histopatológica foi realizada às cegas por duas patologistas independentes (Profs. Dras. Virgínia Cláudia Carneiro Girão e Margarida Maria Lima Pompeu) de acordo com os critérios histopatológicos da Osteoarthritis Research Society International (OARSI). O escore máximo possível é de 24. Os resultados são expressos como medianas (variação) para cada grupo.

**Figura 2: Teste eletrônico da pressão na pata do rato.**



Os animais são colocados em uma caixa de acrílico com uma grade de arame como assoalho. Aplica-se a ponta de polipropileno perpendicularmente à pata traseira direita do rato com um aumento gradual da pressão para provocar um reflexo de retirada da pata. A intensidade do estímulo é automaticamente registrada quando a pata é retirada. O teste é repetido até se obter 3 medições com menos de 1 g de diferença entre elas. O valor da resposta para cada animal corresponde a média destas 3 medições a qual é chamada de limiar mecânico.

### **Administração dos tratamentos**

Nos estudos que avaliaram a hipernocicepção articular, os animais tratados receberam o ranelato de estrôncio (Protos<sup>™</sup>- Servier, França – 30, 100, 300 mg/kg), por gavagem, 30 minutos antes da indução da artrite por zymosan. O grupo controle recebeu salina por gavagem, também 30 minutos antes da indução da artrite por zymosan. Animais do grupo *naïve* receberam apenas salina intra-articular. Os ratos submetidos ao modelo de OA por TLCA receberam ou RE na dose de 300 mg/kg ou salina no décimo quarto e décimo sexto dia após a cirurgia, também por gavagem, após 2 horas de jejum.

Para análise histopatológica, os grupos receberam ou RE na dose de 300 mg/kg ou salina, por 70 dias pós-TLCA, também por gavagem, após 2 horas de jejum.

### **Análise estatística**

Os resultados do TSP, do teste eletrônico modificado de pressão na pata do rato e das contagens de células e citocinas foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os dados histológicos foram relatados como medianas. Para comparações múltiplas entre médias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey. Para comparações entre medianas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.  $P < 0,05$  será considerado estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito do RE na dor articular na artrite induzida por zymosan

O RE nunca foi estudado como um composto anti-inflamatório anteriormente. Com o objetivo de estabelecer uma curva de dose-resposta, nós inicialmente estudamos o efeito do RE no modelo da artrite por zymosan, onde é encontrada uma resposta inflamatória bem mais intensa do que no modelo da TLCA. O efeito da administração oral do ranelato de estrôncio (30, 100, 300 mg/kg) na dor articular é mostrado na figura 3. Como relatado anteriormente, a injeção com zymosan provocou um aumento no TSP, que iniciou-se após 2 horas e teve seu pico entre 3 e 4 horas após a injeção (dados não mostrados). O aumento no TSP reflete a dor inflamatória articular, provavelmente causada pela estimulação de nociceptores periarticulares (ROCHA *et al.*, 1999). As doses de 100, 300 mg/kg diminuíram significativamente ( $p < 0,05$ ) o TSP máximo quando comparadas aos ratos não tratados. A dose de 300 mg/kg foi escolhida para ser usada nos experimentos do modelo da TLCA.

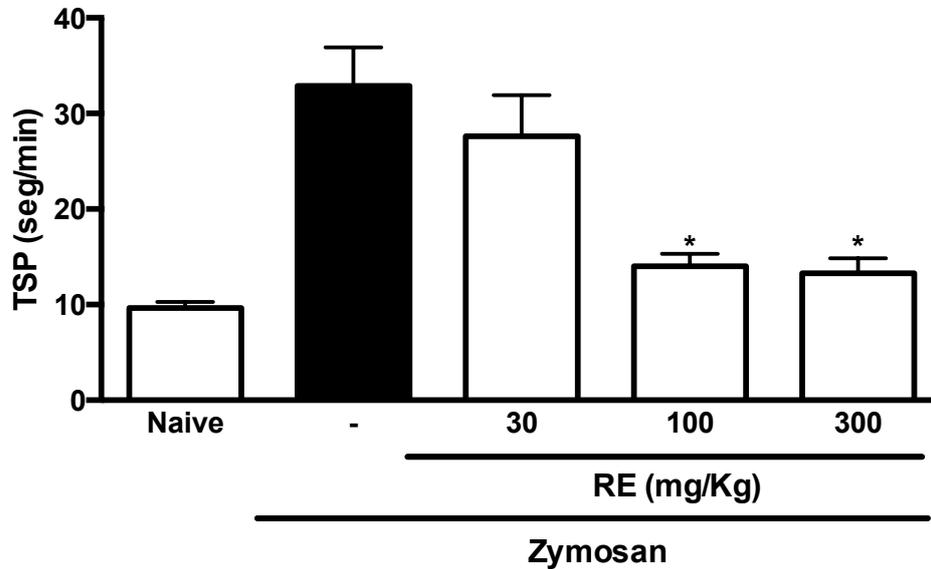
### 4.2. Efeito do RE no influxo celular agudo na artrite induzida por zymosan

A figura 4 mostra o efeito do RE no influxo celular intra-articular após 6 horas da indução da artrite por zymosan. Pode ser observado que houve uma tendência a diminuição do número de células nos exudatos sinoviais, nos grupos que receberam o RE, quando comparados ao grupo não tratado, porém este efeito não alcançou significância estatística.

### 4.3. Efeito do RE na liberação de citocinas na artrite induzida por zymosan

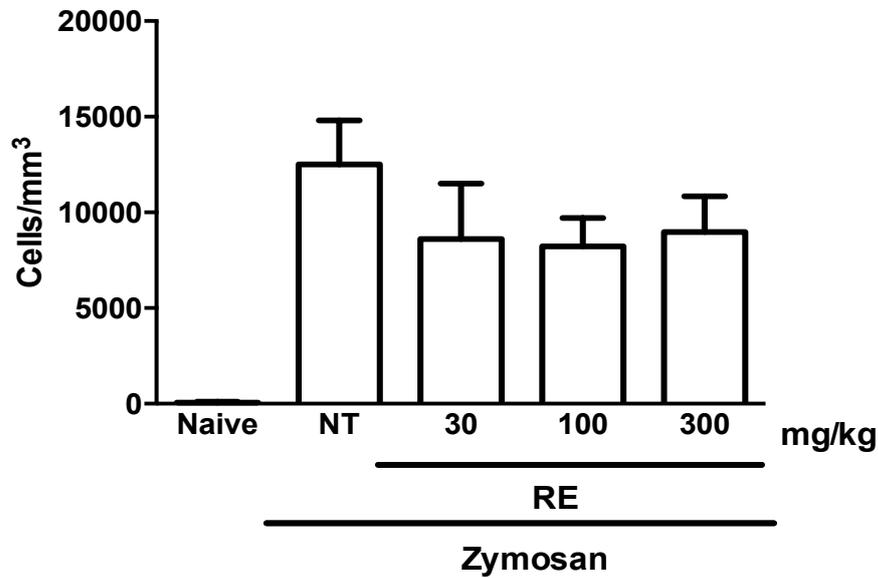
Administração do RE (300 mg/kg) inibiu ( $16,17 \pm 4,31$  pg/ml vs  $68,23 \pm 7,217$  pg/ml) significativamente ( $P < 0,05$ ) o aumento de TNF- $\alpha$  nas cavidades articulares, provocado pelo zymosan, mensurado após 6 horas quando comparado ao grupo controle (Figura 5). RE também inibiu significativamente ( $P < 0,05$ ) o aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  ( $169,6 \pm 29,13$  vs  $925,0 \pm 31,47$  pg/ml), quando comparados ao grupo controle como mostra a figura 6. Os níveis de CINC-1 não foram inibidos significativamente pelo RE ( $122,5 \pm 17,74$  pg/ml vs  $136,8 \pm 3,297$  pg/ml) (figura 7).

**Figura 3: Efeito do pré-tratamento com RE (30, 100, 300 mg/kg) no teste de incapacitação articular do rato.**



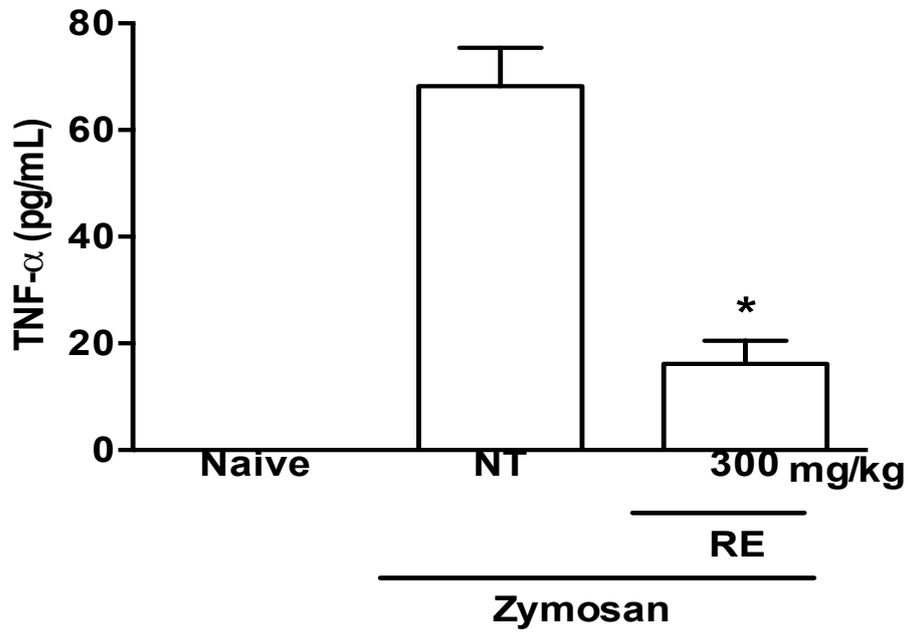
A dor articular foi medida a cada hora durante 6 horas após a injeção de 1 mg de zymosan na articulação do joelho direito, na forma do aumento do tempo de elevação da pata (TSP) medido no teste de incapacitação articular. RE foi administrado oralmente 30 minutos antes da injeção. Ratos não-tratados receberam solução salina via oral. Animais *naïve* receberam apenas salina intra-articular. Resultados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média, da variação no aumento no TSP comparado ao valor de base, estabelecido entre 3 e 4 horas após a injeção do zymosan.  $n = 6$  animais por grupo. \* $P < 0.05$  comparado com ratos não-tratados.

**Figura 4: Efeito do pré-tratamento com RE (30, 100, 300 mg/kg) no acúmulo articular de células inflamatórias mensurado após 6 horas da indução da artrite por zymosan.**



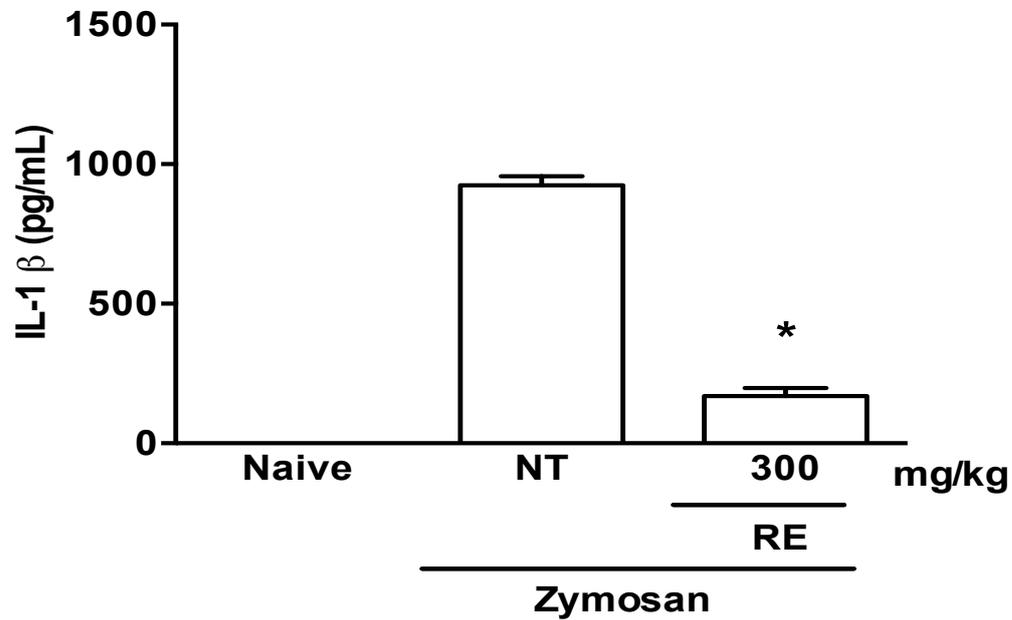
RE foi administrado oralmente 30 minutos antes da injeção. Ratos não-tratados (NT) receberam solução salina via oral. Animais *naïve* receberam apenas salina intra-articular. Resultados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média do total de leucócitos após 6 horas da indução da artrite;  $n = 6$  animais em cada grupo. Houve uma tendência a diminuição no número de células nos exudatos sinoviais nos grupos que receberam o RE (30, 100, 300 mg/kg), quando comparados ao grupo NT. Entretanto, este efeito não alcançou relevância estatística.

**Figura 5: Efeito do pré-tratamento com RE (300 mg/kg) na liberação articular de TNF- $\alpha$  na artrite induzida por zymosan.**



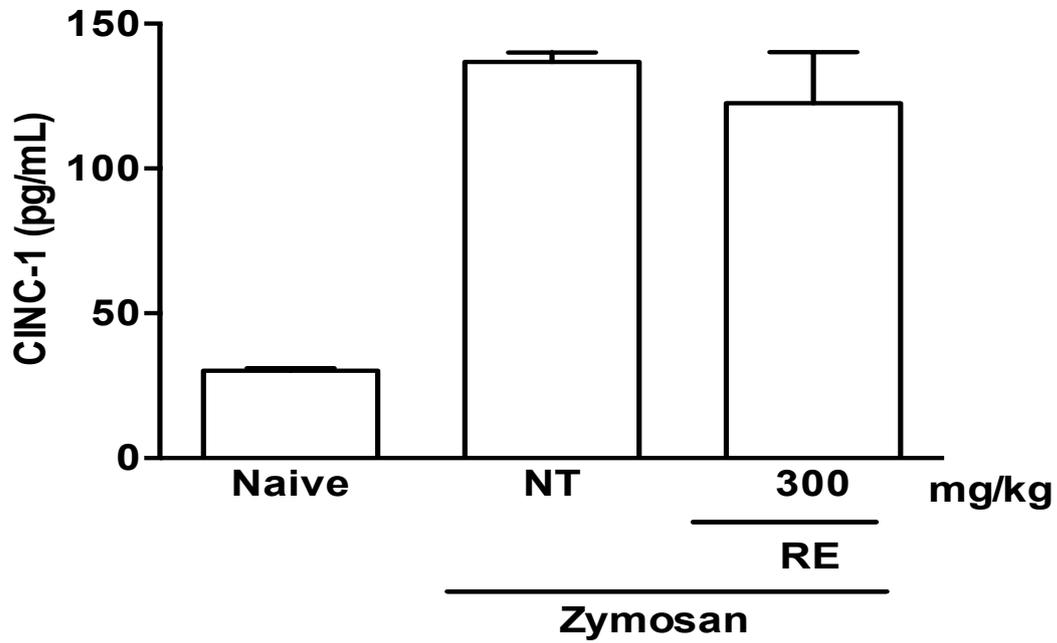
RE foi administrado oralmente 30 minutos antes da injeção. Ratos não-tratados (NT) receberam solução salina via oral. Animais *naïve* receberam apenas salina intra-articular. Resultados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média (n = 6 animais em cada grupo). \*P < 0.05 comparado com ratos NT.

Figura 6: Efeito do pré-tratamento com RE (300 mg/kg) na liberação articular de IL-1 $\beta$  na artrite induzida por zymosan.



RE foi administrado oralmente 30 minutos antes da injeção de zymosan. Ratos não-tratados (NT) receberam solução salina via oral. Animais *naïve* receberam apenas salina intra-articular. Resultados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média (n = 6 animais em cada grupo). \*P < 0.05 comparado com ratos NT.

**Figura 7. Efeito do pré-tratamento com RE (300 mg/kg) na liberação articular de CINC-1 na artrite induzida por zymosan.**



RE foi administrado oralmente 30 minutos antes da injeção. Ratos não-tratados (NT) receberam somente a injeção do zymosan. Animais *naïve* receberam salina intra-articular. Resultados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$  animais em cada grupo). Não houve diferença estatística entre os ratos tratados com RE e os ratos NT.

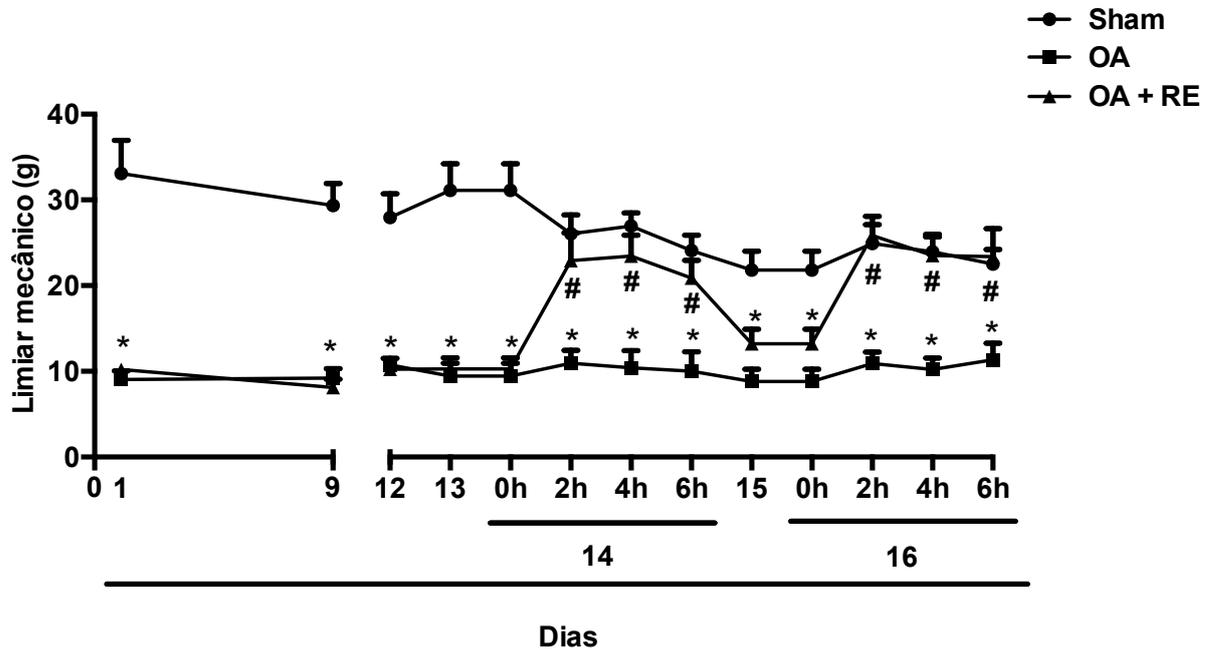
#### **4.4. Efeito do RE na dor articular no modelo da TLCA**

A figura 8 mostra que o limiar mecânico do teste eletrônico modificado de mensuração de pressão na pata do rato, que é inversamente proporcional a dor sentida pelo animal, estava significativamente e persistentemente aumentado nos animais submetidos a TLCA, quando comparadas aos animais “falso-operados. No décimo quarto dia o RE diminuiu significativamente ( $P < 0.05$ ) a hipernocicepção induzida pela TLCA após 2, 4 e 6 horas da sua administração, quando comparado aos ratos não-tratados. O efeito hipernociceptivo do RE diminuiu no dia seguinte (15º dia), de forma que os níveis do limiar mecânico retornaram próximos aos basais. A repetição da administração do RE no décimo sexto dia restabeleceu a resposta anti-hipernociceptiva.

#### **4.5. Efeito do RE no acúmulo de células inflamatórias na cavidade articular no modelo da TLCA**

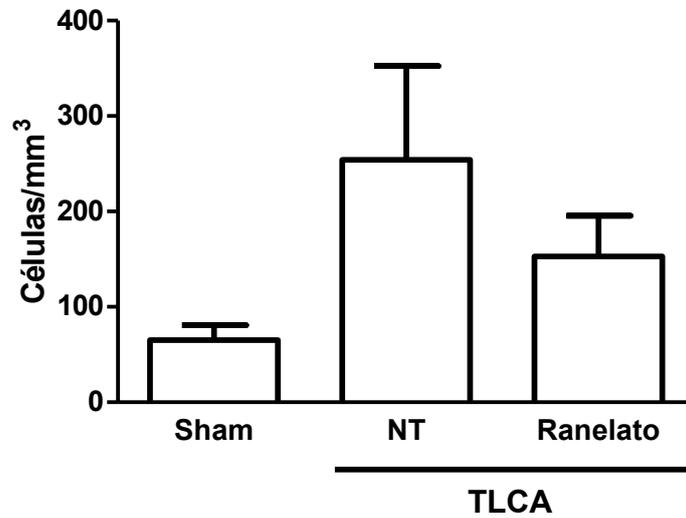
A TLCA induz uma resposta inflamatória bem mais modesta que a artrite induzida por zymosan, como mostra a figura 9. O RE (300 mg/kg) não afetou significativamente o número de células nos exudatos sinoviais, quando comparado aos ratos NT. Como os níveis de citocinas estavam indetectáveis no líquido sinovial dos animais após 16 dias da TLCA (dados não mostrados), não foi possível analisar o efeito do RE sobre a liberação destas citocinas no modelo da TLCA.

**Figura 8: Efeito do tratamento com RE (300 mg/kg) na hiperalgesia articular induzida pela TLCA.**



Após os ratos serem submetidos a TLCA (exceto o grupo sham), a dor articular foi avaliada diariamente (com exceção dos dias 10 e 11) pelo teste eletrônico modificado de mensuração de pressão na pata do rato. O grupo tratado com o RE recebeu a medicação na dose de 300 mg/kg por gavagem nos dias 14 e 16. O grupo não-tratado (OA) recebeu solução salina. O grupo sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico mas sem a TLCA. Resultados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais por grupo, após 2, 4 e 6 horas da administração do tratamento. O símbolo \* reflete diferença significativa ( $P < 0.05$ ) comparada aos ratos do grupo sham. O símbolo # reflete diferença significativa ( $P < 0.05$ ) entre o grupo tratado com RE e o grupo não-tratado (OA).

**Figura 9: Efeito do tratamento com RE (300 mg/kg) no acúmulo de células inflamatórias na cavidade articular, medido 6 horas após administração da medicação (16 dias após a TLCA).**



Os grupos NT e sham receberam solução salina por gavagem. Resultados representam as médias  $\pm$  erro padrão da média do total de leucócitos após 6 horas; n = 6-8 animais em cada grupo. Não houve diferença estatística entre os ratos tratados com RE e os ratos NT.

#### 4.6. Efeito do RE na histopatologia articular no modelo de osteoartrite da TLCA

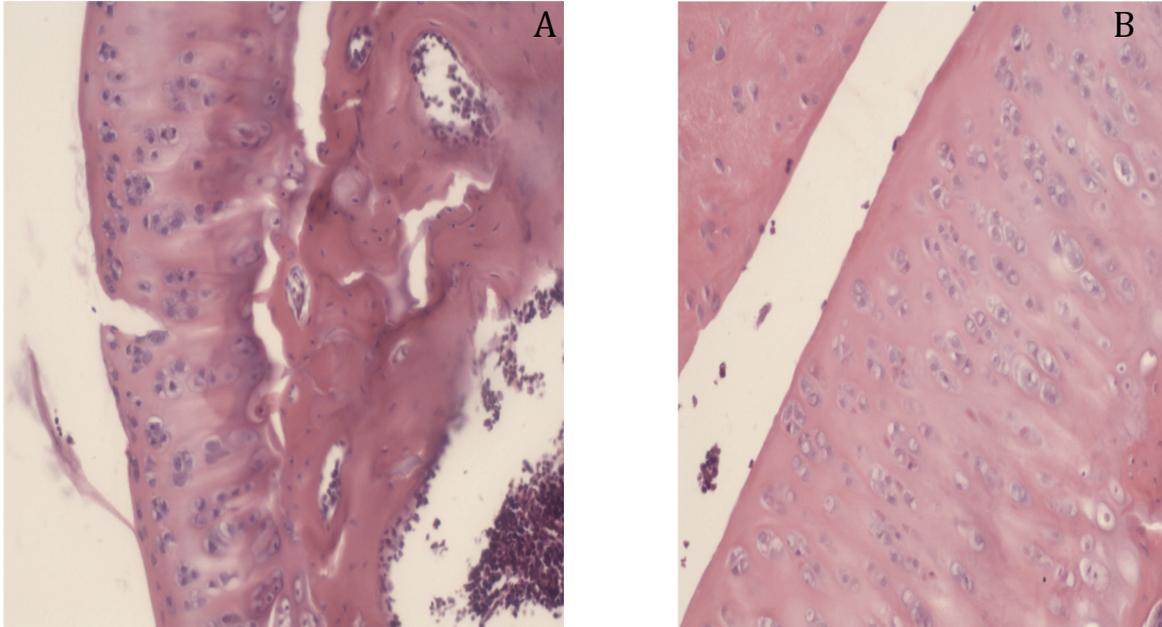
A tabela 1 mostra que os animais submetidos a TLCA, após 70 dias, apresentavam alterações histopatológicas graves, determinando um alto escore da OARSI e que a administração diária do RE diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) o dano articular. As Figuras 10A e 11A mostram fotografias representativas da aparência histopatológica de amostras do grupo submetido a TLCA e tratado com salina enquanto as figuras 10B e 11B são do grupo submetido a TLCA e tratado com 300 mg/kg/dia de RE, até o sacrifício após 70 dias. Pode-se notar a presença de uma fissura na cartilagem na figura 10A e uma diminuição da coloração pela safranina O na figura 11A, em contraste com a preservação da cartilagem e da coloração pela safranina O nas figuras 10B e 11B, respectivamente.

**Tabela 1 – Ranelato de estrôncio (RE) previne dano articular em um modelo de osteoartrite (OA)**

	<b>SHAM</b>	<b>OA</b>	<b>OA+RE</b>
<b>Grau</b>	<b>1(0-2)</b>	<b>3(2-5)</b>	<b>2(1-4)</b>
<b>Estágio</b>	<b>1(0-2)</b>	<b>4(4)</b>	<b>3(1-4)</b>
<b>Escore</b>	<b>1(1-2)</b>	<b>12(8-20)</b>	<b>6(1-12)*</b>

Os ratos foram submetidos a TLCA ou a um procedimento “sham. Os grupos receberam 300 mg/kg do RE (OA + RE), ou salina (OA), diariamente até o sacrifício, após 70 dias. As articulações do joelho foram retiradas e processadas para coloração pela hematoxilina-eosina e Safranina-O. A análise histopatológica às cegas foi realizada utilizando o sistema de grau e estágio da OARSI. Os resultados são expressos como medianas (variação). n = 6 animais / grupo . \*P < 0.05 comparado ao grupo OA (Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn).

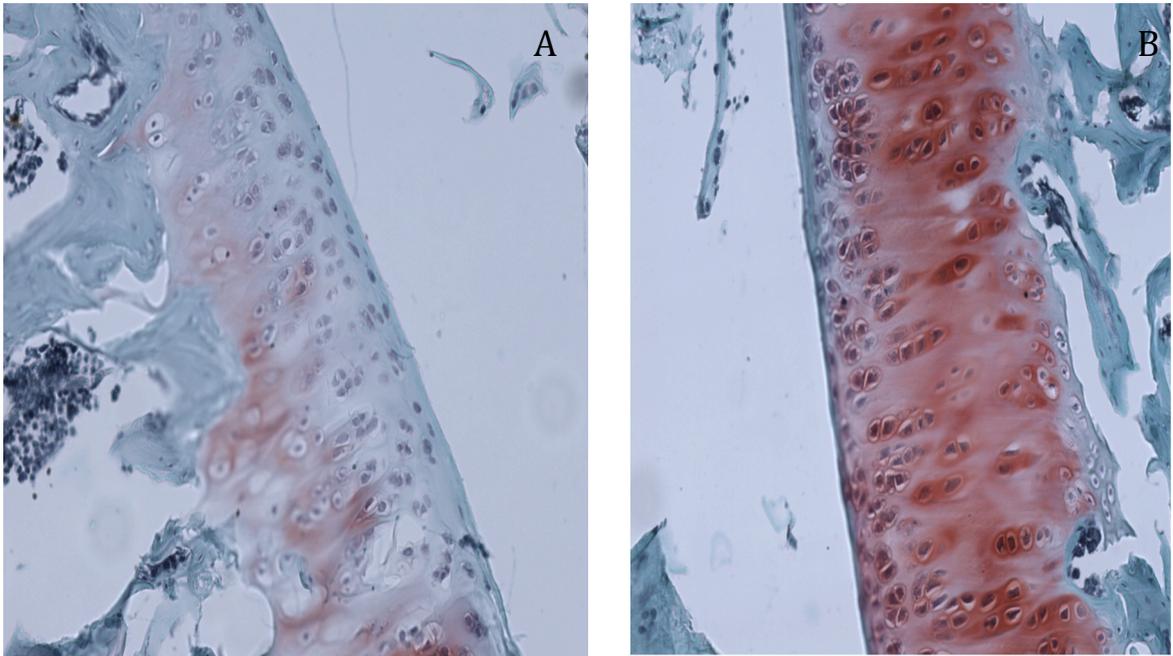
**Figura 10: Fotomicrografias de cartilagens coradas por H&E das articulações após 70 dias da TLCA.**



Animal não-tratado. (B) Animal tratado com RE (300 mg/kg/d). Aumento de 20X.

(A)

Figura 11: Fotomicrografias de cartilagens coradas pela Safranina O das articulações após 70 dias da TLCA.



(A) Animal não-tratado. (B) Animal tratado com RE (300 mg/kg/d). Aumento de 20X.

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que o RE reduziu a resposta hipernociceptiva em 2 modelos experimentais de artrite. Este efeito analgésico em modelos de artrite nunca tinha sido descrito anteriormente. O teste de incapacitação articular demonstrou ser altamente eficaz na avaliação da hipernocicepção em uma artrite de componente inflamatório intenso como a artrite por zymosan (ROCHA *et al.*, 1999). Entretanto, para análise da dor articular que se segue após a indução de um modelo de osteoartrite como o modelo da transecção do ligamento cruzado anterior, o teste eletrônico modificado de mensuração de pressão na pata do rato, também chamado de teste de von frey eletrônico, é mais adequado (LITTLE; ZAKI, 2012).

As doses citadas acima aparentam ser bem maiores que a dose preconizada em humanos de 2 g/dia. Entretanto os ratos tem uma absorção intestinal de estrôncio relativamente reduzida. De fato, para atingir uma concentração sérica semelhante a dos humanos recebendo 2 g/dia de RE, os ratos devem receber uma dose de 625 mg/kg/dia do medicamento (AMMANN, 2006). Como a dose de 300 mg / kg de RE demonstrou uma redução *in vivo* da liberação de citocinas em um modelo de artrite intensa ao mesmo tempo em que obteve um efeito analgésico, nós podemos postular que um efeito similar pode ocorrer com humanos recebendo 2 g / d para o tratamento da osteoporose

Estes resultados mostrando que o RE causa analgesia em 2 modelos diferentes de artrite sugerem que um mecanismo comum, possivelmente a inibição de citocinas, foi responsável por este efeito analgésico. De fato, a atividade anti-nociceptiva do RE esteve associada a diminuição da liberação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  nas articulações no nosso modelo da artrite por zymosan. Nós escolhemos o modelo de artrite induzida por zymosan para estudar o efeito do RE na liberação de citocinas devido ao fato dos níveis de citocina no modelo da TLCA terem sido indetectáveis (dados não mostrados).

Além de ter um papel chave na patogênese de artropatias inflamatórias como a artrite reumatoide e a OA, o TNF- $\alpha$  também foi capaz de promover hiperalgesia através da sensibilização de receptores dolorosos em modelos experimentais. Cunha *et al.* (1992) injetaram TNF- $\alpha$ , intra-plantar, nas patas traseiras dos ratos e observaram a intensidade da hiperalgesia através do teste de Randall-Selitto modificado. A injeção do TNF- $\alpha$  causou uma hiperalgesia dose-dependente que atingiu um platô após 2 a 3 horas da injeção. O tratamento local com indometacina, 30 minutos antes da injeção do TNF- $\alpha$ , diminuiu a resposta

hiperalgésica, mostrando que a dor foi mediada por produtos da ciclo-oxigenase induzidos pelo TNF- $\alpha$ .

Na prática clínica, os inibidores do TNF foram testados em ensaios clínicos randomizados com pacientes com AR a partir de 1999. O primeiro deles foi o infliximabe, um anticorpo monoclonal anti-TNF que demonstrou benefícios importantes em pacientes com artrite reumatóide não responsivos ao metotrexato. Desde então outros medicamentos anti-TNF surgiram e acabaram revolucionando o tratamento da artrite reumatoide, fornecendo importante validação aos estudos experimentais que mostraram o papel crucial do TNF na patogênese desta doença (THALAYASINGAM; ISAACS, 2011).

Na OA, o tratamento com medicamentos inibidores de TNF não está definido. Alguns estudos recentes sugerem que estes medicamentos possam vir a ter um papel na doença. Grunke e Schulze-Koops (2006) relataram um caso de um homem portador de OA bilateral dos joelhos que obteve melhora na dor e nas imagens de ressonância magnética com o adalimumabe, um anticorpo monoclonal anti-TNF. Um ensaio clínico randomizado em que pacientes com OA erosiva de mãos tratados com o adalimumab, um anticorpo monoclonal anti-TNF, acabou de ser publicado (VERBRUGGEN *et al.*, 2012). Os autores avaliaram se o medicamento seria capaz de diminuir a progressão radiológica da doença. Os resultados globais não mostraram diferença estatística entre os grupos. Entretanto, uma análise envolvendo apenas pacientes com edema palpável de interfalangianas, um subgrupo com mais chance de progressão da doença, demonstrou um benefício estatisticamente significativo com o uso do adalimumabe.

IL-1 $\beta$  é outra citocina pró-inflamatória com um papel hipernociceptivo bem estabelecido. Esta citocina é capaz de promover a quimiotaxia dos leucócitos, além de induzir febre e liberação de proteínas de fase aguda. A atividade hipernociceptiva da IL-1 $\beta$  é mediada através do aumento da liberação de prostaglandinas que promovem a sensibilização dos nociceptores (VERRI Jr *et al.*, 2006). Assim como o TNF- $\alpha$ , a injeção intra-plantar de IL-1 $\beta$  na pata do rato também causou hiperalgesia medida pelo teste de Randall-Selitto modificado. Da mesma forma, o pré-tratamento com indometacina aboliu esta resposta hipernociceptiva, confirmando a ação da IL-1 $\beta$  na ciclo-oxigenase com subsequente liberação de prostaglandinas (CUNHA *et al.*, 1992).

Baseado no exposto acima e na premissa que aIL-1 $\beta$  também estaria envolvida na patogênese da AR, foi desenvolvido o anakinra, um antagonista do receptor de IL-1. Este medicamento foi testado em pacientes com AR através de ensaios clínicos randomizados

com resultados positivos, ainda que considerados inferiores aos dos inibidores de TNF, que garantiram sua aprovação para o tratamento da doença (MERTENS; SINGH, 2009).

Na OA, assim como os anti-TNF, o anakinra também foi testado, e também sem conclusões definitivas. Bacconnier, Jorgensen e Fabre (2009) trataram 3 mulheres pós-menopáusicas com osteoartrite erosiva das mãos com a dose subcutânea padrão do anakinra de 100 mg/dia. Após 3 meses as pacientes apresentaram melhora no parâmetros de dor e função. Infelizmente, um ensaio clínico randomizado do anakinra em pacientes com OA de joelho não mostrou benefício do medicamento (CHEVALIER *et al.*, 2009). Neste estudo foi feita uma única injeção intra-articular do anakinra, no lugar da administração padrão. Este receio de se usar um medicamento sistêmico com efeitos adversos potencialmente graves em uma doença articular localizada é compreensível, porém resta saber se esta forma de administração de uma droga com meia-vida curta (em torno de 4 horas) seria adequada.

Enquanto IL-1 $\beta$  promove a liberação de prostaglandinas como exposto acima, IL-8 tem ação hipernociceptiva inflamatória dependente da liberação de aminas simpáticas para sensibilização dos nociceptores. Este dado é exemplificado pelo fato do efeito hipernociceptivo de IL-8 ser inibido por antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos, e não por inibidores da ciclo-oxigenase (VERRI Jr. *et al.*, 2006). Como os ratos não expressam IL-8, acredita-se que CINC-1 é a molécula equivalente a IL-8 no rato. Estudos mostraram que ambas se ligam ao mesmo receptor CXCR2, com o soro humano anti-IL-8 antagonizando os efeitos de CINC-1 e vice-versa. Portanto, CINC-1 é uma quimiocina inflamatória que tem a função de promover a liberação de aminas simpáticas no rato (VERRI Jr. *et al.*, 2006). Não foi observado um efeito do RE na liberação articular de CINC-1 no nosso estudo, sugerindo que o efeito anti-nociceptivo do RE não é mediado pela inibição desta citocina. Como IL-8/CINC-1 é uma importante quimiocina quimiotática para neutrófilos, podemos postular que a ineficácia do RE em inibir a migração celular observada no nosso estudo possa estar relacionada a sua inabilidade em inibir a liberação de CINC-1 nas articulações inflamadas.

O RE reduz a atividade osteoclástica ao causar danos ao seu citoesqueleto e promove a apoptose dos osteoclastos enquanto estimula a diferenciação dos pré-osteoblastos e a replicação dos osteoblastos (MARIE, 2010). Este efeito em osteoclastos sugere que o RE também possa ter efeito em macrófagos conforme discutido na introdução desta dissertação. Tanto os macrófagos sinoviais, ou sinoviócitos tipo A, hiperplasiados como os macrófagos que se instalam na membrana sinovial provenientes de monócitos circulantes, vão ter papel crucial na patogênese das artropatias inflamatórias. Os macrófagos são o principal tipo celular constituinte da membrana sinovial inflamada (BRENISHAN, 1992), e importante fonte

secretora de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (SZEKANECZ; KOCH, 2007). No nosso estudo o RE diminuiu significativamente a liberação de citocinas mensuradas após 6 horas de artrite, ao mesmo tempo em que não diminuiu o influxo celular agudo. Portanto, podemos especular que o RE afetou a ativação de células residentes da sinóvia, possivelmente macrófagos, e consequentemente reduziu a produção de citocinas que ocorre na artrite por zymosan.

Bruyere *et al.* (2008) sugeriram que o RE pode reduzir a dor lombar em mulheres com osteoporose e OA da coluna lombar concomitantes. Eles realizaram uma análise *post-hoc* dos dados agrupados dos estudos Spinal Osteoporosis Therapeutic Intervention (SOTI) e Treatment Of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) realizados em 1105 mulheres com osteoporose e OA radiológica vertebral concomitantes. Os pacientes do grupo do RE obtiveram uma melhora da dor lombar estatisticamente significativa ao final de 3 anos de tratamento, conforme discutido anteriormente. Baseado no papel de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na dor que acompanha a OA (KAPOOR *et al.*, 2011), conforme discutido na introdução desta dissertação, podemos nos indagar se este efeito analgésico também se deveu a uma inibição de citocinas pró-inflamatórias como observado em nosso modelo experimental.

Bruyere *et al.* (2008) também encontraram uma diminuição da progressão radiológica na OA espinhal com o RE sugerindo uma possível ação modificadora da doença. Recentemente, os resultados de um ensaio clínico placebo-controlado, randomizado e duplo-cego avaliando a eficácia e segurança do RE na OA de joelhos foram liberados, embora apenas na forma de resumo (REGINSTER *et al.*, 2012). De acordo com os autores, o RE teve papel modificador do curso da doença, acompanhado por melhora dos sintomas. De acordo com estes pressupostos, nosso estudo demonstrou que ratos submetidos a TLCA que receberam RE diário obtiveram uma melhora nos achados histopatológicos na fase crônica (70 dias). Trata-se do primeiro relato mostrando que o RE altera o dano estrutural em um modelo de osteoartrite. Como não existe até este momento, droga comprovadamente modificadora da evolução da doença na OA (HOCHBERG *et al.*, 2012), este dado tem especial relevância.

## 6. CONCLUSÕES

1. O Ranelato de estrôncio foi capaz de inibir a hiperalgesia provocada por dois modelos experimentais diferentes de artrite: os modelos de artrite por zymosan e da transecção do ligamento cruzado anterior.
2. O ranelato de estrôncio promoveu a inibição da liberação articular das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no modelo de artrite por zymosan. Este mecanismo possivelmente mediou o efeito analgésico encontrado.
3. O Ranelato de estrôncio parece ter efeito protetor do dano articular em um modelo experimental de osteoartrite. Este efeito levanta a possibilidade de que o RE possa ter um efeito estrutural modificador da doença na osteoartrite.

## REFERÊNCIAS

- ALTMAN, R. 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.**, v. 29, n. 8, p. 1039-1049, 1986.
- AMEYE, L.G.; YOUNG, M.F. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the “Holy Grail”. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 18, n. 5, p. 537–547, 2006.
- AMMAAN, P. Strontium ranelate: a physiological approach for an improved bone quality. **Bone**, v. 38, n. 2, supl. 1, p. 15-18, 2006.
- ASQUITH, D.L. *et al.* Animal models of rheumatoid arthritis. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, n. 8, p. 2040-2044, 2009.
- BACCONNIER, I.; JORGENSEN, C.; FABRE, S. Erosive osteoarthritis of the hand: clinical experience with anakinra. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 68, n.6, p. 1078-1079, 2009.
- BENITO, M. J. *et al.* Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 64, n. 9, p. 1263-1267, 2005.
- BRANDT, K.D. Non-surgical treatment of osteoarthritis: a half century of "advances". **Ann. Rheum. Dis.**, v. 63, n. 2, p. 117-122, 2004.
- BRESNIHAN, B. The synovial lining cells in chronic arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, v. 31, n. 7, p. 433-435, 1992.
- BROOKS, P.M. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 14, n. 5, p. 573-577, 2002.
- BRUYERE, O. *et al.* Effects of strontium ranelate on spinal osteoarthritis progression. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 67, n. 3, p. 335-339, 2008.
- CANALIS, E. *et al.* The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. **Bone**, v. 18, n. 6, p. 517–523, 1996.
- CARVALHO, A.P. *et al.* Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of risedronate in experimental pain models in rats and mice. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 33, n. 7, p. 601-606, 2006.
- CASTRO, R. R. *et al.* A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis – a evidence of a role for nitric oxide. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, n. 8, p. 769-776, 2006.
- CHEVALIER, M. *et al.* Intra-articular Injection of Anakinra in Osteoarthritis of the Knee: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. **Arthritis Rheum.**, v. 61, n. 3, p. 344-352, 2009.

COSTA, L.; MAJOR, P.P. Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases. **Nat. Clin. Pract. Oncol.**, v. 6, n. 3, p. 163-174, 2009.

CROFFORD, L.J. COX-2 in synovial tissues. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 7, n. 4, p. 406-408, 1999.

CUNHA, F. Q. *et al.* The pivotal role of tumour necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

DAVIS, M. *et al.* Correlates of knee pain among US adults with and without radiographic knee osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, v. 19, n. 12, p. 1943-1949, 1992.

DE LANGE-BROKAAR, B. J. *et al.* Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 20, n. 12, p. 1484-1499, 2012.

DIEPPE, P. *et al.* The Bristol 'OA500 study': progression and impact of the disease after 8 years. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, n. 2, p. 63-68, 2000.

EGG, D. Concentrations of prostaglandin D2, E2, F2 alpha, 6-keto-F1 alpha and thromboxane B2 in synovial fluid from patients with inflammatory joint disorders and osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, v. 43, n. 2, p. 89-96, 1984.

FELSON, D. T. *et al.* The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. **Ann. Intern. Med.**, v. 134, n. 7, p. 541-549, 2001.

FELSON, D. T. The sources of pain in knee osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 17, n. 5, p. 624-628, 2005.

GEGOUT, P.; GILLET, P.; CHEVRIER, D. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sci.**, v. 55, n. 17, p. 321-326, 1994.

GILMAN, S.C. *et al.* Interleukin-1 activates phospholipase A2 in human synovial cells. **Arthritis Rheum.**, v. 31, n. 1, p. 126-130, 1988.

GRUBB, B. D. Activation of sensory neurons in the arthritic joints. **Novartis Found Symp.**, v. 260, p. 28-36, 2004.

GRUNKE, M.; SCHULZE-KOOPS, H. Successful treatment of inflammatory knee osteoarthritis with tumour necrosis factor blockade. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 65, n. 4, p. 55-56, 2006.

GUERRERO, A.T. *et al.* Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 84, n. 2, p. 244-251, 2006.

HAYAMI, T. *et al.* The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis; reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. **Arthritis Rheum.**, v. 5. n. 4, p. 1193-1206, 2004.

HAYAMI, T. *et al.* Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in rat anterior cruciate ligament transections and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone**, v. 38, n. 2, p. 234-243, 2006.

HOCHBERG, M. C. *et al.* Epidemiologic associations of pain in osteoarthritis of the knee: data from the National Health and Nutrition Examination Survey and the National Health and Nutrition Examination-I Epidemiologic Follow-up Survey. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 18, n. 4, suppl. 2, p. 4-9, 1989.

HOCHBERG, M.C. *et al.* American College of Rheumatology 2012 Recommendations for the Use of Nonpharmacologic and Pharmacologic Therapies in Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. **Arthritis Care Res. (Hoboken)**, v. 64, n. 4, p. 455-474, 2012.

KAPOOR, M. *et al.* Role of pro-inflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 7, n. 1, p. 33-42, 2011.

KIDD, B.L.; URBAN, L.A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 87, p. 3-11, 2001.

LANE, N.E. *et al.* Progression of hip osteoarthritis over eight years in a community sample of elderly white women. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 5, p. 1477-1486, 2004.

LITTLE, C. B.; ZAKI, S. What constitutes an "animal model of osteoarthritis"--the need for consensus? **Osteoarthritis Cartilage**, v. 20, n. 4, p. 261-267, 2012.

MARIE, P.J. Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v.18, Suppl. 1, p. S11-15, 2006.

MARIE, P.J. Strontium ranelate in osteoporosis and beyond: identifying molecular targets in bone cell biology. **Mol. Interv.**, v. 10, n. 5, p. 305-312, 2010.

MARTEL-PELLETIER, J. Pathophysiology of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 12, suppl.2, p.31-33, 2004.

McINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 6, p. 429-442, 2007.

MERTENS, M.; SINGH, J.A. Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. **J. Rheumatol.**, v. 36, n. 6, p. 1118-1125, 2009.

MEUNIER, P. J. *et al.* The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 5, p. 459-468, 2004.

MYERS, S. L. *et al.* Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. **J. Rheumatol.**, v. 17, n. 12, p. 1662-1669, 1990.

REGINSTER, J.Y. *et al.* Strontium ranelate reduces the risk of non vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, n. 5, p. 2816–2822, 2005.

REGINSTER, J. Y. *et al.* Structure modifying effects of strontium ranelate in knee osteoarthritis. **Osteoporos Int.**, v. 23, supl. 2, p. 58, 2012.

ROCHA, F. A. *et al.* Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm. Res.**, v. 48. n. 9, p. 485–490, 1999.

ROCHA, J. C. S. *et al.* Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 588-596, 2002

RUSSEL, G. Pathogenesis of osteoporosis. In: HOCHBERG, M. *et al.* **Rheumatology**. Philadelphia: Elsevier, 2003. p. 2075-2080.

SHARMA, L.; KAPOOR, D.; ISSA, S. Epidemiology of osteoarthritis: an update. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 18, n. 2, p. 147-156, 2006.

SILVA Jr, F.S.; ROCHA, F. A. Zymosan induced arthritis in rats--mechanisms involved in hypernociception and cartilage lyses. **Acta Reumatol. Port.**, v. 31, n. 2, p. 143-149, 2006.

SILVA Jr, F.S. *et al.* Combined glucosamine and chondroitin sulfate provides functional and structural benefit in the anterior cruciate ligament transection model. **Clin. Rheumatol.**, v. 28, n. 2, p.109-117, 2009.

SOWERS, M. R.; KARVONEN-GUTIERREZ, C. A. The evolving role of obesity in knee osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 22, n. 5, p. 533-537, 2010

STOOP, R. *et al.* Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 9, n. 4, p. 308-315, 2001.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A.E. Macrophages and their products in rheumatoid arthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 19, n. 3, p. 289-295, 2007.

TAKAYASHI, N. *et al.* S12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, n. 6, p. 1082–1087, 2003.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, 2000.

THALAYASINGAM, N.; ISAACS, J. D. Anti-TNF therapy. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 25, n. 4, p. 549-567, 2011.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S.H. Rat knee-joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, n. 3, p. 421-427, 1992.

VERRI Jr, W.A. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacol. Ther.**, v.112, n. 1, p. 116–138, 2006.

VERBRUGGEN, G. *et al.* Tumour necrosis factor blockade for the treatment of erosive osteoarthritis of the interphalangeal finger joints: a double blind, randomised trial on structure modification. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 71, n. 6, p. 891-898, 2012.

VIVANCOS, G. G. *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, n.3, p.391-399, 2004.

ZHANG, Y.; JORDAN, J.M. Epidemiology of osteoarthritis. **Clin. Geriatr. Med.**, v. 26, n. 3, p. 355-369, 2010.