

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA POR ZYMOZAN NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DEPENDE DA INIBIÇÃO DO COMPONENTE SIMPÁTICO DA DOR.

Alves SM, Abreu SC, Bezerra MM, Cristino-Filho G, Chaves HV

As desordens nas articulações temporomandibulares (ATMs) estão associadas com altos níveis de dor inflamatória podendo acarretar incapacidade. Ranelato de estrôncio (Ran), uma droga já utilizada no tratamento da osteoporose possui um efeito combinado, pois além de estimular a formação do osso ele atua inibindo a reabsorção óssea. Embora o completo mecanismo de ação do Ran não esteja totalmente elucidado, há evidências de seu efeito analgésico. Portanto, investigamos a eficácia do Ran na hipernocicepção inflamatória induzida por Zymosan na ATM de ratos e avaliamos o possível papel da TNF- α , IL-1 β , e da atividade da via hemeoxigenase-1 (HO-1). Métodos: Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil (54/2012), e todos os esforços foram utilizados para diminuir o sofrimento dos animais. Ratos machos Wistar (180-220g) foram pré-tratados por via oral com Ran (0,5, 5 ou 50 mg/kg) ou salina, 60 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan (2 mg, 40 μ L) na ATM esq. O teste de Von Frey foi utilizado para avaliar hipernocicepção (g) na 4^a h após a injeção de Zy. 6h após a injeção de Zy foi realizado a coleta do lavado sinovial para contagem total de leucócitos e medição da atividade de mieloperoxidase (MPO); a ATM foi retirada para análise histopatológica (H & E); o tecido periarticular e o gânglio trigeminal foram retirados para dosagem dos níveis de TNF- α e IL-1 β pelo método (ELISA). Para efetuar imunohistoquímica, seções histológicas de ATM foram submetidas aos clones anti-TNF- α e anti-IL-1 β utilizando o método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Em outra série de experimentos os animais foram tratados com ZnPP-IX (3 mg / kg), um inibidor específico da HO-1, antes do Ran (0,5 mg / kg). Em outro momento Ran foi administrado antes do Zy, e 30 minutos antes da eutanásia, o corante azul de evans (5 mg / kg, iv) foi administrado para avaliar o extravasamento de plasma. Resultados: Ran (0,5, 5 ou 50 mg / kg) aumentou ($P > 0,05$) o limiar mecânico de retirada da cabeça, quando comparado com o grupo Zy. No entanto, Ran não foi capaz de reduzir a contagem de leucócitos, a atividade da MPO, o extravasamento de Azul de Evans e a imunomarcção para TNF- α e IL-1 β . ZnPP-IX não mudou eficácia anti-nociceptiva Ran. No entanto, o tratamento com Ran não foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IL-1 β /TNF α no tecido periarticular, além dos níveis de IL-1 β do gânglio trigeminal, entretanto, o tratamento com Ran foi capaz de diminuir significativamente os níveis de TNF- α no gânglio trigeminal quando

comparado com o grupo de Zy. Conclusões: Ran reduz hipernocicepção na ATM induzida por Zymosan em ratos independentemente de IL-1 β e da via HO-1 e que esse efeito parece depender do componente simpático da dor, representando uma potente indicação terapêutica para a condição dolorosa na ATM.

Palavras-chave: articulação temporomandibular; hipernocicepção; zymosan; ranelato de estrôncio.

1 Introdução

Apesar do notável progresso na compreensão da fisiopatologia das alterações da articulação temporomandibular (ATM) nas últimas três décadas, a literatura ainda carece de maiores esclarecimentos, o que dificulta o diagnóstico e tratamento farmacológico. Ranelato de estrôncio (Ran) {~ 5- [bis (carboxi-metil) amino] -2-carboxi-4-ciano-3-tiofen-acético ácido distrontium sal} é um composto com dois átomos de estrôncio estáveis e ácido ranélico que representa um novo paradigma para o tratamento da osteoporose (Cianferotti *et al.* de 2013). Ran possui mecanismo de ação combinado, pois além de estimular a formação do osso, age inibindo a reabsorção óssea (Reginster *et al.*, 2003). O tratamento oral com Ran foi capaz de diminuir o risco de fraturas vertebrais no colo do fêmur em mulheres pós-menopáusicas com osteoporose (Reginster *et al.*, 2003). Embora o mecanismo de ação do Ran não esteja totalmente elucidado, há evidências de que possui efeito analgésico (Karsdal *et al.*, 2013). Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar a eficácia anti-nociceptiva e anti-inflamatória inexplorada do Ran no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan na ATM de ratos.

2. Materiais e Métodos

Ratos Wistar machos (160-220 g) (n = 60) foram alojados em gaiolas plásticas padrão, com comida e água ad libitum. Eles foram mantidos numa sala com temperatura controlada (23 \pm 2o C) com um ciclo claro-escuro de 12/12-horas. Este estudo foi conduzido com a aprovação do Comitê de ética da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil Ética (CEPA no. 54/12). Os ratos foram anestesiados com o anestésico inalatório isoflurano e receberam uma injeção intra-articular (i.art.) de Zymosan (2 mg / 40 mL) dissolvida em soro fisiológico estéril. O grupo Sham recebeu apenas salina i.art. Na 4^a hora após a indução, a hipernocicepção foi registrada através do comportamento de retirada da cabeça do animal (head-withdrawal threshold) em resposta à aplicação de uma força (g) de intensidade crescente à articulação temporomandibular (ATM) (CHAVES *et al.*, 2011). Na 6^a hora após a injeção de zymosan, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 10 % (0,1 mL/100 g) e eutanasiados por exsanguinação. Foi realizado a coleta do lavado sinovial para contagem total de leucócitos e medição da atividade de mieloperoxidase

(MPO); a ATM foi retirada para análise histopatológica (H & E); o tecido periarticular e o gânglio trigeminal foram retirados para dosagem dos níveis de TNF- α e IL-1 β pelo método (ELISA). Para efetuar imunohistoquímica, seções histológicas de ATM foram submetidas aos clones anti-TNF- α e anti-IL-1 β utilizando o método da estreptavidina-biotina-peroxidase.

Ran (0,5 mg / kg) foi administrado 1 h antes do Zy, e 30 minutos antes da eutanásia, Azul de Evans (5 mg / kg, iv) foi administrado para avaliar o extravasamento do plasma. Imediatamente após a extração, os tecidos periarticulares foram pesados e colocados em 2 mL de formaldeído durante 12h. O sobrenadante (100 mL) foi extraído, e a absorbância a 440nm foi determinada no espectrofotômetro. A concentração foi determinada por comparação com uma curva padrão de quantidades conhecidas de corante azul de Evans na solução de extração, que foi avaliado no mesmo ensaio. A quantidade de corante azul de Evans (ug) foi, então, calculado por mL de exsudado (Kwan et al., 1996).

O ranelato de estrôncio (Ran) (Protos® 2g, Les Laboratoires Servier Industrie, 45 520 Gidy, França) (0,5, 5 ou 50 mg / kg) foi injetado (per os) 1 h antes da injeção de zymosan. A fim de evitar qualquer alteração no perfil farmacocinético do Ran, a comida foi removida 1 h antes do tratamento. Grupo Zymosan consistiu em ratos que receberam (per os) veículo Ran (0,9% de solução salina estéril) 1h antes i.art zymosan. Para validar os dados, um grupo de controle positivo foi pré-tratado (s.c.) com indometacina (5 mg / kg) 1 hora antes da injeção de zymosan. Grupo Sham recebeu (per os e i.art.) 0,9% de solução salina estéril.

Para analisar o possível efeito da via HO-1 na eficácia anti-nociceptiva do ranelato de estrôncio neste modelo, outra série de experimentos foi realizada. Os animais foram pré-tratados (s.c.) com ZnPP-IX (3 mg / kg), um inibidor específico da HO-1, seguido de uma injeção (por via oral) de Rran (0,5 mg / kg) 30 minutos mais tarde. Após 1 h, zymosan (2 mg) foi injetado (i.art.).

Os dados são apresentados como a média \pm S.E.M. ou medianas, quando apropriado. As diferenças entre as médias foram comparadas usando um one-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparar medianas. Um valor de probabilidade de $P < 0,05$ indicaram diferenças significativas.

3. Resultados e Discussões

Neste trabalho, nós demonstramos o efeito anti-nociceptivo do ranelato de estrôncio (Ran) no modelo de ATM induzida por zymosan na hipernocicepção inflamatória em ratos. Encontramos

evidências de que o efeito anti-nociceptivo do Ran na hipernocicepção inflamatória induzida por Zymosan na ATM é independente de IL-1 β e da atividade da via HO-1, sendo dependente da via simpática da dor.

A injeção intra-articular (i.art.) zymosan (Zy) (2mg) resultou na hipernocicepção inflamatória conforme medido por uma diminuição clara do limiar mecânico de retirada da cabeça na 4h após Zy. Além disso, a injeção de zymosan resultou em um aumento significativo no número de polimorfonucleares. Este aumento no número de neutrófilos foi certificado pelo aumento da atividade de MPO no lavado sinovial da ATM após a injeção de zymosan. Estas alterações foram confirmadas pelo extravasamento plasmático que ocorreu na ATM, através do corante azul de Evans. Nos animais que receberam soro fisiológico intra-articulares (Sham) não houve mudanças significativas no limiar mecânico de retirada da cabeça, contagem de polimorfonucleares ou atividade da MPO. Ranelato de Estrôncio (Ram) (0,5, 5 ou 50 mg / kg) injetado (per os) 1 h antes da injeção de zymosan aumentou os limiares nociceptivos ($P < 0,05$). No entanto, Ran falhou na diminuição do número de polimorfonucleares, a atividade de MPO e extravasamento plasmático pelo corante azul de evans no lavado sinovial.

Para investigar o papel da atividade da via HO-1 no efeito antinociceptivo do Ran, os animais foram pré-tratados (s.c.) com ZnPP-IX (3 mg / kg), um inibidor específico da via HO-1. Os efeitos do Ran (0,5 mg / kg) sobre a ATM na hipernocicepção inflamatória induzida por zymosan não foram alterados na presença de ZnPP-IX (3 mg / kg).

A injeção intra-articular (i.art.) 2 mg de zymosan, resultou num aumento significativo nos níveis de IL-1 β /TNF α no tecido periarticular e gânglio trigeminal. O tratamento Ran não foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IL-1 β /TNF α no tecido periarticular, além dos níveis de IL-1 β do gânglio trigeminal. No entanto, o tratamento com Ran foi capaz de diminuir significativamente os níveis de TNF- α no gânglio trigeminal quando comparado com o grupo de zymosan.

Na 6^ah após a indução da hipernocicepção inflamatória por zymosan na ATM, um influxo de células inflamatórias pode ser observado na membrana sinovial em comparação com o grupo Sham. Os tipos de células eram predominantemente neutrófilos, que caracterizaram a inflamação aguda. O edema também foi observado na membrana sinovial. Observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) nos parâmetros inflamatórios no grupo Zymosan quando comparados ao grupo sham. A Tabela 1 mostra ainda os valores entre os grupos Ran (0,5, 5 ou 50 mg/kg) e zymosan. Ran (0,5, 5 ou 50 mg/kg) não reduziu os parâmetros inflamatórios. Além disso, o pré-tratamento com ZnPP-IX

(3 mg/kg) não alterou os efeitos do Ran (0,5 mg/kg), sobre a análise histopatológica da ATM (H&E).

A análise imunohistoquímica para IL-1 β e TNF- α mostrou uma forte imunomarcção para IL-1 β e TNF- α de sinoviócitos e neutrófilos que foi caracterizado por células de cor castanha na membrana sinovial da ATM após indução da hipernocicepção inflamatória por zymosan. O grupo tratado com Ran (0,5 mg/kg) também mostrou expressão tanto para TNF- α quanto para IL-1 β . O grupo controle negativo foi composto pelas ATMs que não foram tratados com os anticorpos anti-TNF- α e anti-IL-1 β . Nenhum dos controles negativos mostraram imunorreatividade para TNF- α e IL-1 β .

Avaliando análise histopatológica da ATM após zymosan, encontramos um afluxo de células inflamatórias na membrana sinovial, o tecido periarticular, o tecido músculo-esquelético, e da espessura na membrana sinovial. O tratamento com Ran não foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios para um estado normal. Da mesma forma, foi recentemente demonstrado que o tratamento com Ran não teve efeito em reduzir a grave sinovite na análise histológica em cães (Pelletier *et al.*, 2012).

4. Conclusões

Em resumo, embora o exato mecanismo da ação de Ran permaneça relativamente fugaz, este estudo fornece novas informações sobre o efeito antinociceptivo desta droga na hipernocicepção inflamatória induzido por zymosan. De fato a eficácia Ran neste modelo não depende de IL-1 β e da atividade da via HO-1.

5. Referências

Akutsu, M., Ogura, N., Ito, K., Kawashima, M., Kishida, T., Kondoh, T. (2013). Effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on macrophage inflammatory protein-3 α production in synovial fibroblast-like cells from human temporomandibular joints. *J Oral Pathol Med* **42**,491–498.

Alcaraz, M.J., Fernández, P., Guillén, M.I. (2003). Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des* **9**,2541–2551.

Alexandersen, P., Karsdal, M.A., Qvist, P., et al. (2007). Strontium ranelate reduces the urinary level of cartilage degradation biomarker CTX-II in postmenopausal women. *Bone* **40**,218–22.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Sobral, 19 de setembro de 2014

DECLARAÇÃO

Declaro junto à Comissão dos IX Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA que a aluna **Sheila Moreira Alves** está sob minha orientação junto ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Ceará-UFC desenvolvendo o projeto intitulado: **EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA HIPERNOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA POR ZYMOSAN NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR DEPENDE DA INIBIÇÃO DO COMPONENTE SIMPÁTICO DA DOR.**

Profª Drª Hellíada Vasconcelos Chaves
Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Orientadora