

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Morfologia

PAPEL DAS ENZIMAS-CONVERSoras DE ANGIOTENSINA
NA OSTEOARTRITE DE JOELHO EM RATOS

Grazielle Cordeiro Aguiar

Belo Horizonte
2014

GRAZIELLE CORDEIRO AGUIAR

**PAPEL DAS ENZIMAS-CONVERSoras DE ANGIOTENSINA
NA OSTEOARTRITE DE JOELHO EM RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Belo Horizonte
2014

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Biologia Cardíaca (Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG) com colaborações dos Laboratórios de Imunofarmacologia (Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG) e Protozooses (Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG) e contou com o auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria e discernimento concedidos pelo seu Santo Espírito;

Aos meus pais, Lindinalva e Anelito, por todo apoio e amor durante a caminhada;

Aos meus irmãos, Suellen e Guilherme, e cunhados, Maicon e Rosimary pela paciência e pelos momentos de alegria de nossa vivência;

Ao meu orientador, professor Anderson José Ferreira, por ter acreditado em mim, pela inteligente lapidação que realizou no meu projeto e pelos ensinamentos que eu pude adquirir com a convivência;

Aos professores Mauro Martins Teixeira e Flávio Almeida Amaral, pelo apoio técnico-científico obtido em seu laboratório;

Ao professor Marcelo Vidigal Caliari pelo auxílio na análise morfométrica do meu trabalho.

Aos professores Hélio Chiarini-Garcia e Fernanda Radicchi pela gentileza em permitir que eu fizesse o uso do sistema de captura de imagens de seu laboratório.

A professora Paula Luciana Scalzo pela amizade e pela ajuda no processo de seleção inicial;

A todos os demais professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular que contribuíram para minha formação;

A Aline Fortunato, pelo exemplo de vida, e por todas as nossas conversas, algumas foram de grande importância na realização do meu projeto;

Aos amigos do laboratório, Marilda, Letícia, Vanessa, Patrícia, Fernanda, Danielle, Giselle, Julliane, Bárbara, Larissa, Tatiane, Marcos, Paulo, Gonzaga, Héder, pela amizade e por terem me ajudado de diferentes formas, contribuindo para a realização do meu projeto;

Aos colegas de outros laboratórios, Daiane Boff, Isabela Galvão, Aline Copola, pelas contribuições dadas;

À secretaria e ao corpo administrativo do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular.

Às fundações CNPq e FAPEMIG;

Meus sinceros agradecimentos.

“Todo aquele que está seriamente comprometido com o cultivo da ciência chega a convencer-se de que, em todas as leis do universo, está manifesto um espírito infinitamente superior ao homem, e diante do qual, nós com nossos poderes devemos sentir-nos humildes.”

Albert Einstein

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar o papel das enzimas-conversoras de angiotensina (ECAs) na osteoartrite (OA) de joelho. Para tal, primeiramente, foi realizada a padronização do modelo de OA - induzida com monoiodoaceto de sódio (MIA) em ratos, quanto aos parâmetros inflamatórios e histopatológicos. Para induzir a OA foi feita uma única injeção intra-articular no joelho esquerdo de 2mg de MIA dissolvido em salina estéril (~50µL). Os animais controles (CTL) receberam apenas uma injeção de salina. As medidas de hiperalgesia e edema de joelho foram realizadas antes e após os tempos de 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias. Foram utilizados 8 animais em cada tempo de avaliação, sendo 4 animais CTL e 4 animais MIA. Nesses tempos os animais foram eutanasiados e foi realizado o lavado articular, utilizado para a verificação da cinética de migração celular e análise de citocinas. O joelho foi retirado para processamento histopatológico. O papel das ECAs foi avaliado após 28 dias de indução da OA, utilizando os seguintes tratamentos por 8 semanas (n=7 por grupo): Salina, Captopril [inibidor da ECA (iECA), 30mg/kg/dia], Losartan [bloqueador do receptor AT₁, 30mg/kg/dia], Aceturato de diminazeno (DIZE) (ativador da ECA2), 1mg/kg/dia] ou [Captopril, 30mg/kg/dia + L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase), 15mg/kg/dia]. Os mesmos parâmetros avaliados na padronização do modelo foram utilizados nos grupos de tratamento, acrescentando a mensuração da pressão arterial média (PAM) e imunohistoquímica para IL-10 e TNF- α . Os resultados da padronização mostraram que a hiperalgesia foi significativamente maior nos animais MIA em todos os tempos de medição (6h - 28 dias). A cinética de migração celular evidenciou que o pico de leucócitos ocorre no tempo de 72h, sendo o macrófago a principal célula responsável por esse pico. A diferença significativa dos macrófagos manteve-se em todos os tempos avaliados, exceto na medida de 21 dias. Já os neutrófilos tiveram o pico no tempo de 24h, sendo que nesse tempo também houve um aumento significativo no nível de IL-10. Observamos diferença estatisticamente significativa em relação ao CTL nos tempos de 12h e 24h no que se refere ao edema de joelho. Também no tempo de 12h ocorreu o pico de IL-6. A perda de proteoglicanos iniciou a partir do 7º dia, mas foi a partir do 14º dia que ela se tornou significativa ficando ainda maior nas avaliações dos dias 21 e 28 pós-indução. A avaliação do tecido de granulação presente entre o osso subcondral e a cartilagem mostrou que a alteração na celularidade inicia-se com 72 horas, mas apenas no

tempo de 21 dias que se torna significativa. Não houve correlação entre o infiltrado inflamatório no osso e na cartilagem e a perda de proteoglicanos. Além disso, na avaliação das alterações morfológicas da cartilagem observou-se desorientação dos condrons, formação de *clusters* e atrofia de condrócitos a partir do dia 14 e de fissuras verticais e hipocelularidade a partir do dia 21. No dia 28 todas estas alterações encontram-se mais pronunciadas. Com relação à avaliação das ECAs na OA, os resultados mostraram que o Captopril e o Losartan foram capazes de reduzir de forma significativa o número de leucócitos totais e macrófagos na cavidade articular do joelho dos animais MIA. Além disso, o efeito do Captopril foi parcialmente bloqueado pelo L-NAME. Também houve aumento da área marcada para IL-10 na cartilagem dos animais controle tratados com Captopril. Por último, o iECA promoveu um pequeno efeito condroprotetor na cartilagem. Já o perfil inflamatório dos animais MIA tratados com DIZE não alterou significativamente, sendo o resultado similar ao dos animais tratados com salina. O tratamento com DIZE reduziu a intensidade de marcação de IL-10 e TNF- α na cartilagem, sinóvia e osso subcondral dos animais MIA. Entretanto, o uso do ativador da ECA2 não impediu a perda de cartilagem nos animais MIA. Na avaliação histopatológica após 12 semanas de indução da OA foi visto que as alterações osteoartríticas foram muito pronunciadas, uma vez que havia grande perda de cartilagem e de proteoglicanos, com deformação do osso subcondral e presença de tecido fibrocartilagenoso na articulação. Houve uma tendência de redução da PAM nos animais MIA, mesmo quando tratados com salina. Concluindo, a inibição da ECA possui efeito anti-inflamatório na OA de joelho e um pequeno efeito condroprotetor. Esses resultados foram, possivelmente, limitados pela dose de MIA usada para induzir a OA e pelo longo tempo pós-indução da OA para o início dos tratamentos.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the role of angiotensin-converting enzymes (ACEs) in osteoarthritis (OA) of the knee. Firstly, the standardization of the OA model by sodium monoiodoacetate (MIA) in rats, in relation to inflammatory and pathological parameters, was performed. Male Wistar rats (n=4 per group) were submitted to intra articular injection of 2mg (~50 μ L) of MIA in the knee joint in order to induce OA. Control animals were injected with saline alone (~50 μ L). Paw hyperalgesia and swelling of the knee before and after the intervals of 6, 12, 24, 48 and 72 hours and 7, 14, 21 and 28 days were evaluated. After these periods, the animals were euthanized and the knee joint lavage was performed and used to analyze the kinetics of cell migration and cytokines. Also, the knee was collected for histological analysis. The role of the ACEs was evaluated 28 days after induction of OA using the following orally treatment for 8 weeks (n=7): saline; Captopril [ACE inhibitor, 30mg/kg/day]; Losartan [AT1 receptors antagonist, 30mg/kg/day]; [Diminazene aceturate (DIZE) (ACE2 activator, 1mg/kg/day) or [Captopril, 30mg/kg/day + L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor), 15mg/kg/day]. The parameters evaluated in the treatment groups were similar to those performed in the standardization protocol added to the measurement of mean arterial pressure (MAP) and immunohistochemistry for IL-10 and TNF- α . The results of the standardization of the experimental model showed that the hyperalgesia was significantly higher in MIA animals at all times points (6 hours to 28 days). The kinetics of cell migration revealed that the leukocyte peak occurred at the time of 72 hours and the macrophage was the main cell responsible for this peak. This difference remained at all times evaluated, except to 21 days. Neutrophils peak happened at 24h and, in this time point, there was also a significant increase in the level of IL-10. It was observed that the swelling of the knee occurred at the time of 12h and 24h and the peak of IL-6 happened at the time of 12h. The loss of proteoglycans started in the 7th day, becoming more significant in the days 14, 21 and 28 post-induction. The evaluation of the granulation tissue present between the subchondral bone and cartilage showed that the change in the cellularity began at 72 hours, but only at the time of 21 days it is statistically different. No significant correlation was viewed between the inflammatory infiltrate in the bone and cartilage and the loss of proteoglycans. Furthermore, the evaluation of the morphological changes in the cartilage revealed disorientation of condrons, clustering and

atrophy of chondrocytes starting at the day 14 and vertical fissures and hypocellularity starting at the day 21. On the day 28, all these changes were more pronounced. Regarding to the role of the ACEs in OA, the results showed that Captopril and Losartan were able to significantly reduce the number of total leukocytes and macrophages in the knee joint cavity of the MIA animals. Also, the effect of Captopril was partially blocked by L-NAME. There was a marked increase in the area of IL-10 labeling in the cartilage of control animals treated with Captopril. In addition, ACE inhibition led to a small chondroprotective effect in cartilage. However, the inflammatory profile of the DIZE treated MIA animals did not change significantly. Treatment with DIZE reduced the intensity staining of IL-10 and TNF- α in the cartilage, subchondral bone and synovium of MIA rats. Nevertheless, the ACE2 activator did not preserve the cartilage of MIA animals. After 12 weeks of the induction of OA, the histopathological analysis showed that the osteoarthritic changes were more pronounced with great loss of cartilage and proteoglycans, deformation of the subchondral bone and presence of fibrocartilaginous tissue in the joint. There was a trend of reduction in MAP in MIA animals, even when treated with saline. In conclusion, inhibition of ACE has anti-inflammatory effects in the knee of OA rats, as well as a small chondroprotective effect. Likely, these results were limited by the dose of MIA used to induce OA and by the duration of the post-induction period before the evaluation of the parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do Sistema Renina Angiotensina.....	19
Figura 2 - Representação esquemática, mostrando as estratégias terapêuticas para modular a atividade do SRA.....	21
Figura 3 - Desenho esquemático das alterações osteoartísticas em uma articulação.....	22
Figura 4 - Fatores de risco para susceptibilidade de desenvolvimento da OA.....	24
Figura 5 - Desenho esquemático das zonas da cartilagem (A) e Corte histológico representativo (B).....	29
Figura 6 - Fluxograma ilustrando desenho do estudo.....	34
Figura 7 - Representação da técnica de indução da OA em joelho de ratos.....	35
Figura 8 - Representação esquemática dos protocolos de experimentação animal. (A) Padronização do modelo e (B) tratamentos realizados.....	36
Figura 9 - Ilustração do procedimento de avaliação da hiperalgesia.....	37
Figura 10 - Ilustração do procedimento de avaliação do edema de joelho.....	38
Figura 11 - Hiperalgesia em ratos pós-indução da OA	45
Figura 12 - Diâmetro do joelho de ratos pós-indução da OA.....	45
Figura 13 - Cinética de migração celular pós-indução da OA	46
Figura 14 - Níveis de IL-10 (A) e IL-6 (B), determinados a partir do lavado articular, pós-indução da OA.....	47
Figura 15 - Progressão da perda de proteoglicanos na cartilagem hialina pós-indução da OA.....	49
Figura 16 - Fotomicrografias representativas de cartilagem hialina corados com azul de Toluidina.....	50
Figura 17 - Fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas nos animais MIA até 28 dias após a indução.....	51
Figura 18 - Fotomicrografias representativas as áreas de análise do infiltrado inflamatório.....	52
Figura 19 - Infiltrado celular pós-indução da OA com MIA.....	52
Figura 20 - Fotomicrografias representando diferenças nas alterações osteoartísticas em região com infiltrado inflamatório.....	53

Figura 21 - Pressão arterial media (PAM) durante 8 semanas de tratamento com drogas moduladoras do SRA.....	55
Figura 22 - Hiperalgesia após 8 semanas de tratamentos.....	56
Figura 23 - Diâmetro do joelho após 8 semanas de tratamentos.....	57
Figura 24 - Perfil Inflamatório após 8 semanas de tratamentos.....	58
Figura 25 - Fotomicrografias representativas de cartilagem e osso subcondral em preparação imunohistoquímica para IL-10.....	61
Figura 26 - Fotomicrografias representativas de cartilagem e osso subcondral em preparação imunohistoquímica para TNF- α	62
Figura 27 - Fotomicrografias representativas da sinóvia em preparação imunohistoquímica para IL-10.....	63
Figura 28 - Fotomicrografias representativas da sinóvia em preparação imunohistoquímica para TNF- α	64
Figura 29 - Avaliação da percentagem de área marcada (A e E) e da intensidade de marcação (B, C, D, F, G e H) de IL-10 e TNF- α após 8 semanas de tratamentos.....	66
Figura 30 - Área de tecido cartilaginoso sobre a tíbia pós-tratamentos.....	66
Figura 31 - Alterações degenerativas na cartilagem após 12 semanas de indução da OA.....	68
Figura 32 - Extensão da erosão da cartilagem hialina sobre a tíbia após 8 semanas de tratamentos.....	69
Figura 33 - Presença de proteoglicanos evidenciada pela marcação com azul de Toluidina. (A) Comparação entre os grupos após 8 semanas dos tratamentos.....	70
Figura 34 - Cartilagem hialina articular em processo de calcificação.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tratamentos, concentrações das drogas e via de administração.....	37
Tabela 2 – Níveis de IL-10, IL-1 β e TNF α determinados a partir do lavado articular usando o ELISA.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang I – Angiotensina I

Ang II – Angiotensina II

AR – Artrite reumatoide

BRA - Bloqueador do receptor AT₁

BSA – Bovine serum albumin

CAP – Captopril

CEBIO – Centro de Bioterismo

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CTL – Controle

DCP – Desigualdade no comprimento da perna

DIZE – Aceturato de diminazeno

DO – Densidade óptica

ECA – Enzima conversora da angiotensina

ELISA – Enzyme-linked immuno sorbent assay

GAG – Glicosaminoglicano

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

ieCA – inibidores da enzima conversora de angiotensina

IL – Interleucinas

L-NAME – N ω -nitro-L-Arginina metil éster hidrocloreto

LOS – Losartan

MEC – Matriz extracelular

MIA – Monoiodoacetato de sódio

MMP – Metaloproteinases

OA – Osteoartrite

ON – Óxido nítrico

OPD – o-fenilendiamina dihidroclorido

PAM – Pressão arterial média

PBS – Salina tamponada com fosfato (phosphate-buffered saline)

SAL – Salina

SEM – Erro padrão da média

SRA – Sistema renina angiotensina

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Sistema Renina Angiotensina (SRA)	18
1.2 Osteoartrite	22
1.2.1 Modelos Experimentais de Osteoartrite de Joelho	27
1.3 Caracterização da cartilagem hialina articular	28
2 JUSTIFICATIVA	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Animais.....	34
4.2 Indução da OA no joelho	35
4.3 Grupos experimentais	35
4.4 Avaliação da hiperalgesia	37
4.5 Avaliação de edema	38
4.6 Cinética de migração celular - perfil inflamatório	38
4.7 Quantificação de citocinas	39
4.8 Mensuração da pressão arterial média.....	40
4.9 Avaliação das alterações histopatológicas	40
4.9.3 Reação imunohistoquímica	41
4.9.4 Avaliação morfológica	42
4.10 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS	44
5.1 Padronização do modelo de OA - Parâmetros inflamatórios	44
5.2 Padronização do modelo de OA – Parâmetros histopatológicos.....	47
5.3 Pressão arterial média durante os diversos tratamentos	53
5.4 Efeitos dos tratamentos no processo inflamatório.....	56
5.5 Histopatologia pós-tratamentos.....	66
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Renina Angiotensina (SRA)

Há mais de um século Robert Tigerstedt e Bergman começaram a elucidar o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) e ainda hoje pesquisas sobre o SRA permanecem fortes (Zhuo & Li, 2011). Além de ser primordial na regulação da pressão arterial e na homeostase dos eletrólitos, ele também interfere em vias metabólicas relacionadas à inflamação e ao crescimento e desenvolvimento tecidual (Kalupahana & Moustaid-Moussa, 2012; Garcia et al, 2010).

A ativação do SRA começa com a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I) pela renina (Figura 1). A enzima conversora da angiotensina (ECA) converte Ang I, que é um decapeptídeo inativo, em angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo ativo, cujas ações são mediadas pelos receptores AT1 e AT2 (Paul et al, 2006; Ferreira et al, 2011). Esses receptores apresentam algumas similaridades, mas os genes codificadores, suas localizações e funções são diferentes (Paul et al, 2006). A ativação do AT1 induz a vasoconstrição, fibrose, proliferação e hipertrofia celular e retenção de fluido. Já a ativação do AT2 induz a efeitos contra regulatórios ao do AT1 (Ferreira et al, 2011). O peptídeo Ang II também pode ser substrato da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), produzindo a angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], a qual se liga ao receptor Mas promovendo vários efeitos, como, por exemplo, vasodilatação, anti-fibrose, anti-hipertrofia e anti-inflamação (Cat & Touyz, 2011; Ferreira et al, 2012).

O SRA possui ações locais em diversos tecidos corporais de forma específica, desempenhando um papel importante na mediação da inflamação, angiogênese, proliferação e morte celular (Garcia et al, 2010; Cat & Touyz, 2011). Essas ações são mediadas, principalmente, pela Ang II no receptor AT1 (Figura 1). Essa é reconhecida como uma molécula pró-inflamatória (Ferreira et al, 2011) em razão de sua ativação dependente do receptor de NF- κ B, um fator de transcrição envolvido em vários processos inflamatórios (Ruiz-Ortega et al, 2000). A ação local do SRA pode ocorrer de forma independente do SRA circulante, podendo ser ativado tanto em situações em que o SRA circulante é normal quanto em situações em que é suprimido (Cat & Touyz, 2011). A ampla distribuição dos componentes do SRA e seus aspectos funcionais no corpo têm sido intensamente investigados (Garcia et al, 2010; Cat & Touyz, 2011). SRA locais têm sido identificados em sistemas orgânicos, como o digestório, respiratório, nervoso, reprodutor

masculino e feminino, linfático, tegumentar, adiposo, e também em órgãos como coração, rins, osso e sinóvia do joelho (Çobankara et al, 2005; Paul et al, 2006; Pattacini et al, 2007; Garcia et al, 2010; Cat & Touyz, 2011; Zhuo & Li, 2011; Kalupahana & Moustaid-Moussa, 2012).

A recém-descoberta de outros peptídeos ativos do SRA, como a Ang-(1-7) que possui efeitos contra regulatórios aos produzidos pela Ang II, sugere que o equilíbrio do SRA depende do balanço entre seus componentes (Cat & Touyz, 2011; Ferreira et al, 2012). Além disso, alguns componentes do SRA, bem definidos anteriormente quanto à suas funções, estão em redefinição. Por exemplo, a renina que além de ser a protease responsável pela clivagem do angiotensionogênio ela também pode se ligar, de forma específica, em receptores de renina gerando efeitos similares ao da Ang II (Cat & Touyz, 2011). Diversas drogas utilizadas na clínica têm como alvos componentes do SRA,

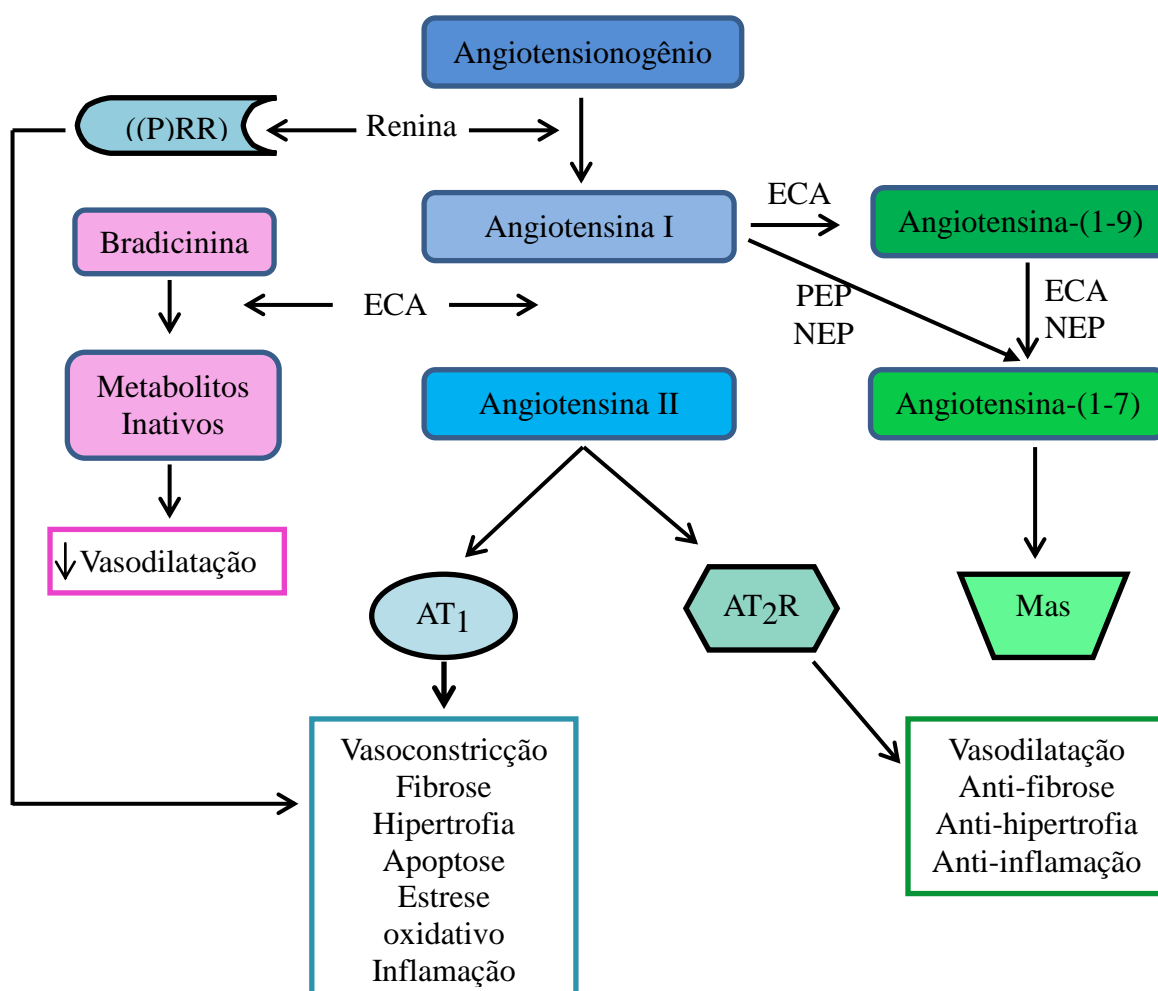


Figura 1: Representação esquemática do Sistema renina-angiotensina. (P)RR), receptores (pro)renina; ECA, enzima conversora de angiotensina; NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolyl endopeptidase; AT1R, receptor tipo 1 da Ang II; AT2R, receptor tipo 2 da Ang II; Mas, receptor da Ang-(1-7). Fonte: Adaptado de Cat & Touyz, 2011.

modulando suas ações. O Captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA), foi o primeiro agente bioquímico utilizado para modular o SRA (Figura 2). Sua ação leva ao bloqueio da ECA com conseqüente redução na produção de Ang II (Norris et al, 2009). Já foi evidenciado que a redução na formação da Ang II pelos iECAs tem diversos efeitos benéficos, destacando-se a diminuição da pressão arterial e ação antioxidante (Dandona et al, 2007; Bian et al, 2010), além de efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos (Martin et al, 1984; Tikiz et al, 2005; Flammer et al, 2008; Peters et al, 2009; Männistö et al, 2001; Järveläinen et al, 2009). Essas ações são benéficas na recuperação cardíaca pós-infarto, fibrose hepática e renal e na remodelação e cicatrização óssea (Cruz et al, 2000; Ramos et al, 1994; Garcia et al, 2010; Kma et al, 2012). Entretanto, o uso dos iECAs traz um efeito colateral que é o aumento de bradicinina na árvore brônquica (Norris et al, 2009).

Outra classe importante de drogas baseadas no SRA é composta pelos bloqueadores do receptor AT1 (BRAs) (Norris et al, 2009). O resultado deste bloqueio é a menor ativação do eixo vasoconstrictor do SRA (Price et al, 2007). O Losartan foi o primeiro dessa classe disponível comercialmente (Norris et al, 2009). Além dos efeitos cardiovasculares, o Losartan também possui efeito anti-fibrótico, sendo esse já evidenciado no fígado, pulmão, rins, pâncreas, coração e musculatura estriada esquelética (Yoshiji et al, 2001; Liu et al, 2008; Podowski et al, 2012; Guerrot et al, 2012; Arnold et al, 2012; Teekakirikul et al, 2010; Burks et al, 2011).

Nos últimos anos tem sido demonstrado que a estimulação do eixo vasodilator do SRA pode ser uma estratégia viável para a modulação deste sistema. A ativação da ECA2 leva ao aumento da produção de Ang-(1-7) e concomitante degradação da Ang II, resultando em vários efeitos regulatórios. Por exemplo, a utilização de ativadores da ECA2 em modelos animais leva a uma diminuição da pressão intraocular (Foureaux et al, 2013) e redução do dano cerebral pós isquemia (Mecca et al, 2011). O uso de análogos da Ang-(1-7) causam vários efeitos benéficos em diferentes modelos patológicos, como a modulação de parâmetros inflamatórios em modelo de artrite induzida por antígeno (Silveira et al, 2010), redução do estresse oxidativo e atenuação da apoptose neuronal em cérebros de ratos hipertensos (Jiang et al, 2013) e restauração do microambiente gástrico e modulação de vias de estresse em ratos com lesão gástrica induzida pelo frio (Zhu et al, 2013). Além disso, parte dos efeitos benéficos dos iECAs e dos BRAs podem ser mediados pelo aumento dos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) (Ishiyama et al, 2004; Coutinho et al, 2013).

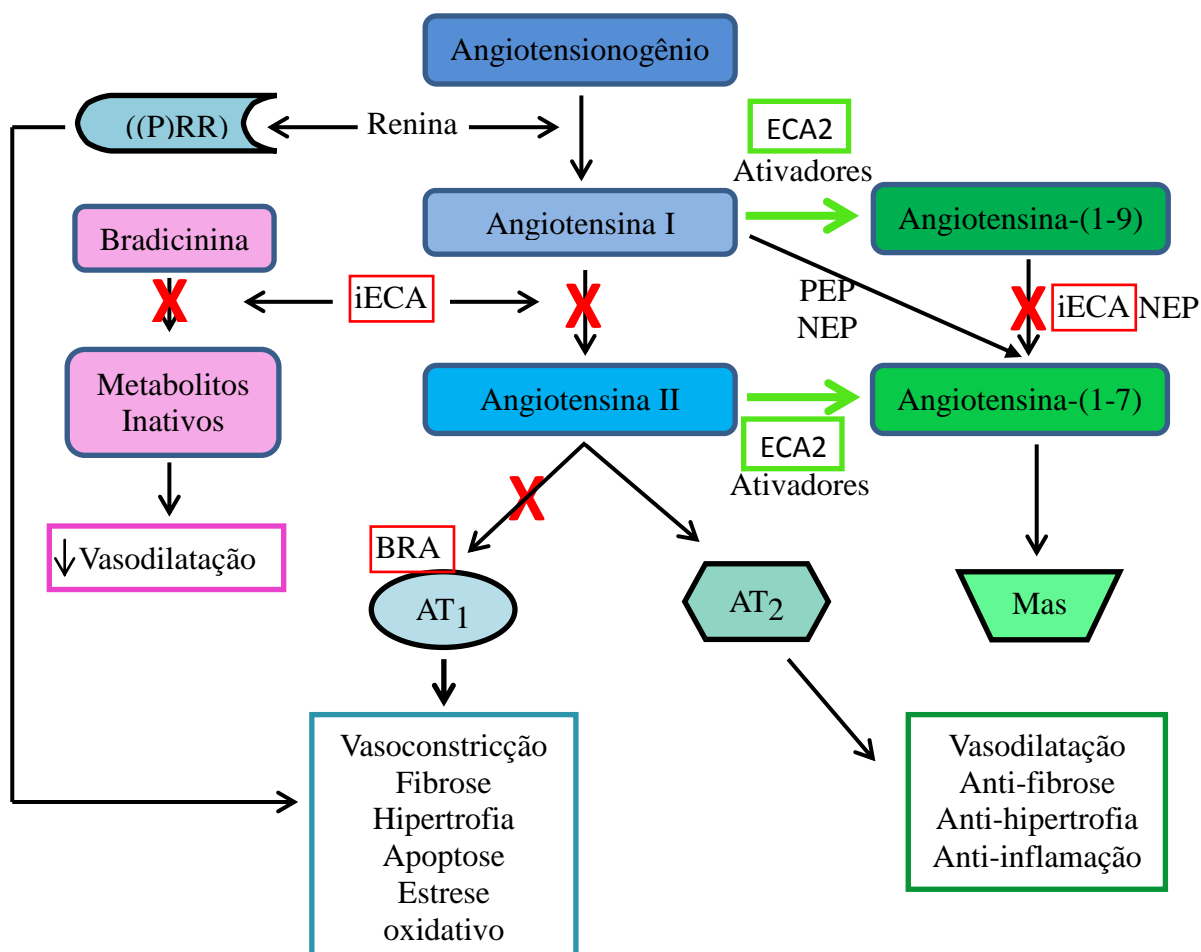


Figura 2: Representação esquemática, mostrando as estratégias terapêuticas para modular a atividade do SRA. (P)RR), receptores (pro)renina; iECA, inibidores da enzima conversora de angiotensina; NEP, endopeptidase neutra; PEP, prolyl endopeptidase; BRAs, bloqueadores do receptor AT1; AT1R, receptor tipo 1 da Ang II; AT2R, receptor tipo 2 da Ang II; Mas, receptor da Ang-(1-7). Fonte: Adaptado de Cat & Touyz, 2011.

1.2 Osteoartrite

A osteoartrite (OA), antes denominada como osteoartrose, é a forma mais comum de artrite (Felson, 2000; Lawrence et al, 2008). Ela é caracterizada por degeneração crônica do tecido cartilaginoso hialino, inflamação local, remodelação do osso subcondral, formação de osteófito e de cisto subcondral, além de enfraquecimento dos músculos periarticulares (Pereira et al, 2011; Litwic et al, 2013; Berenbaum, 2013) (Figura 3). A maioria das articulações que podem desenvolver OA são sinoviais. De forma geral, as articulações mais comumente afetadas são quadril, joelho e mão (Felson, 2000; Lawrence, 2008). Pode acometer mais de uma articulação, mas sua manifestação não é sistêmica. A dor, a rigidez articular e a limitação ao movimento são os sintomas mais significativos da doença e estão associados ao processo de lesão articular permanente e ao surgimento de incapacidade, sobretudo em idosos (Puett & Griffin, 1994; Jordan et al, 2003; Litwic et al, 2013). Com o envelhecimento da população mundial, é de extrema importância a compreensão sobre a patogênese e os fatores ligados à progressão da OA, pois descobertas nessa linha ajudam na definição de diretrizes de enfrentamento da doença, que podem resultar em uma melhora na qualidade de vida para os pacientes (Symmons et al, 2000; Pelletier et al, 2001; WHO, 2004; Zhang & Jordan, 2010).

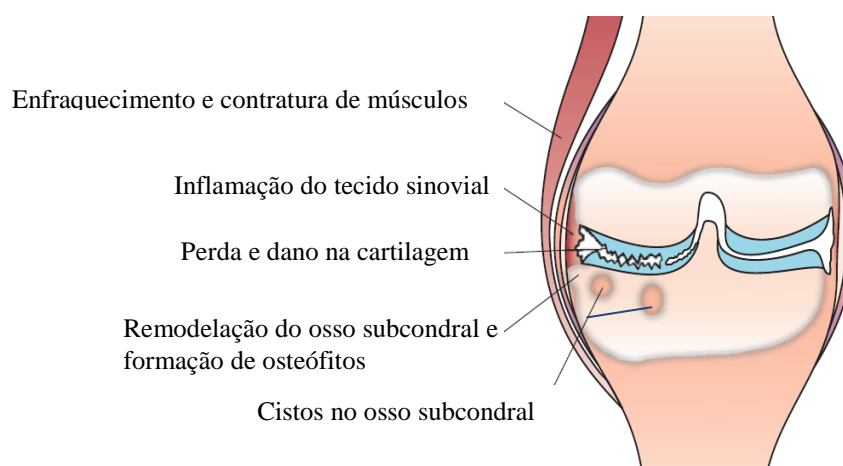


Figura 3: Desenho esquemático das alterações osteoártríticas em uma articulação.
Adaptado de Bijlsma et al, 2011

A OA é considerada a principal causa de dor e incapacidade em idosos, sendo uma das principais causas de redução da expectativa de vida devido à incapacidade (March & Bagga 2004; Michaud et al, 2006; Losina et al, 2011). Além disso, a OA gera gastos onerosos para o sistema de saúde, atribuídos principalmente ao uso de medicamentos para

o controle do quadro algico e a realização da artroplastia do quadril e do joelho (Bitton, 2009; Losina et al, 2009). No Brasil, não há estudos epidemiológicos de grande amplitude que mostre o impacto da OA na sociedade, mas o Ministério da Saúde aponta que as doenças reumáticas já afetam aproximadamente 12 milhões de brasileiros e constituiu a segunda causa de gastos em benefícios de auxílio-saúde concedidos à população em 2008 (Brasil, 2011). Além disso, o Brasil está entre os 10 países com a maior população idosa do mundo e projeta-se um salto dos 1,6 milhões de pessoas com 80 anos de idade ou mais no ano 2000 para 13,8 milhões de pessoas em 2050 (Brasil, 2008).

A Organização Mundial de Saúde estima que no mundo haja 9,6% dos homens e 18% das mulheres acima de 60 anos com OA (WHO, 2013). A alta prevalência da OA é atribuída, principalmente, ao envelhecimento e ao aumento da prevalência da obesidade da população (Neogi & Zhang, 2013). Entretanto, a prevalência da OA pode ser bem variável, dependendo da definição utilizada, idade, sexo e área geográfica estudada (Litwic et al, 2013). De forma geral, as articulações mais comumente afetadas são quadril, joelho e mão (Lawrence et al, 2008), apesar da análise epidemiológica por sexo revelar que os homens tem OA com maior frequência na coluna e quadril e as mulheres no joelho e mãos (Felson, 2000; Neogi & Zhang, 2013).

A OA é uma doença multifatorial (Neogi & Zhang, 2013), uma interação complexa de fatores genéticos, metabólicos, bioquímicos e biomecânicos seguida pela ativação da resposta inflamatória que leva à degeneração crônica do tecido cartilaginoso (Haseeb & Haqqi, 2013). Em outras palavras, a OA é uma manifestação fenotípica de uma série de diferentes vias que levam ao desenvolvimento da doença (Figura 4). Fatores pessoais e fatores articulares específicos podem aumentar a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, mas a interação entre eles ainda não é bem compreendida (Neogi & Zhang, 2013). Dentre esses fatores, o peso corporal elevado e a idade são os mais fortemente associados ao desenvolvimento e a progressão da OA de joelho (Cecil, 2005; Grotle et al, 2008). Entretanto, não é incomum o diagnóstico de OA em pacientes com menos de 45 anos (Murphy et al, 2008). Danos no tecido cartilaginoso por um único evento de trauma ou microtraumas repetidos devido à sobrecarga mecânica na articulação são tidos como causas mais prováveis para os pacientes sem uma forte predisposição genética (Haseeb & Haqqi, 2013).

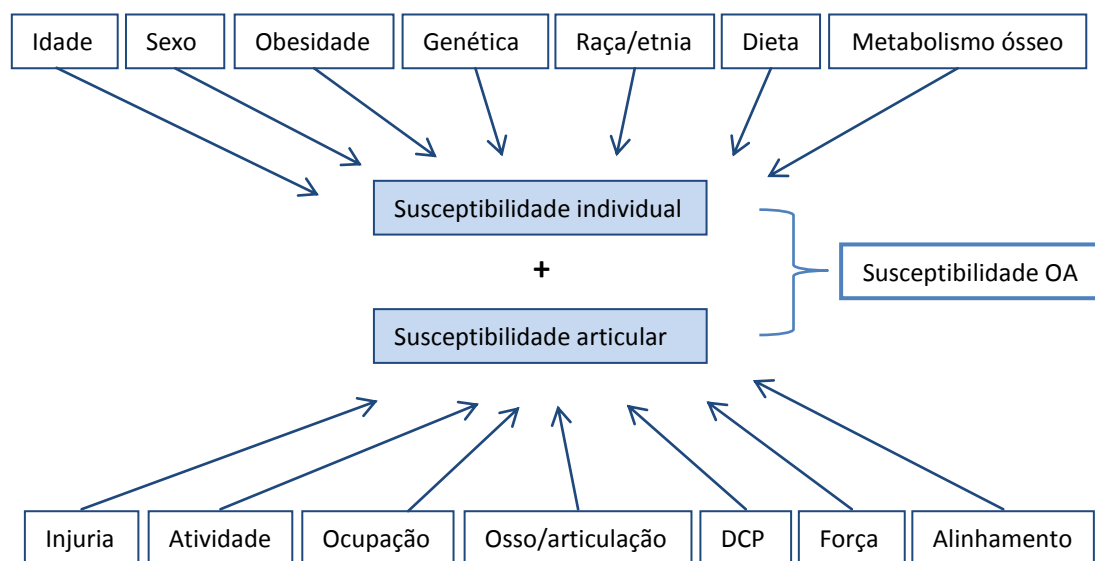


Figura 4: Fatores de risco para susceptibilidade de desenvolvimento da OA. DCP, desigualdade no comprimento da perna. Fonte: Adaptado de Neogi & Zhang, 2013.

A sequência das alterações patológicas na OA pode variar de acordo com a etiologia da doença. Por exemplo, em lesões traumáticas, como lesão do ligamento cruzado anterior, tem-se a inflamação articular aguda seguida por sinovite e destruição da cartilagem e alterações ósseas. Já em um indivíduo obeso, a alteração primária pode ser a formação óssea aumentada, seguida pela destruição articular e sinovite (Loeser, 2009). A resposta inicial do tecido cartilaginoso aos estresses físico e químico é a proliferação dos condrócitos e maior atividade metabólica desses (Dijkgraaf et al, 1995; Krasnokutsky et al, 2007; Loeser, 2009). Os condrócitos aumentam a síntese dos componentes da matriz extracelular (MEC), dos proteoglicanos e dos colágenos. Entretanto, a síntese e a atividade de proteases, como as metaloproteínas de matriz (MMPs) e as colagenases, sobressaem sobre a tentativa de reparação celular, ocorrendo, assim, depleção dos proteoglicanos e clivagem das fibras colágenas (Dijkgraaf et al, 1995). A perda da capacidade de manter a homeostase pelos condrócitos é o que dá início ao estado patológico da cartilagem (Loeser, 2005; Ströbel et al, 2010). A intensa ação das proteases é estimulada, principalmente, pelas citocinas pró-inflamatórias (Abramson & Krasnokutsky, 2006). Assim, a manutenção do quadro inflamatório contribui para a degradação progressiva do tecido cartilaginoso (Dean & Sansom, 2000; Ströbel et al, 2010).

Das citocinas envolvidas na patogênese da OA, a interleucina (IL)-1 β e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são tidos como os principais responsáveis pelas alterações na

homeostase da cartilagem, no sentido de estimular o catabolismo e a degeneração desse tecido (Haseeb & Haqqi, 2013). O aumento dessas citocinas estimula a produção de outros mediadores, tais como as interleucinas IL-6 e IL-8 e óxido nítrico (ON), bem como o aumento da expressão das MMPs 1, 3 e 13 e inibição da expressão do colágeno tipo II (Haseeb & Haqqi, 2013; Pelletier et al, 2001). A dosagem desses mediadores inflamatórios e de marcadores da degradação da cartilagem, como a proteína oligomérica da matriz cartilaginosa (COMP), telopeptídeos C-terminal do colágeno tipo II (CTX-II) e ácido hialurônico tem propiciado o acompanhamento mais preciso de terapêuticas e da progressão da OA em estudos clínicos e experimentais, tendo em vista as limitações temporais do exame radiográfico para acompanhar a evolução das alterações da OA (Gordon et al, 2008, Abramson & Krasnokutsky, 2006; Kraus et al, 2010; Attur et al 2013).

A inflamação é uma resposta protetora do corpo, associada ao processo de cura e reparação tecidual (Medzhitov, 2008). Entretanto, a superprodução de citocinas em resposta ao estímulo flogogênico pode trazer danos ao organismo (Takeuchi & Akira, 2010). No caso das doenças crônicas, a inflamação é causada por uma grande variedade de condições adversas que alteram a homeostase entre mediadores pró e anti-inflamatórios (Medzhitov, 2008). O consenso para a utilização do sufixo *ite* em osteoartrite no lugar do sufixo *ose* (osteoartrose) ocorreu após a compreensão de que o componente inflamatório da doença é determinante para a degradação da matriz cartilaginosa (Berenbaum, 2013; Loeser, 2009). No entanto, a cartilagem danificada não produz uma resposta inflamatória convencional, pois o tecido é desprovido de vascularização e inervação. A complexa resposta inflamatória da OA começou a ser entendida com a identificação de vários mediadores inflamatórios, como as interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-7 e IL-8, o TNF- α , o óxido nítrico (ON) e prostaglandinas nas articulações afetadas (Berenbaum, 2013; Katz et al, 2010; Pelletier et al, 2001). Estes mediadores estão envolvidos com o processo de dor e degeneração da cartilagem e podem ter origens diferentes, podendo ser produzidos pelos próprios condrócitos, pelos sinoviócitos, bem como pelos osteócitos do osso subcondral (Berenbaum, 2013). Além desses tipos celulares, há de se ressaltar o papel dos leucócitos na OA, especialmente os macrófagos. Eles são considerados a principal célula responsável pela produção de citocinas na OA (Haseeb & Haqqi, 2012). As diferentes fontes e o tipo de mediador podem interferir no fenótipo da doença (Berenbaum, 2013).

A sinovite é caracterizada por hiperplasia do revestimento sinovial, infiltrado de macrófagos e linfócitos, neoangiogênese e fibrose (Scanzello, 2012). Destaca-se a ativação

dos macrófagos no processo de inflamação da sinóvia, pois eles medeiam o processo de angiogênese e de dor na OA (Berenbaum, 2013). A sinovite está presente em um terço dos pacientes que avançam para cirurgia de substituição do joelho. Contudo, mesmo em estágios iniciais da OA a sinovite pode estar presente e ela relaciona-se com a gravidade das lesões na progressão da doença (Loeser, 2009). Há diferentes hipóteses para explicar a sinovite na OA, sendo que a mais aceita é que catabólitos provenientes da degradação da matriz cartilaginosa, além de sua convencional renovação, estimulam os sinoviócitos a produzir mediadores inflamatórios, desencadeando um ciclo de retroalimentação de inflamação-degeneração (Berenbaum, 2013).

Sendo a cartilagem desprovida de inervação, muitas vezes é necessário que o dano articular esteja em um estágio avançado, com comprometimento de estruturas periarticulares, para que o sintoma álgico venha a ser percebido pelo indivíduo (Loeser, 2009). No entanto, alguns indivíduos experimentam dor significativa com subsequente comprometimento da qualidade de vida mesmo antes da OA ter progredido o suficiente para produzir alterações radiográficas (Chan & Wu, 2012). Isso acontece porque a experiência da dor não é simplesmente uma resposta às mudanças estruturais, outros fatores, como os aspectos psicológicos, também desempenham um importante papel na sua percepção (Litwic et al, 2013).

Um problema importante que surge da relação entre OA e o envelhecimento é a presença de comorbidades, que é a existência de dois ou mais problemas de saúde em uma pessoa (Chan & Wu, 2012). Doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial sistêmica (HAS), doença arterial coronariana, diabetes mellitus e doença renal crônica são comumente encontradas em pacientes idosos com OA, sendo a HAS a mais prevalente (Singh et al, 2002; White, 2009). Não é bem claro o porquê desta associação, mas a OA e a HAS partilham fatores de risco importantes, como a obesidade, o envelhecimento e o sedentarismo (Zhuo et al, 2012). Já foi evidenciado que a co-administração de drogas anti-inflamatórias não esteroidais ou inibidores de ciclooxigenases com agentes anti-hipertensivos pode alterar os valores de pressão sanguínea (White, 2004). Além disso, a disfunção do sistema do ON nos vasos tem sido apontada como uma via comum para a OA e a HAS (Findlay, 2007; Katz et al, 2010). Entretanto, até o momento, esta relação foi estabelecida apenas para a articulação do quadril, não sendo possível generalizar essa observação. A relação entre OA e HAS necessita de muito mais estudo para o seu pleno entendimento.

1.2.1 Modelos Experimentais de Osteoartrite de Joelho

Modelos animais de osteoartrite são utilizados, principalmente, para a compreensão da patogênese da doença e para avaliação do potencial terapêutico de fármacos antiartríticos (Bendele, 2001). Muitos animais podem ser usados para o estudo da osteoartrite, entre eles pode-se citar cavalo, cachorro, camundongo, rato, porco, galinha, coelho. Alguns animais como o porco da Guiné e algumas linhagens de camundongos desenvolvem OA espontaneamente (Kraus et al, 2010). Há também os modelos transgênicos. Tanto na OA que ocorre naturalmente como no caso de animais geneticamente modificados a doença ocorre de forma lenta e progressiva e, portanto, o período para testes de drogas ou estudo da patogênese é longo (Bendele, 2001). A indução mecânica, pela lesão cirúrgica do menisco e ou ligamento cruzado anterior se dá em menor tempo, porém tempo necessário ainda é longo, cerca 12 semanas (Gerwin et al, 2010). Em função do fator tempo a indução química, principalmente, através do monoiodoacetato de sódio (MIA) tem sido comumente realizada (Guingamp et al, 1997; Thakur et al, 2011). O modelo é geralmente avaliado entre 14 e 28 dias após indução, mas avaliações podem se estender para além de dois meses, dependendo dos objetivos do estudo (Dunhan et al, 1993; Guingamp et al, 1997; Fernihough et al, 2004, Thakur et al 2011).

A lesão por MIA ocorre pela inibição da atividade de enzimas glicolíticas e oxidativas nos condrócitos, as desidrogenases após 4 de semanas indução da OA tem uma inibição quase completa, com destaque para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Dunhan, 1993; Guzman et al., 2003). Fragmentos da degradação de proteoglicanos e colágenos em OA induzida com MIA mostrou similaridade nos mecanismos de degeneração da cartilagem aos observados a cartilagem articular com OA (Janusz et al, 2004). Diferentes quantidades de MIA e de solvente (salina estéril) podem ser usados para indução da OA 0,8mg/50µL, 1mg/50µL, 2mg/50µL, 2mg/25µL, 3mg/50µL, 4,8mg/60µL (Dunhan et al, 1993; Guzman et al, 2003; Bar-Yehuda et al, 2009; Fernihough et al, 2004; Lee et al, 2011; Liu et al, 2011). O modelo animal escolhido para as induções desses estudos foi o rato, sendo das linhagens Wistar ou Sprague-Dawley. Mas outras espécies animais são utilizadas para indução da OA com MIA, como camundongo, porco da Guiné, galinha e cavalo (Guingamp et al, 1997).

1.3 Caracterização da cartilagem hialina articular

A cartilagem hialina articular é um tipo de tecido conjuntivo especializado, constituído por condrócitos e MEC (Dijgraaf et al, 1995; Horton et al, 2006; Helenius et al, 2008). A MEC é composta por água, colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas estruturais e pequenas quantidades de lipídeos (Dijgraaf et al, 1995). A cartilagem hialina aparece como um dos componentes determinantes do sistema articular móvel ao proporcionar uma superfície de baixa fricção durante o movimento, distribuindo as cargas mecânicas aplicadas à articulação em ortostatismo e na locomoção e, assim, minimizando os estresses no osso subcondral (Cecil, 2005; Espanha, 2010). A cartilagem é aneural, de modo que a percepção algica e proprioceptiva é dependente do tecido sinovial, cápsula, músculos e tecido ósseo subcondral. Também é avascular e alinfática, sendo que a nutrição e eliminação de resíduos se dá através de difusão na matriz cartilaginosa com o fluido sinovial (Dijgraaf et al, 1995).

A cartilagem hialina normal é estruturalmente dividida em zonas, sendo que cada zona tem forma e orientação características (Figura 5). Na zona superficial, as células são pequenas, possuem forma alongada e paralela à superfície e matriz pericelular reduzida. Essa zona é especializada no deslizamento, conseqüentemente o conteúdo de colágeno é elevado, onde as fibras de colágeno encontram-se densamente compactadas na superfície. Entretanto, o nível de proteoglicanos é reduzido. A zona intermediária é distinguível por apresentar células arredondadas, que não apresentam uma orientação organizada em relação à superfície. O conteúdo de proteoglicanos é alto e estes se encontram distribuídos de forma homogênea e suas fibras de colágeno dispõem-se obliquamente em relação à superfície. Na zona profunda, os condrócitos organizam-se em condrons, grupos de três ou mais células perpendiculares à superfície. As fibras de colágeno formam uma rede de malha, com direção perpendicular à superfície articular. Nesta zona, os proteoglicanos têm uma distribuição mais variável. Após a zona profunda há uma clara separação entre a cartilagem não calcificada e calcificada, sendo que esta separação é denominada de “*Tide mark*” ou “linha de maré”. Na cartilagem calcificada, a matriz encontra-se mineralizada e os proteoglicanos em quantidade reduzida. Esta é a camada de transição entre o tecido ósseo subcondral e tecido cartilaginoso (Lotz et al, 2010; Espanha,2010).

Os condrócitos correspondem a 2-5% do volume da cartilagem e possuem tanto atividade anabólica quanto catabólica (Lundon & Waker, 2007). Os condrócitos mantêm a MEC estável porque além de produzir as fibras colágenas e os proteoglicanos também

produzem fatores de crescimento, como TGF- β 1 e IGF-I, e MMPs, responsáveis pelo equilíbrio entre a síntese e degradação da MEC no estado fisiológico (Dean et al, 1989; Loeser, 2006; Lundon & Waker, 2007). As citocinas e os fatores de crescimento produzidos pelos condrócitos possuem ação parácrina e autócrina (Lundon & Waker, 2007). O desequilíbrio entre as vias anabólicas e catabólicas leva a alterações das propriedades da cartilagem articular, comprometendo e prejudicando suas funções (Garnero et al, 2002; Horton et al, 2006; Ströbel et al, 2010).

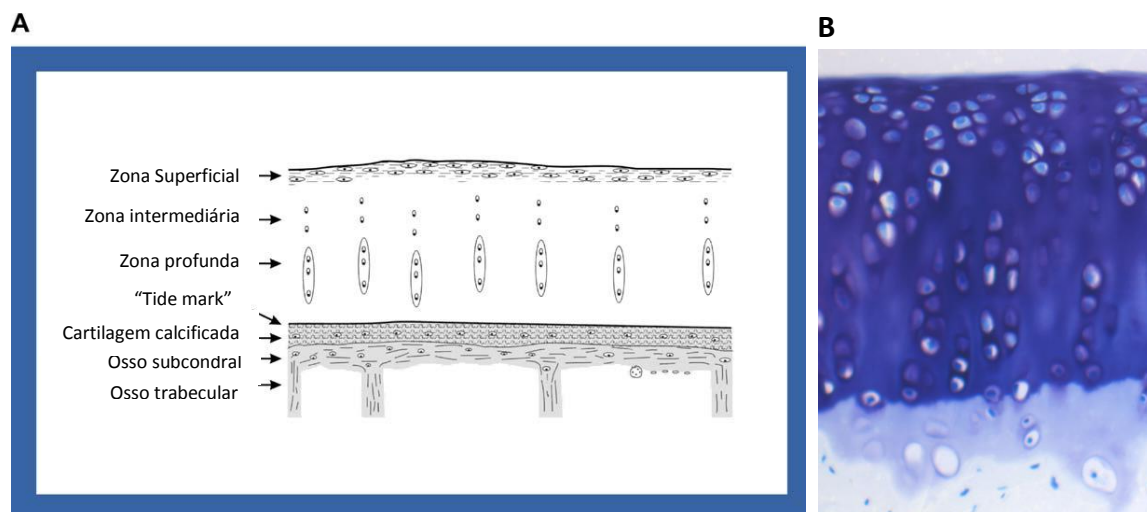


Figura 5: Desenho esquemático das zonas da cartilagem (A) e corte histológico representativo (B). Coloração de azul de toluidina e aumento de 20x. Fonte: Adaptado de Pritzker et al, 2005.

Proteoglicanos são polímeros lineares de dissacarídeos que, por definição, possuem pelo menos um glicosaminoglicano (GAG) como componente de suas cadeias laterais (Helenius et al, 2008). Os GAGs controlam as funções biológicas dos proteoglicanos através de ligações de estabilização com os componentes da superfície celular, fatores de crescimento e outros constituintes da MEC. Os proteoglicanos estão constantemente sendo renovados e possuem uma meia-vida de semanas (Cecil, 2005; Lundon & Waker, 2007). Os GAGs possuem alta densidade de cargas negativas, o que atrai cátions, especialmente de Na^+ . Como consequência, a água é osmoticamente atraída para dentro da matriz. Este gel altamente hidratado tem importantes funções, pois permite que a matriz resista a forças de compressão e favorece a rápida difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios entre o sangue e as células do tecido. A matriz de cartilagem que reveste a articulação do joelho, por exemplo, pode suportar pressões por este motivo (Helenius et al, 2008).

As fibras colágenas correspondem a 95% do volume da cartilagem (Lundon & Waker, 2007). O principal colágeno presente na cartilagem é o tipo II, mas pequenas

quantidades dos colágenos tipos III, V, VI, IX, X, XI e XIV também são encontradas (Espanha, 2010; Garnero et al, 2000). O colágeno tem importante função estrutural de organizar os demais componentes da MEC e os condrócitos. Além disso, também oferece resistência mecânica às forças de tensão na cartilagem (Wilson et al, 2005). O colágeno da cartilagem articular é considerado muito mais estável do que os proteoglicanos e sua renovação é bem mais lenta (Lippiello et al, 1977).

2 JUSTIFICATIVA

A OA está associada com várias doenças cardiovasculares, incluindo HAS, doença arterial coronariana, diabetes e doença renal crônica (White, 2009). Dentre essas, a comorbidades mais comum em pacientes idosos com OA é a HAS (Singh et al, 2002; White, 2009). Pacientes com OA tem uma prevalência aumentada de HAS, em torno de 40%, enquanto na população geral este índice está em torno de 25% (Singh et al, 2002). Em idosos com mais de 85 anos, a HAS e a OA são as doenças mais prevalentes (Collerton et al, 2009).

Do ponto de vista da patogênese, pode haver mecanismos patogênicos comuns que afetam tanto o sistema vascular quanto as articulações, contribuindo para a coexistência da OA e HAS (Katz et al, 2010). A disfunção do sistema do ON nos vasos tem sido apontada como uma via comum para a OA e a HAS. Danos celulares e disfunção endotelial, atribuídos a HAS, parecem conduzir a alterações vasculares periféricas, incluindo o tecido ósseo (Findlay, 2007; Katz et al, 2010). Entretanto, até o momento, esta relação foi estabelecida apenas para a articulação do quadril, não sendo possível generalizar essa observação.

A coadministração de drogas anti-inflamatórias não esteroidais ou inibidores de ciclooxigenase com agentes anti-hipertensivos é comum (White, 2004). Investigações clínicas demonstraram que tais administrações conjugadas destes medicamentos resultam em resistência na diminuição da redução da pressão arterial sistólica em pacientes idosos com OA (Whelton et al, 2001; White, 2009). Estudos posteriores veem sendo realizados para determinar as melhores classes de anti-inflamatório a ser usados por pacientes com OA.

Apesar do exposto acima, ainda há muito para se entender a respeito da relação entre OA e HAS. O joelho é uma das articulações mais frequentemente acometida pela OA (Parmet et al, 2003). Há a presença de renina e ECA no fluido sinovial (Çobankara et al, 2005) e o tecido sinovial, mais especificamente os sinoviócitos, expressam os receptores AT1, indicando, assim, a presença de um SRA local no joelho (Pattacini et al, 2007). O macrófago, principal célula imune associada à patogênese da OA (Haseeb & Haqqi, 2013), também expressa componentes do SRA (Okamura et al, 1999). Apesar da expressão da ECA e do AT1 não estarem aumentados na OA, o fato de haver um SRA local no joelho precisa ser considerado e investigado na patogênese da doença. Os iECAs são uma classe

de drogas amplamente utilizada na medicina cardiovascular (Garcia et al, 2010). Logo, investigar se os iECAs, classe comumente utilizada por pacientes com HAS, pode modular parâmetros inflamatórios e histopatológicos na OA é importante. Embora haja poucas evidências da presença e função dos componentes do eixo vasodilatador do SRA, ou seja, ECA2/Ang-(1-7)/Mas, no sistema articular do joelho (Silveira et al, 2010), a averiguação dos efeitos do uso de um ativador da ECA2 pode permitir um entendimento mais amplo do eixo vasodilatador do SRA sobre no sistema articular do joelho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das ECAs nos efeitos inflamatórios e nas mudanças histopatológicas observadas na OA.

3.2 Objetivos específicos

1. Padronizar o modelo experimental de OA em ratos por MIA quanto aos parâmetros inflamatórios e as alterações histopatológicas nos tempos de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias.
2. Avaliar a contribuição do SRA na OA em ratos, através do uso de Captopril, DIZE e Losartan, na modulação da inflamação.
3. Avaliar se a inibição da produção de ON interfere nos efeitos do Captopril na OA, utilizando-se L-NAME.
4. Analisar a expressão de IL-10 e TNF- α após tratamento crônico com inibidor da ECA ou com estimulador da ECA2 em ratos com OA.
5. Avaliar os efeitos da inibição da ECA pelo Captopril e estimulação da ECA2 pelo DIZE na cartilagem hialina de ratos induzidos com MIA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal entre 180 e 280g, com idade média de 12 semanas. Os animais foram fornecidos pelo CEBIO (Centro de Bioterismo do ICB/UFMG) e foram mantidos em biotério apropriado, onde receberam ração comercial para roedores (Nuvilab) e água *ad libitum* durante o período do experimento. O número de animais por grupo foi determinado pelo cálculo amostral: $X=T.S/\sqrt{R}$. Já o desvio padrão foi calculado a partir de dados preliminares (Sampaio, 1998). Para a padronização do modelo de OA foram utilizados 72 animais e para os grupos de tratamento foram utilizados 70 animais (Figura 6). O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) e a sua aprovação encontra-se em anexo.

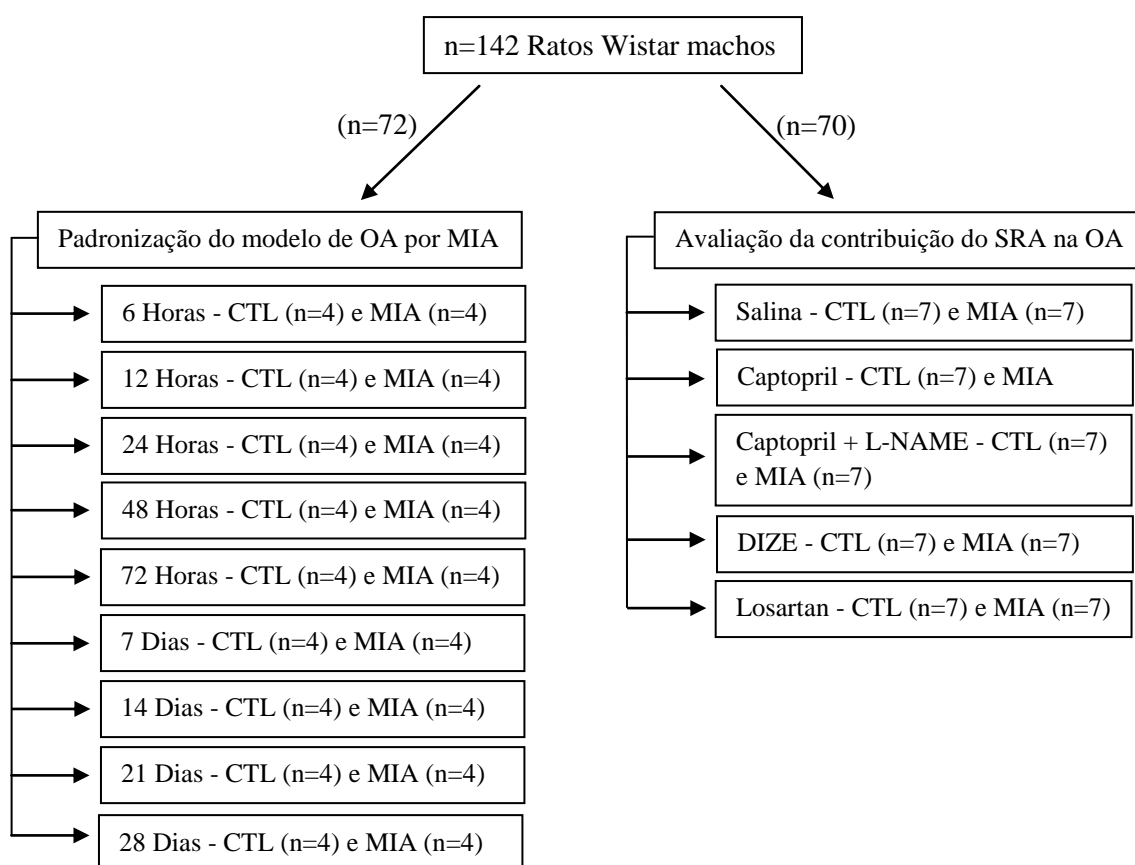


Figura 6: Fluxograma ilustrando desenho do estudo

CTL: controle; MIA: monoiodoacetato de sódio; LN: L-NAME; DIZE: aceturato de diminazeno.

4.2 Indução da OA no joelho

Os ratos foram anestesiados com 100mg/kg de ketamina e 15mg/kg de xilazina. O joelho esquerdo foi depilado e limpo com álcool etílico a 70% (Clarke et al, 1997). Para induzir OA foi feita uma única injeção intra-articular no joelho esquerdo de 2 mg de monoiodoacetato de sódio (MIA) dissolvido em 50 μ L de solução salina estéril (Bar-Yehuda et al, 2009). A solução de MIA foi injetada através do ligamento patelar usando uma agulha para insulina 29G X 1/2 (BD Ultra-Fine™) com o joelho em 90° de flexão (Figura 7). Já nos animais controles (CTL) foi injetado apenas a salina estéril no mesmo volume dos induzidos, ou seja, 50 μ L.

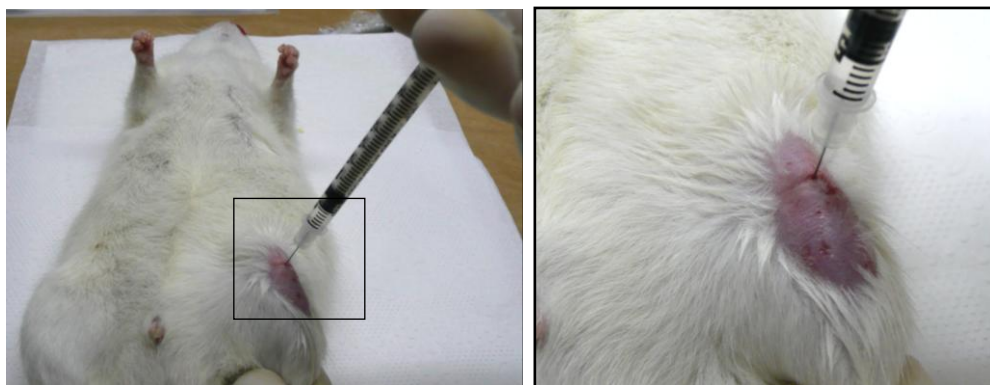


Figura 7: Representação da técnica de indução de OA em joelhos de ratos.

4.3 Grupos experimentais

Para a padronização do modelo de OA, quanto aos parâmetros inflamatórios e histopatológicos, foram utilizados 8 animais em cada tempo de avaliação, sendo 4 animais CTL e 4 animais induzidos com MIA. Antes da indução da OA, foram realizadas as medidas de hiperalgesia e edema correspondendo a medida basal. No tempo zero foi realizada a indução da OA e ao completar os tempos de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias foram novamente realizadas as medidas de hiperalgesia e edema nos animais (Figura 8A). Em seguida, eles foram eutanasiados para realização do lavado articular, utilizado posteriormente para a verificação da cinética de migração celular e análise de citocinas. O joelho foi armazenado em solução fixadora para ser processado para posterior análise histopatológica.

Para avaliar a influência das ECAs nos efeitos inflamatórios e mudanças histopatológicas nos animais com OA, primeiramente foi realizada a medida basal da pressão arterial média (PAM) dos animais e, logo após, foi realizada a indução da OA (Figura 8B). Passados os 28 dias de indução da doença, a PAM foi novamente medida e

foram realizadas as medidas de hiperalgesia e edema nos animais. Neste momento, deu-se início aos tratamentos (Tabela 1) e estes foram mantidos por um período adicional de 8 semanas. Depois de quatro semanas de tratamento as medidas de PAM, hiperalgesia e edema foram realizadas. Ao fim do período de tratamento essas medidas foram novamente realizadas. Na sequência, os animais foram eutanasiados e foi realizado o lavado articular no joelho, que foi utilizado posteriormente para a verificação do perfil inflamatório, e o joelho foi armazenado em solução fixadora para ser processado para posterior análise histopatológica.

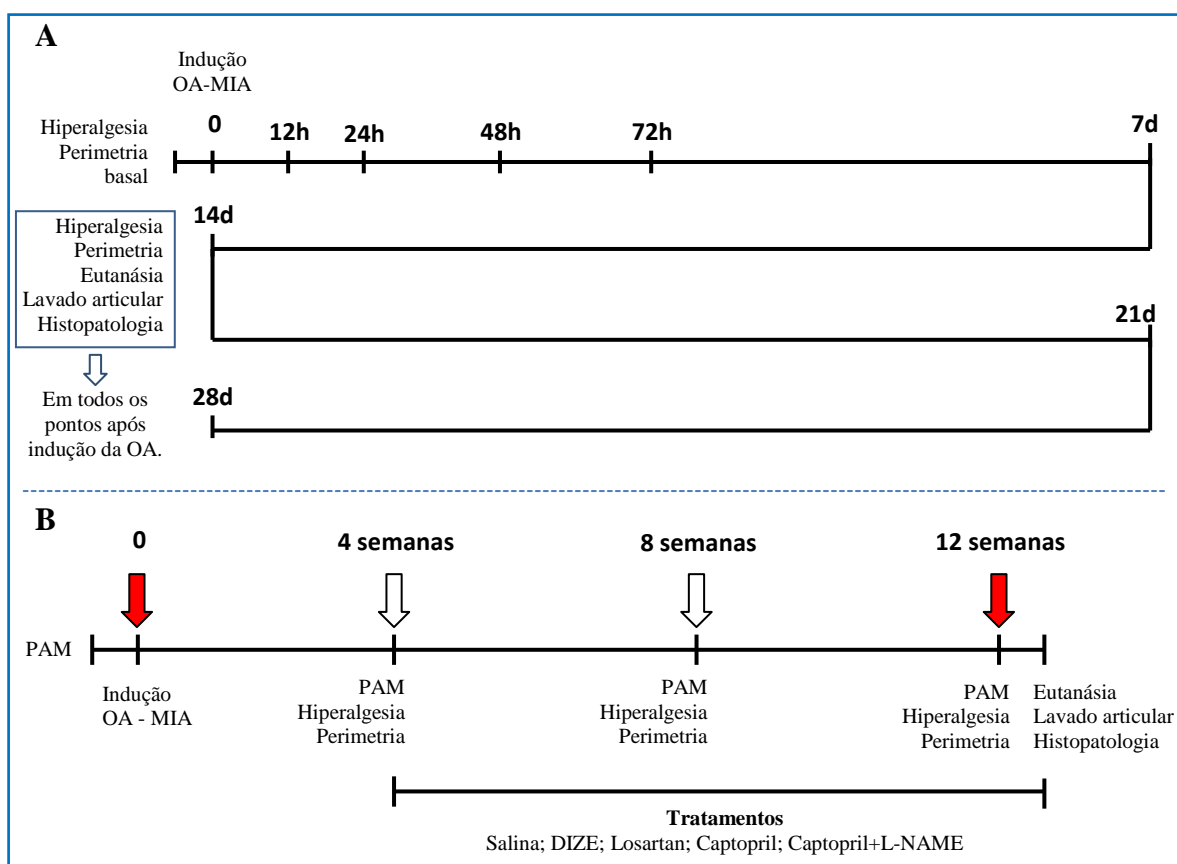


Figura 8: Representação esquemática dos protocolos de experimentação animal. (A) Padronização do modelo e (B) tratamentos realizados

Tabela 1: Tratamentos, concentrações das drogas e via de administração.

Tratamentos	Concentração	Via de administração
Salina	0,9%	<i>per os</i> (gavagem)
Captopril - Inibidor da ECA	30mg/kg/dia	<i>per os</i> (gavagem)
Losartan - Bloqueador do receptor AT ₁	30mg/kg/dia	<i>per os</i> (gavagem)
DIZE - Ativador da ECA2	1mg/kg/dia	<i>per os</i> (gavagem)
Captopril - Inibidor da ECA + L-NAME - Inibidor da ONS	30mg/Kg/dia + 15mg/kg/dia	<i>per os</i> (gavagem)

ECA: enzima conversora de angiotensina; DIZE: aceturato de diminazeno; ECA2: enzima conversora de angiotensina 2; L-NAME: N ω -Nitro-L-Arginina metil éster hidrocloreto; ONS: óxido nítrico sintase.

4.4 Avaliação da hiperalgesia

Utilizou-se o analgesímetro digital INSIGHT[®] para medir a hiperalgesia nos animais. O aparelho registra digitalmente a pressão oferecida pela pata do animal em gramas (g) e sua precisão para registrar uma força máxima é no intervalo entre 0,1g - 150,0g. Os ratos foram colocados individualmente em caixas de acrílico, com medidas de 12 x 20 x 17cm, sendo que a sua parte inferior é composta de uma malha de arame, não maleável, com espaços regulares de 1cm² para proporcionar acesso a pata do animal (Figura 9). Espelhos angulados abaixo das caixas de acrílico facilitam a visualização da mesma. O transdutor de pressão foi acoplado a uma ponteira de polipropileno para o estímulo na pata do animal. Todos os animais passaram por um tempo mínimo de 15 minutos de aclimatização e posterior a este tempo foram realizadas três medidas.

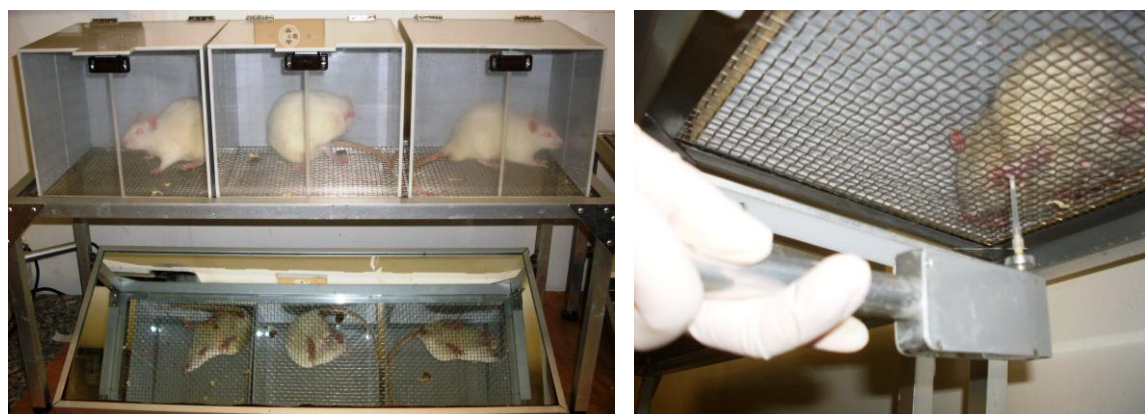


Figura 9: Ilustração do procedimento de avaliação da hiperalgesia.

A resposta de retirada da pata pelo estímulo da ponteira gera menos pressão no transdutor quando comparado com o animal que apresenta maior limiar de resposta, indicando dor. Para os animais da padronização, as medidas foram realizadas ao completar os tempos de indução (6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias). Já nos animais dos grupos de tratamento foram feitas quatro medidas, ou seja, basal, após 4, 8 e 12 semanas da indução. Todos os experimentos seguiram as normas e princípios éticos estabelecidos para experimentação com animais conscientes recomendadas pela *International Association for the Study of Pain* (Zimmermann, 1983).

4.5 Avaliação de edema

O edema do joelho foi medido com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, São Paulo, Brasil) (Figura 10). Para medir o diâmetro do joelho, os bicos fixo e móvel do paquímetro foram posicionados no sentido medial-lateral do joelho. A medida foi realizada em todos os animais CTL e MIA do estudo nos tempos de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias nos animais da padronização. Já nos animais dos grupos de tratamentos, foram feitas quatro medidas, basal, após 4, 8 e 12 semanas da indução.



Figura 10: Ilustração do procedimento de avaliação do edema de joelho.

4.6 Cinética de migração celular - perfil inflamatório

Após os tempos de 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias e 12 semanas da indução da OA, os animais foram eutanasiados e foi realizado o lavado articular no joelho esquerdo. Primeiramente, foi realizada higienização com álcool a 70% do joelho, a pele foi cortada e realizou-se uma incisão no tendão patelar com uma lâmina de bisturi. Em seguida, procedeu-se com a lavagem da cavidade articular

do joelho utilizando uma micropipeta monocanal LABMATE[®]. Após três lavagens com 20µL de PBS 3%, o lavado foi acondicionado em eppendorfs de 0,5mL que já continham 140µL de PBS 3%. Os eppendorfs foram centrifugados por 5 minutos a 1200 rpm a 4°C. O sobrenadante ($\pm 170 \mu\text{L}$) foi retirado, acondicionado em eppendorfs de 0,5mL e congelados para posterior dosagem de citocinas. Para ressuspender e homogeneizar o pellet, foi adicionado 100µL de BSA 3% (Bovine Serum Albumin) resultando na solução de células. Pipetou-se 20µL dessa solução transferindo-a para eppendorfs (0,5mL) com 180µL da solução de Turck. Desta segunda solução foram pipetados 10µL e aplicado à câmara de Neubauer para realização da contagem total das células. O valor obtido foi multiplicado por 10^4 e expresso em leucócitos $\times 10^5$ /cavidade. O restante da solução de células foi pipetado em suportes do citospin no qual foi adicionado mais 90µL de BSA 3% e colocado em lâminas histológicas. A preparação foi centrifugada por 5 minutos a 450rpm. Após secagem natural das lâminas, procedeu-se com o método de coloração May-Grunwald-Giemsa. As lâminas foram usadas para fazer a contagem diferencial dos leucócitos em microscópio óptico utilizando-se uma objetiva de 100x. Posteriormente, foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando-as em 3 tipos celulares, ou seja, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. O número obtido de cada tipo celular foi utilizado para calcular a percentagem do tipo celular em relação à quantidade de células obtida na contagem total. Os resultados foram expressos como unidades relativas de macrófagos/neutrófilos/linfócitos.

4.7 Quantificação de citocinas

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado a partir do lavado articular para avaliação das concentrações de IL-10 e IL-6 nos animais da padronização e de IL-1 β , TNF- α e IL-10 nos animais tratados.

Os kits foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. No primeiro dia, a placa de ELISA foi sensibilizada com 100µL de anticorpo de captura por poço na concentração de 5,6µg/mL diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. A placa foi vedada e incubada a 4°C *overnight*. No segundo dia, a placa foi lavada quatro vezes utilizando solução de lavagem constituída de PBS com 0,05% de Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) no lavador automático de placas de ELISA (ELx50 Auto Strip Washer). Posteriormente, foram adicionados 300µL por poço da solução de bloqueio BSA a 1% em PBS e incubada em temperatura ambiente por uma hora sob agitação constante no

agitador automático de placas de ELISA (Titer Plate Shaker, Lab. Line Instruments, INC). A placa foi novamente lavada quatro vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados em duplicata 100µL das amostras, dos padrões e do branco (solução diluente das amostras, BSA 0,1%) e, após vedamento da placa, ela foi novamente incubada a 4°C *overnight*. No terceiro dia, a placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem e foram adicionados 100µL por poço do anticorpo de detecção biotilado na concentração de 5,6µg/mL diluído em BSA 1%. Em seguida, a placa foi incubada em temperatura ambiente por duas horas sob agitação constante. Após este período, a placa passou pelo processo de lavagem quatro vezes, sendo então, adicionados 100µL por poço de solução estreptavidina conjugada a peroxidase e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos no agitador de placas. A placa foi novamente lavada e foram adicionados 100µL por poço da solução cromógeno/substrato contendo 4mg/mL de solução substrato OPD (o-fenilenodiamina dihidroclorido) (Sigma, St. Louis, MO, USA) em 10mL de tampão citrato e 2µL de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) por 15 a 20 minutos e abrigado da luz. A reação foi interrompida com a adição de 50µL por poço da solução *stop* (1M de H₂SO₄). A leitura da placa de ELISA foi realizada em espectrofotômetro com filtro de referência de 492 nm (Spectra Max 250, Molecular Devices, Minneapolis, MN, USA), sendo determinadas as concentrações dos marcadores a partir da curva-padrão através do programa Soft Max Pro versão 3.1.1 (Molecular Devices, Minneapolis, MN, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.8 Mensuração da pressão arterial média

Os animais dos grupos de tratamento tiveram a pressão arterial média (PAM) aferida pela pletismografia de cauda através do pletismógrafo RTBP 2000 (Kent-Scientific, Litchfield, USA). Foram realizadas quatro aferições, ou seja, basal, após 4, 8 e 12 semanas da indução. O programa Windaq Acquisition 1.58 foi utilizado para registro e análise dos dados.

4.9 Avaliação das alterações histopatológicas

Após o sacrifício por injeção intramuscular de 300mg/kg de Ketamina e 45mg/kg de xilazina, os tecidos moles e a patela da perna esquerda foram removidos cirurgicamente e a articulação tíbio-femoral foi seccionada, sendo os cortes realizados ± 2cm acima e abaixo da linha média do joelho. As peças permaneceram três dias em solução de

formalina neutra tamponada a 10%. Em seguida, elas foram lavadas com água deionizada e colocadas em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% para descalcificação. Quando já em descalcificação adiantada, as peças foram cortadas em duas metades, aproximadamente iguais, seguindo a orientação do plano sagital ou ao longo dos ligamentos cruzado anterior e cruzado posterior do joelho, formando, assim, uma metade látero-lateral e outra látero-medial. Essas metades permaneceram mais uma semana na solução descalcificadora para finalização do processo. As peças dos animais da padronização permaneceram 3-4 semanas na solução de EDTA e as peças dos animais de tratamento 5-6 semanas.

Na sequência do preparo histológico, realizou-se a inclusão em parafina das peças. Após serem retiradas da solução de EDTA, as peças foram lavadas com água deionizada e passaram por um processo de desidratação gradual em etanol (2 x 70%, 2 x 80%, 90%, 95%, 3 x 100% - 30 minutos cada banho). Na sequência, elas foram diafanizadas em xilol (3 x 20 minutos), impregnadas em parafina (3 x 40 minutos) e incluídas em parafina com o plano do corte para baixo.

Utilizando o micrótomo Leica RM2255, cada bloco de parafina foi cortado no plano sagital gerando três secções de 6µm de cada metade. Todas as lâminas utilizadas passaram previamente pelo processo de silanização, para melhor aderência dos cortes. As secções histológicas seguiram para a remoção inicial da parafina e fixação em placa de aquecimento onde, após atingir 58°C, esperava-se 5 minutos e desligava-se a placa para o resfriamento gradual das secções. Para a análise histopatológica da cartilagem, as lâminas foram coradas com azul de Toluidina e tricrômico de Gomori.

4.9.3 Reação imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi utilizada para avaliar a expressão de IL-10 e TNF- α nos animais tratados. A preparação inicial das secções foi idêntica a da análise histopatológica. No primeiro dia, as lâminas histológicas foram desparafinizadas em xilol (2 x xilol I - 30 minutos e xilol II - 15 minutos). Na sequência, os tecidos foram hidratados em soluções de etanol em concentrações decrescentes (100%, 90%, 80%, 70% e 50%) e foi finalizada com banho em água deionizada por 5 minutos. O material seguiu para a recuperação antigênica em solução de tampão citrato 0,1 M (300mL) na panela de pressão por 20 minutos a 82 °C. As lâminas permaneceram no tampão citrato por mais 20 minutos para seu resfriamento e, ao término, 5 banhos em água deionizada foram realizados. Procedeu-se com o bloqueio da

peroxidase endógena com H₂O₂ a 10% em metanol por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS (3 X 5 minutos). Na continuação, realizou-se o bloqueio de ligações inespecíficas com BSA 2% Tween 20 0,1% por 1 hora em câmara úmida. Finalizando o primeiro dia, foi feita a incubação das lâminas com anticorpo primário diluídos em 0,1% PBS overnight a 4 °C. As diluições e concentrações adotadas foram, respectivamente, de 1:25 e 0,44µg/mL para o rat anti-TNF-alpha (R&D Systems) e 1:50 e 0,50µg/mL para o anti-rIL-10 (R & D Systems). No segundo dia, foi realizada uma lavagem rápida dos cortes com PBS puro com piceta e lavagem em soluções de PBS (3 X 5 minutos). Em seguida, realizou a incubação com o anticorpo secundário conjugado com biotina. Este procedimento foi realizado inclusive no corte do controle negativo que não recebeu anticorpo primário. As lâminas foram incubadas por 1 hora em câmara úmida em temperatura ambiente. Logo após, realizou-se a lavagem rápida dos cortes com PBS puro com piceta e lavagem em soluções de PBS (3 X 5 minutos) e seguiu-se com a amplificação do sinal utilizando a streptavidina-biotina-peroxidase do kit LSAB/DAKO durante 1 hora em câmara úmida. Os cortes foram lavados com PBS puro e passaram por lavagem em soluções de PBS (3 X 5 minutos). Procedeu-se, então, com a revelação, ou seja, o material foi colocado em uma solução contendo DAB chromogen 0,025% em PBS e H₂O₂. Essa etapa foi finalizada em água corrente por 5 minutos. Foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Harris (6 segundos), lavagem em água corrente por 5 minutos e hidratação em concentrações crescentes de etanol (70%, 90%, 2 x 100% - as duas primeiras diluições por 5 minutos cada e quando em etanol absoluto 10 minutos cada banho). O material seguiu para diafanização (2 x xilol I - 15 minutos e xilol II - 10 minutos). Ao fim foi feita montagem das lâminas com Entellan.

4.9.4 Avaliação morfológica

Para digitalização das imagens utilizou-se a microcâmara (Q-Color3, Olympus Latin America Inc.) acoplada ao Microscópio (BX53, Olympus Latin America Inc.). Os parâmetros morfológicos foram analisados apenas na cartilagem tibial devido à inviabilidade de digitalizar imagens do fêmur, pois apresenta área de superfície mais extensa. Para avaliação do infiltrado celular, em cada animal foi feita varredura de toda superfície da tíbia, entre a cartilagem e o osso subcondral, sendo obtidas 20 imagens por animal, digitalizadas através da objetiva de 40x. O infiltrado também foi analisado na sinóvia, mas neste tecido foram capturada 5 imagens por animal. Para as demais análises

foi realizada varredura linear na superfície tibial, sendo digitalizadas entre 5-8 imagens por animal, através da objetiva de 20x. Posteriormente, utilizou-se o software KS300 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) para análise morfométrica das imagens, ou seja, quantificação das áreas de tecido de granulação, cartilagem hialina e fibrocartilagem, de erosão, número total de núcleos presentes no tecido de granulação e sinóvia, mensuração das regiões com alterações histopatológicas (irregularidade ou descontinuidade da superfície articular; alterações na celularidade, como apoptose e formação de clusters; e alterações no tamanho e forma dos condrócitos) e quantificação da marcação imunohistoquímica e da perda de proteoglicanos através do cálculo de densidade óptica (DO) expresso na unidade Grey. O cálculo de DO foi baseado em uma função algorítmica ($-\text{LOG } I/I_0$). Assim, os valores de DO próximos de zero corresponderam a uma intensa marcação pelo azul de toluidina (Costa et al, 2010).

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 3-4 animais na padronização do modelo de OA e de 6-7 animais nos grupos de tratamento. Utilizou-se a análise de variância pelo one-way ANOVA sendo que nos dados com distribuição não paramétrica aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e nos dados de distribuição normal o pós-teste de Newman-Keuls. Para as análises que envolviam duas variáveis foi utilizado o two-way ANOVA e o pós-teste de Bonferroni. O nível de significância considerado para todos os testes foi de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio o software GraphPad Prism 5.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do modelo de OA - Parâmetros inflamatórios

A hiperalgesia foi significativamente maior nos animais induzidos em todos os tempos de medição (6h - 28 dias) (Figura 11), indicando que a injeção de 2mg de MIA produz e mantém a alteração na percepção álgica nos animais. O edema articular foi observado nos animais induzidos nos tempos de 12 e 24 horas, de forma significativa, em relação ao controle (Figura 12).

A cinética de migração celular no modelo de OA induzida por MIA evidenciou que o pico de leucócitos ocorre no tempo de 72h, sendo o macrófago a principal célula responsável por esse pico (Figura 13A). A diferença significativa dos macrófagos é mantida até a medida do no tempo de 28 dias, mas na medida de 21 dias não houve significância estatística (Figura 13C). Os linfócitos foram evidenciados a partir do tempo de 24 horas, porém com valores bem baixos, não sendo verificada diferença estatística dos animais induzidos em relação aos animais controles (dados não apresentados). Já os neutrófilos tiveram o pico no tempo de 24h (Figura 13B). Neste tempo também houve um aumento significativo no nível de IL-10 (Figura 14A), sugerindo, assim, ser esta uma resposta contra-regulatória do animal para a estimulação flogogênica realizada. Ainda nessa figura é possível observar que no tempo de 7 dias não foi detectado a IL-10 nos animais MIA. Finalizando esta parte da padronização do modelo, na Figura 14B pode-se observar que os animais tiveram um pico de IL-6 no tempo de 12 horas. Este dado sugere que esta citocina influenciou na formação do edema nos joelhos dos ratos induzidos com MIA.

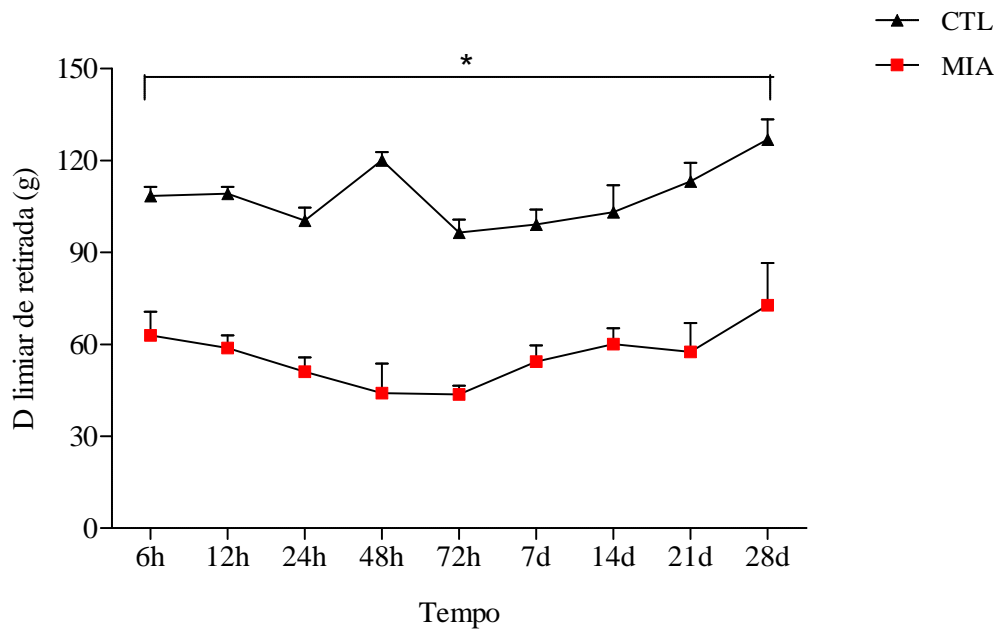


Figura 11: Hiperalgesia em ratos pós-indução da OA. Animais induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles (CTL). Os valores são apresentados como média e SEM (n = 3 - 4 animais por grupo). * $p < 0,05$ vs. controle em todos os tempos de medição.

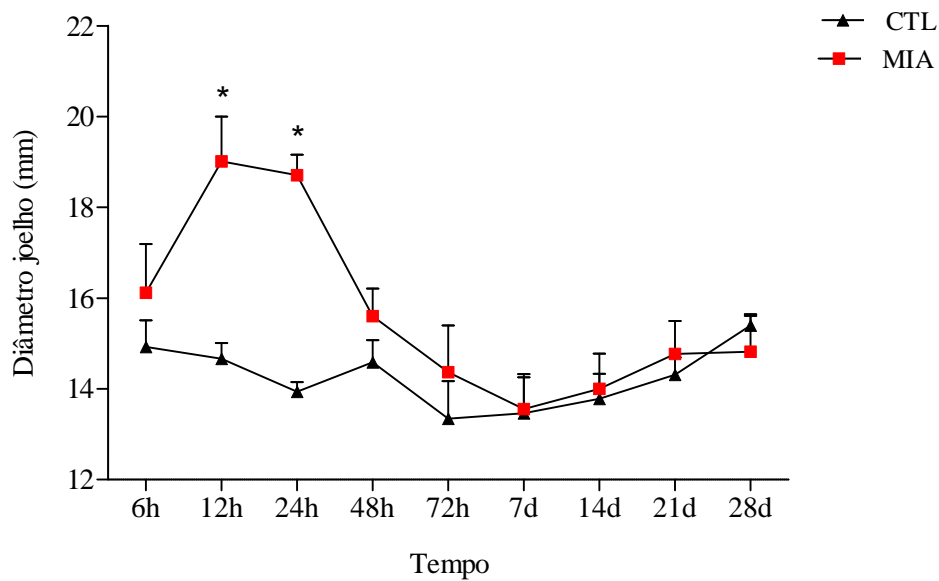


Figura 12: Diâmetro do joelho de ratos pós-indução da OA. Animais induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles (CTL). Os valores são apresentados como média e SEM (n = 3 - 4 animais por grupo). * $p < 0,05$ vs. controle.

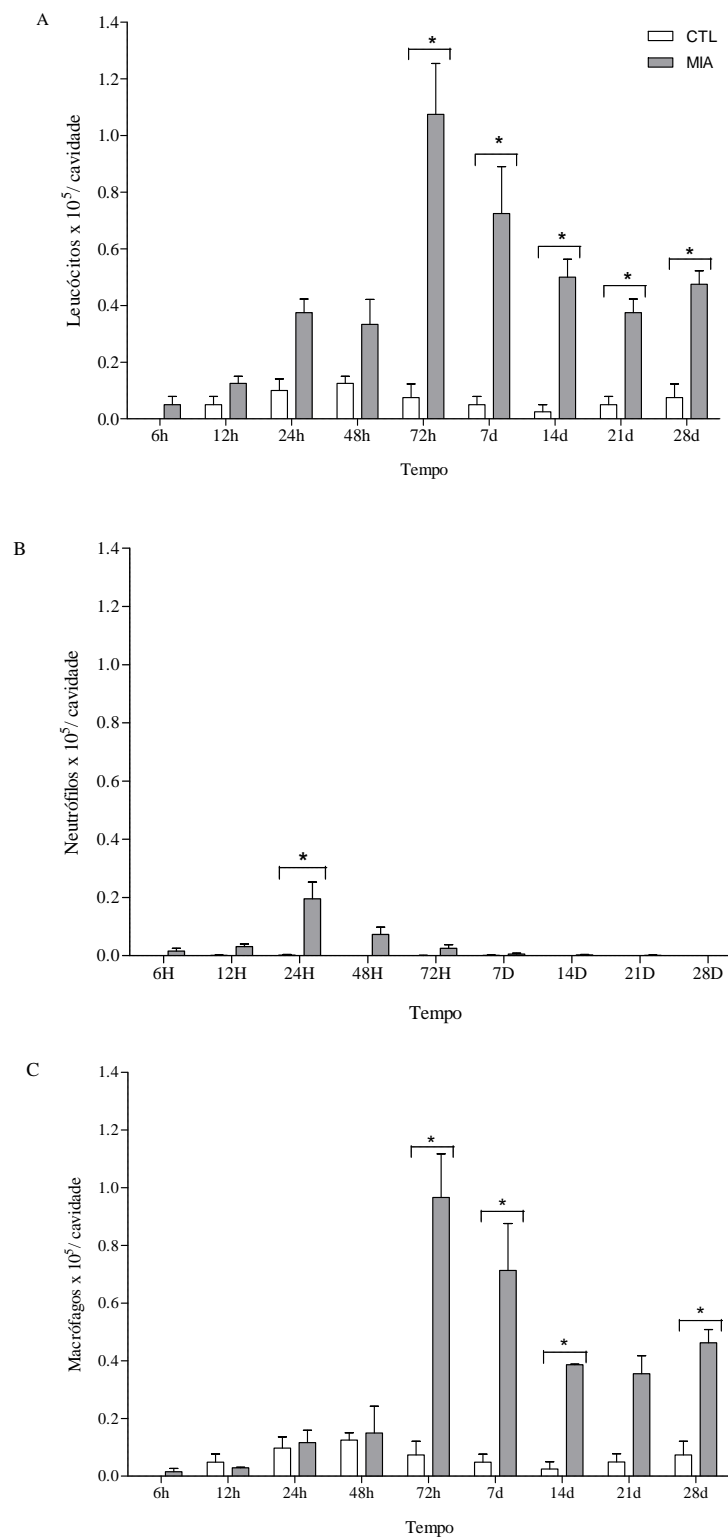


Figura 13: Cinética de migração celular pós-indução da OA. Leucócitos totais (A), neutrófilos (B) e macrófagos (C) em Ratos com OA induzida com monoiodoacetato de sódio (MIA) e em ratos controle (CTL). Os valores são apresentados como média e SEM (n = 3 - 4 animais por grupo). Em (A) *p < 0,05 vs. controle no tempo de 72 horas, 7, 14, 21 e 28 dias (B) *p < 0,05 vs. controle apenas no tempo de 24 horas e (C) *p < 0,05 vs. controle apenas para os tempos 72 horas, 7, 14 e 28 dias.

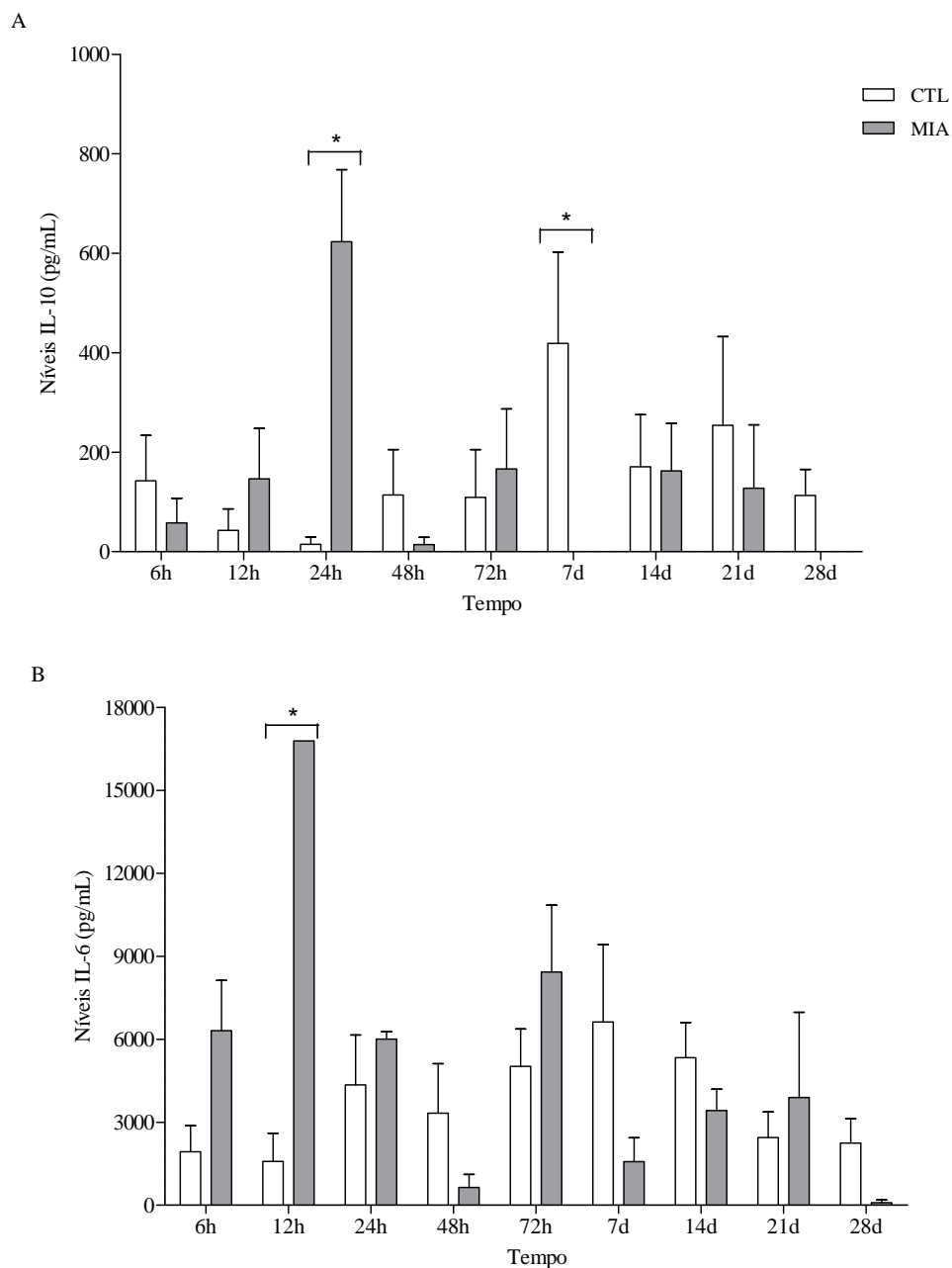


Figura 14: Níveis de IL-10 (A) e IL-6 (B), determinados a partir do lavado articular, pós-indução da OA. Os valores são apresentados como média e SEM (n = 3 -4 animais por grupo). Em (A) * $p < 0,05$ vs. controle no tempo de 24 horas e de 7 dias e em (B) * $p < 0,05$ vs. controle no tempo de 12 horas.

5.2 Padronização do modelo de OA – Parâmetros histopatológicos

A progressão da perda dos proteoglicanos está evidenciada na Figura 15. Ela mostra que esta perda se inicia a partir do 7º dia, sendo que é a partir do 14º dia que ela se torna significativa, ficando ainda maior nos dias 21 e 28 pós-indução. As imagens

histológicas (Figura 16) ilustram este processo de perda dos proteoglicanos ao longo do tempo.

Apesar da perda de proteoglicanos iniciar ao 7º dia de indução as alterações na morfologia da cartilagem só são evidentes no 14º dia após a indução da OA, no qual é observada formação inicial de clusters, atrofia de condrócitos e desorientação dos condrons (Figuras 17A e B). Com 21 dias de indução é visto lacunas vazias, pinocitose de condrócitos e núcleos fragmentados, além de hipocelularidade e fibrilação (descontinuidade da matriz cartilaginosa na zona superficial) (Figuras 17C e D). No 28º dia após a indução as alterações dos tempos anteriores encontram-se mais pronunciadas (morte celular é mais profusa), sendo acrescida escavação da matriz cartilaginosa, em áreas focais (Figuras 17E e F).

A avaliação do tecido de granulação entre o osso subcondral e a cartilagem (Figura 18A) mostrou que a alteração na celularidade inicia-se com 72 horas, mas só no tempo de 21 dias que aparece diferença estatística, que se torna ainda mais expressiva no tempo de 28 dias (Figura 19A). Apesar de ser observado que a perda de proteoglicanos também é mais intensa nesses dois últimos tempos (Figura 15) e que as alterações osteoartíticas são mais pronunciadas na região de infiltrado (Figura 20), não foi verificado correlação significativa da evolução do infiltrado inflamatório no osso e cartilagem com a perda de proteoglicanos. A análise de área do infiltrado teve resultado similar à avaliação do número de núcleos nos tecidos (Figura 19B). Já quanto ao tecido sinovial (Figura 18B) houve aumento significativo do infiltrado inflamatório no tempo de 72 horas (Figura 19C). Mesmo tempo em que ocorreu o pico de leucócitos no lavado articular (Figura 13A), indicando que migraram a partir do tecido sinovial para a cavidade articular. O número de células na sinóvia volta aumentar, significativamente, no tempo de 28 dias. Na avaliação da área na sinóvia houve significância a partir do tempo de 14 dias, sendo mais expressiva no tempo de 28 dias (Figura 19D).

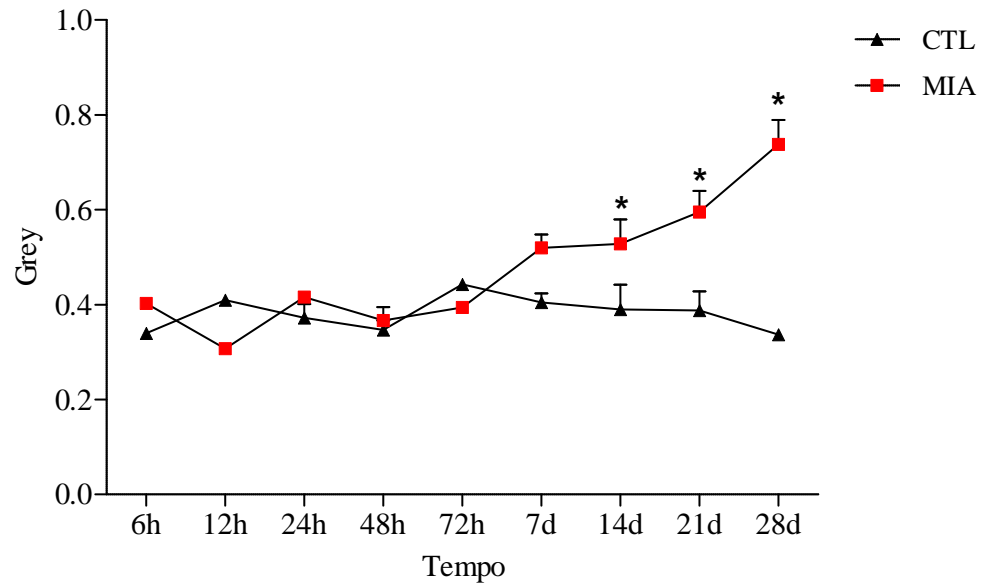


Figura 15: Progressão da perda de proteoglicanos na cartilagem hialina pós-indução da OA. Animais induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles (CTL). Os valores são apresentados como média e SEM (n = 3 -4 animais por grupo). *p < 0,05 vs. controle nos tempos de 14, 21 e 28 dias.

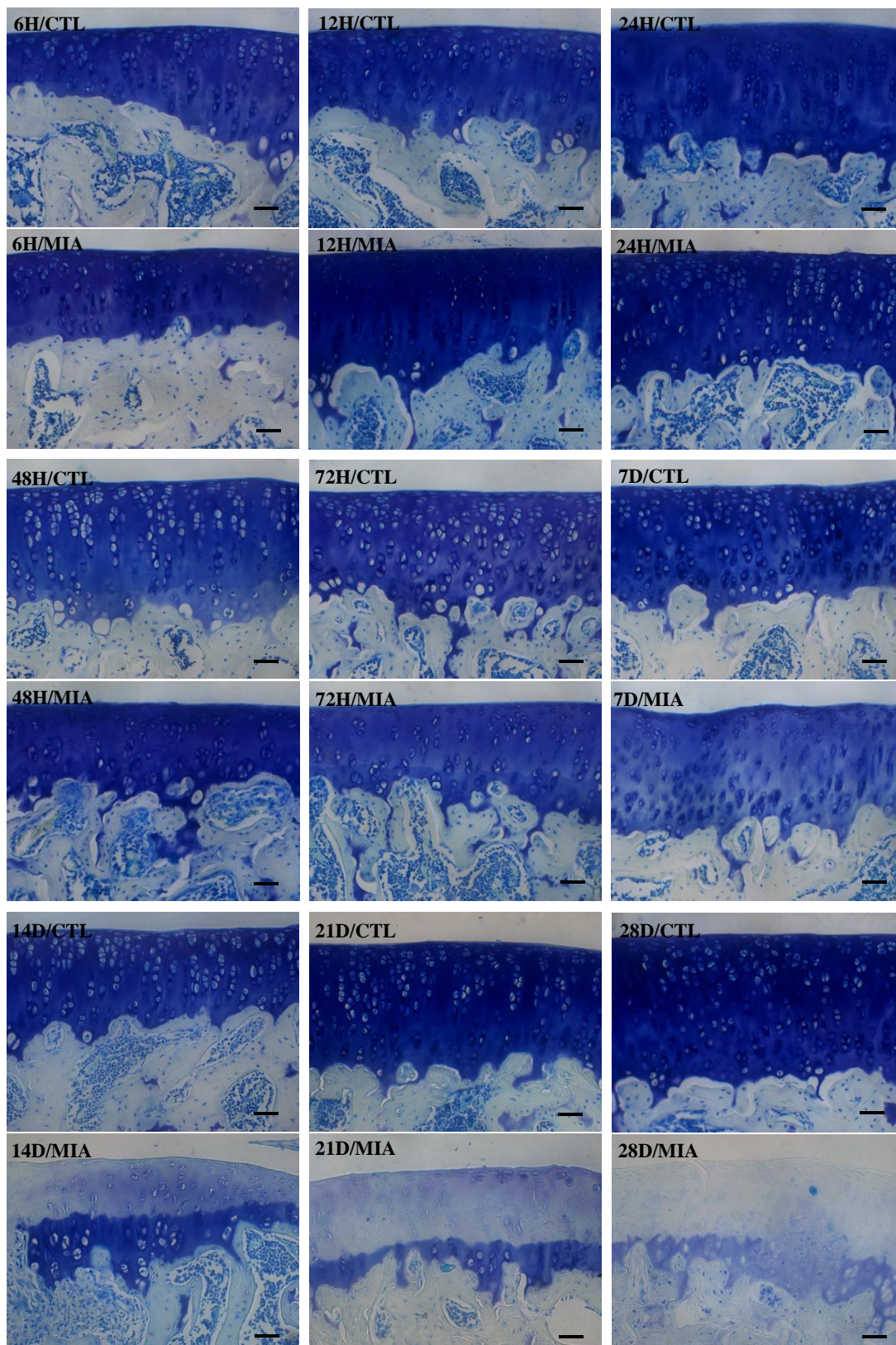


Figura 16: Fotomicrografias representativas de cartilagem hialina coradas com azul de Toluidina. A marcação em azul indica a presença de proteoglicanos e a menor marcação indica perda, o que pode ser observada a partir do 7º dia pós-indução da OA nos animais MIA. Barra: 100µm.

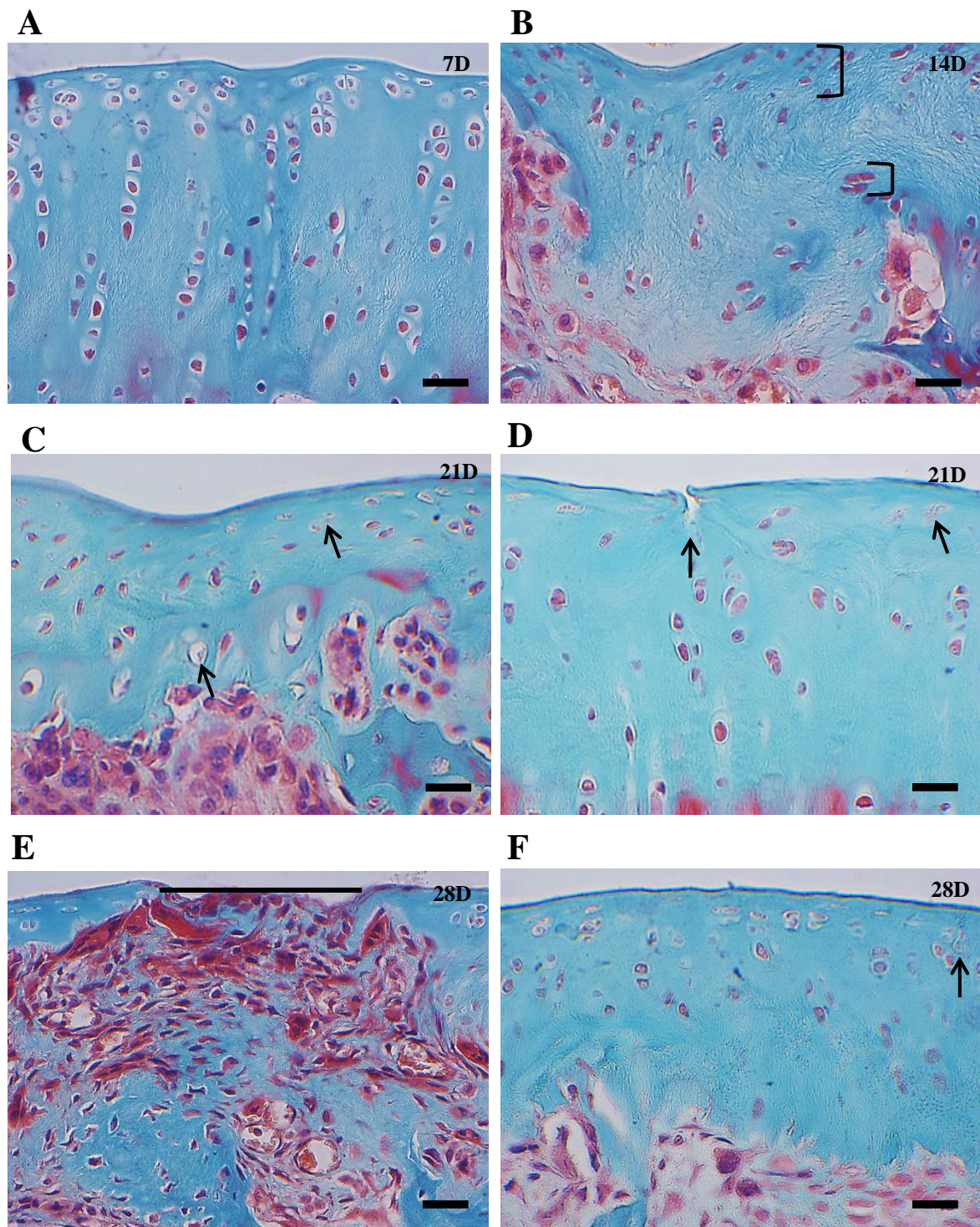


Figura 17: Fotomicrografias representativas das alterações histopatológica nos animais MIA até 28 dias. Na figura A (7D) observa-se arquitetura normal da matriz cartilaginosa. Na B (14D) nota-se a formação de cluster e desorientação dos condrons. Na C (21D) setas indicam lacuna vazia e pinocitose; na D (21D) as setas indicam fibrilação e morte celular, além disso, há hipocelularidade. Por último, nas figuras E (28D), barra indica região de escavação na matriz cartilaginosa, abaixo da barra é observado infiltrado inflamatório; e na F (28D) morte de condrócito e redução da celularidade. Barra: 100 μ m.

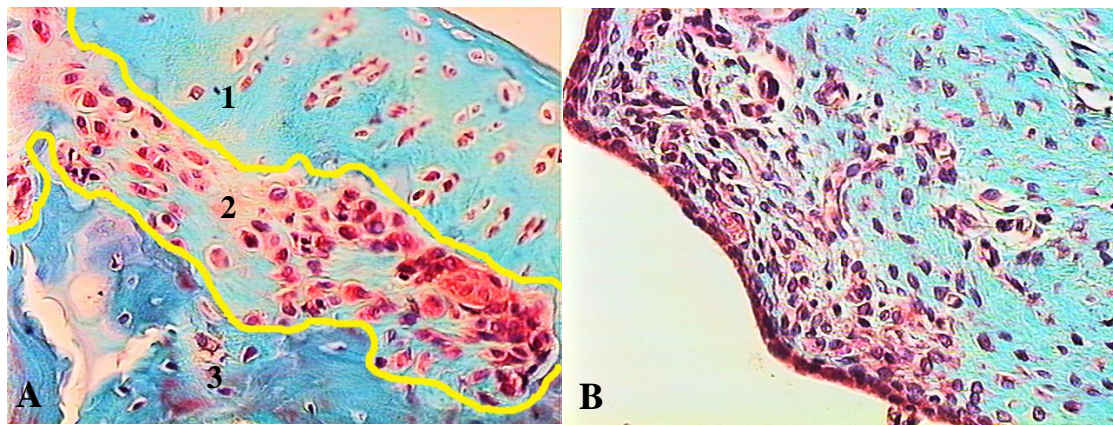


Figura 18: Fotomicrografia representando as áreas de análise do infiltrado celular. Em A análise de infiltrado (A2) entre a cartilagem hialina (A1) e o osso subcondral (A3). E em B tecido sinovial com infiltrado celular. Barra: 100µm.

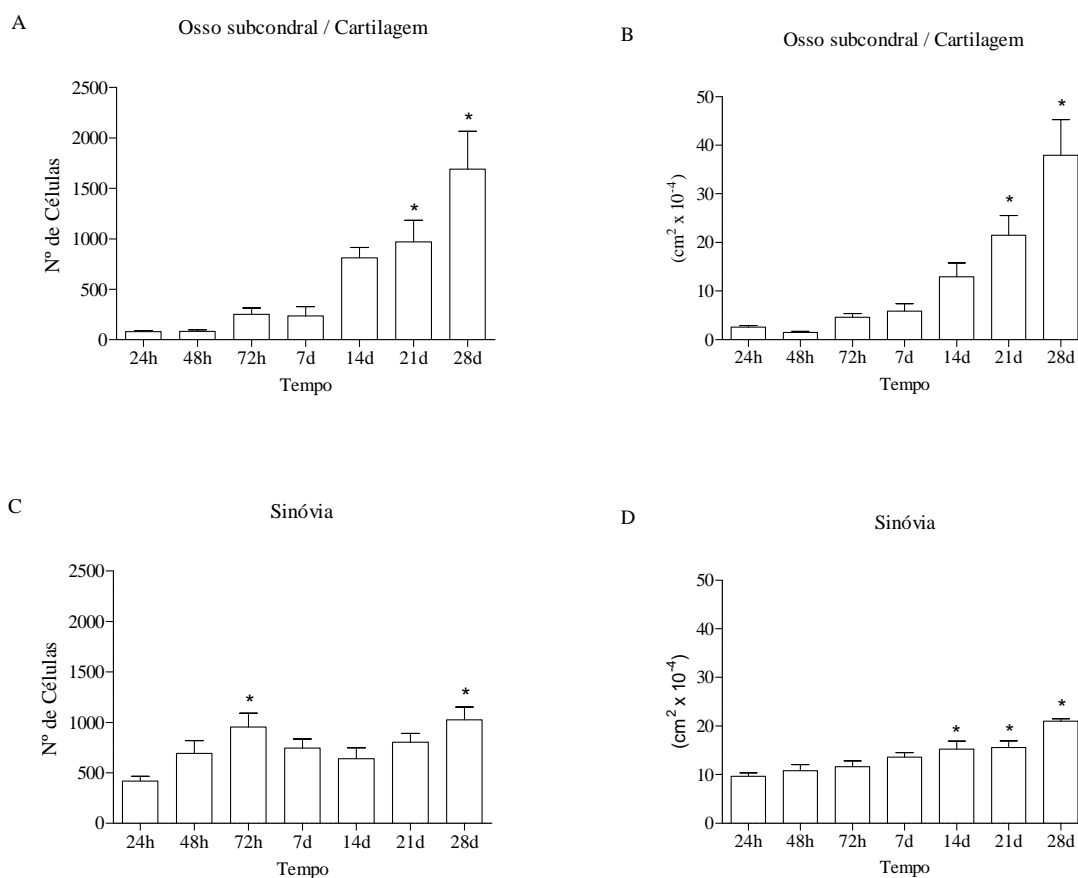


Figura 19: Infiltrado celular pós-indução da OA com MIA. Em (A) Infiltrado celular no osso subcondral, * $p < 0,05$ nos tempos (21d vs. 24h) e (28 vs. 24h, 48h, 72h, 7d, 14d e 21d). Em (B) área de infiltrado celular no osso subcondral, * $p < 0,05$ nos tempos (21d vs. 24h, 48h, 72h e 7d) e (28 vs. 24h, 48h, 72h, 7d, 14d e 21d). Em (C) Infiltrado celular na sinóvia, * $p < 0,05$ tempos de (72 vs. 24h) e (28d vs. 24h). Em (D) Área de infiltrado na sinóvia, * $p < 0,05$ nos tempos (14d vs. 24h); (21d vs. 24h) e (28 vs. 24h, 48h, 72h, 7d, 14d e 21d). Os valores são apresentados como média e SEM (n = 3 - 4 animais por grupo). * $p < 0,05$ vs. controle nos tempos de 14, 21 e 28 dias.

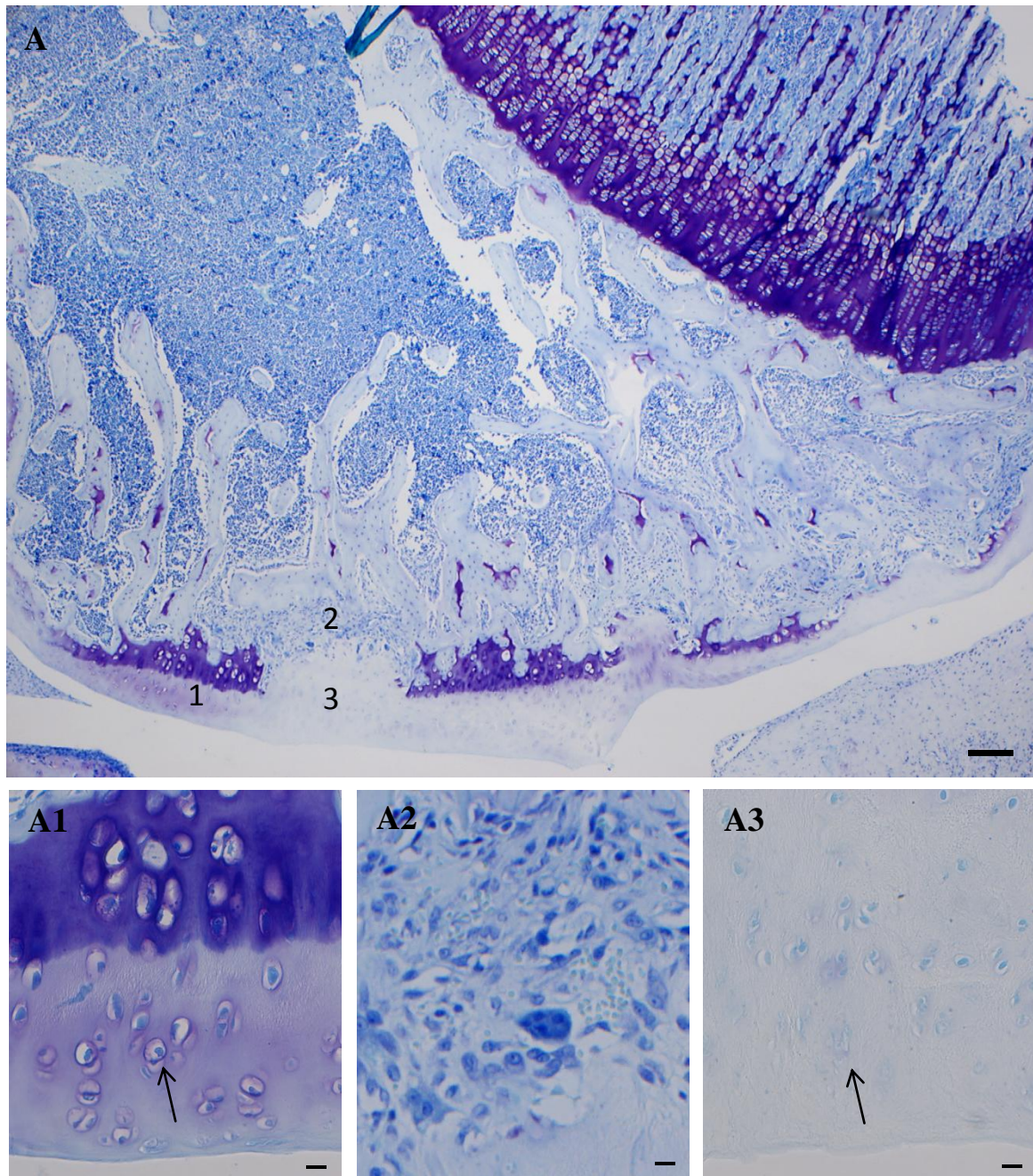


Figura 20: Fotomicrografias representando diferenças nas alterações osteoartíticas em região com infiltrado inflamatório. As fotos são da superfície da tíbia de um animal MIA, no 14º dia após indução. Pode-se observar diferença entre A1 e A3 em relação ao nível de proteoglicanos (marcação em azul), a celularidade (seta apontando condrócito na lacuna em A1 e lacuna vazia em A3), e a não visualização da “tide mark” entre a cartilagem calcificada e a cartilagem não calcificada. Em A2, região subjacente a A3, observa-se uma região de infiltrado celular. Barras: 100µm.

5.3 Pressão arterial média durante os diversos tratamentos

A PAM reduziu significativamente na 4ª semana após o início dos tratamentos (8ª semana pós-indução) nos animais MIA+salina e MIA+Captopril, ou seja, nesse tempo de 8

semanas houve redução significativa na PAM nos animais induzidos (MIA) tratados ou não com Captopril. O L-NAME bloqueou o efeito do Captopril nos animais MIA+Captopril, mas não nos animais MIA+salina (Figura 21A). Os resultados do tratamento com DIZE foram similares ao tratamento com o Captopril, ou seja, na 8ª semana houve uma redução significativa na PAM nos animais induzidos (MIA) tratados ou não com o DIZE (Figura 21B). Por último, o tratamento com Losartan levou a uma diminuição na PAM nos animais controles na 8ª semana e nos animais MIA na 12ª semana (Figura 21C).

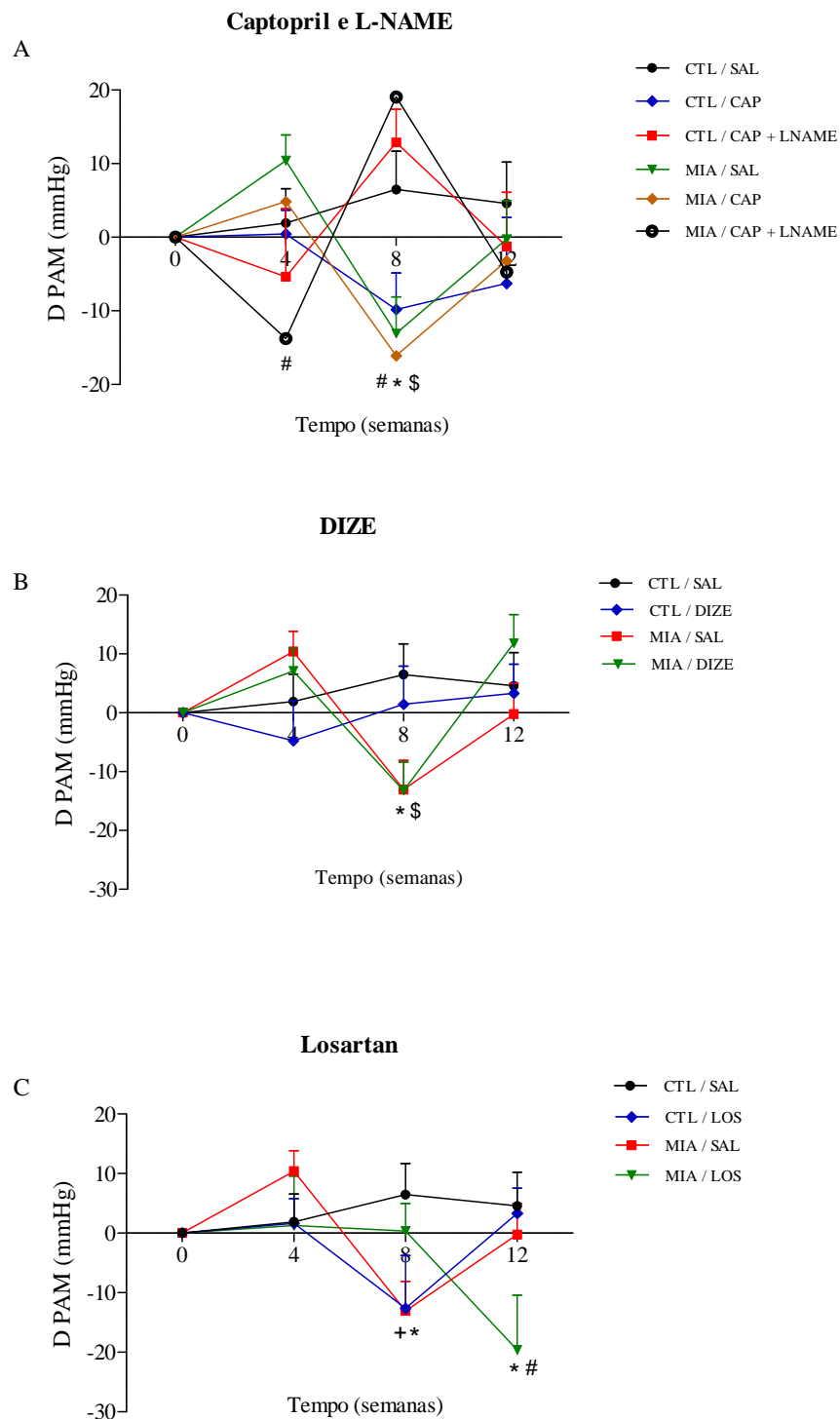


Figura 21: Pressão arterial média (PAM) durante 8 semanas de tratamento com drogas moduladoras do SRA. Os valores são apresentados como média \pm SEM (n = 7 animais por grupo). Em (A) no tempo de 8 semanas $*p < 0,05$ (MIA/SAL vs. CTL/SAL); $^{\$}p < 0,05$ (MIA/CAP vs. CTL/SAL); 4 e 8 semanas $^{\#}p < 0,05$ (MIA/SAL vs MIA/CAP+LNAME). Em (B) no tempo de 8 semanas $*p < 0,05$ (MIA/SAL vs. CTL/SAL); $^{\$}p < 0,05$ (MIA/DIZE vs. CTL/SAL). Em (C) no tempo de 8 semanas $^{\dagger}p < 0,05$ (CTL/LOS vs. CTL/SAL), $*p < 0,05$ (MIA/SAL vs CTL/SAL); no tempo de 12 semanas $*p < 0,05$ (MIA/LOS vs CTL/LOS), $^{\#}p < 0,05$ (MIA/LOS vs MIA/SAL).

5.4 Efeitos dos tratamentos no processo inflamatório

Os tratamentos nos animais MIA não alteraram a percepção dolorosa, de forma significativa. Houve apenas uma redução, não significativa, no limiar de retirada da pata dos animais controle tratado com Captopril (Figura 22).

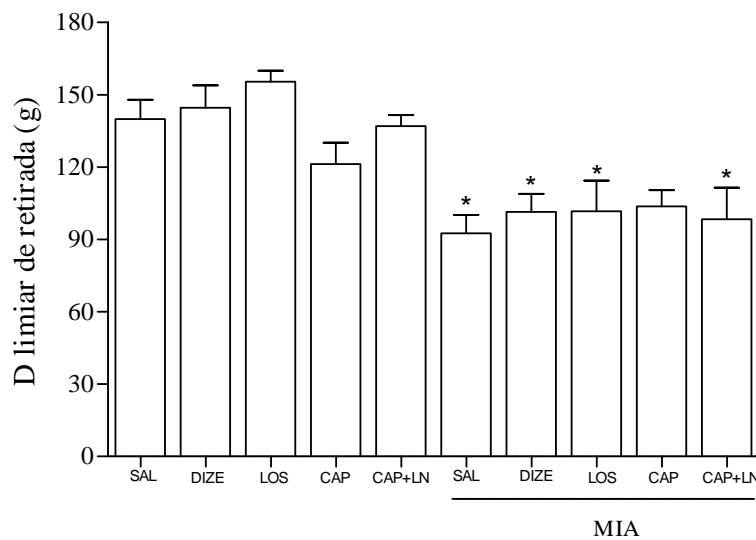


Figura 22: Hiperalgisia após 8 semanas de tratamentos. Tratamentos: salina (SAL), aceturato de diminazeno (DIZE), Losartan (LOS), Captopril (CAP), Captopril mais L-NAME (CAP+LN). Animais induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles. Os valores são apresentados como média \pm SEM (n = 7 animais por grupo). * $p < 0,05$ grupos MIA vs. seu respectivo controle.

O diâmetro médio-lateral do joelho, medida usada para avaliação de edema no joelho, não apresentou diferença significativa na comparação entre os grupos após o período de 12 semanas de indução e 8 semanas de tratamento (Figura 23).

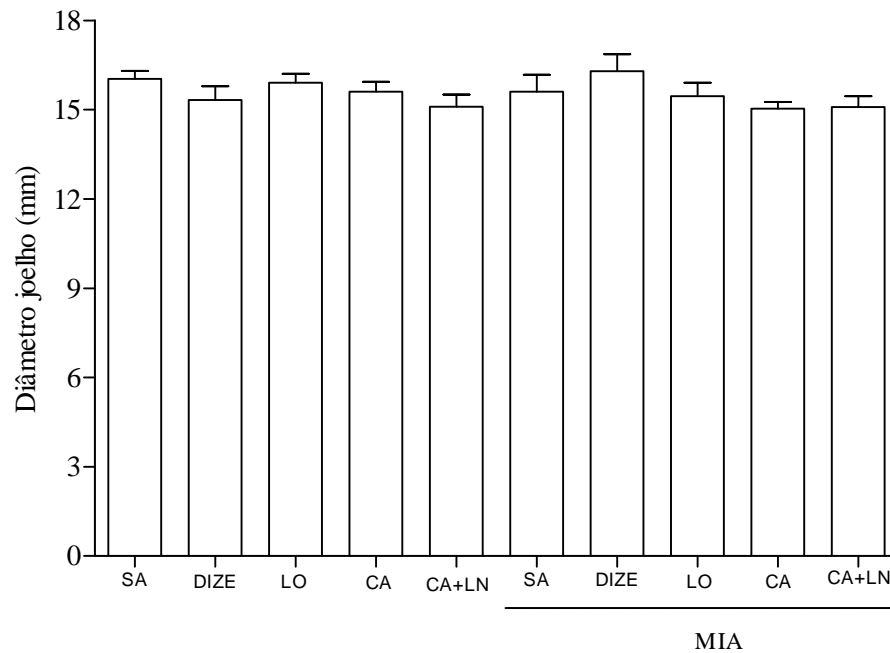


Figura 23: Diâmetro do joelho após 8 semanas de tratamentos. Tratamentos: salina (SAL), aceturato de diminazeno (DIZE), Losartan (LOS), Captopril (CAP), Captopril mais L-NAME (CAP+LN). Animais induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles. Os valores são apresentados como média \pm SEM (n = 7 animais por grupo). Não há diferença estatística na comparação entre os grupos.

O tratamento dos animais MIA com Captopril ou Losartan foi capaz de reduzir a população de leucócitos totais e macrófagos, de forma significativa, em relação aos controles (Figuras 24A e B). E este efeito do Captopril foi, parcialmente, bloqueado pelo L-NAME (Figuras 24A e B). Já o tratamento com DIZE não alterou o perfil inflamatório, quanto à avaliação da contagem total de leucócitos e macrófagos, mas levou a um aumento na população de neutrófilos (Figuras 24A, B e C). Nenhum tratamento alterou significativamente a população de linfócitos na cavidade articular (Figura 24D).

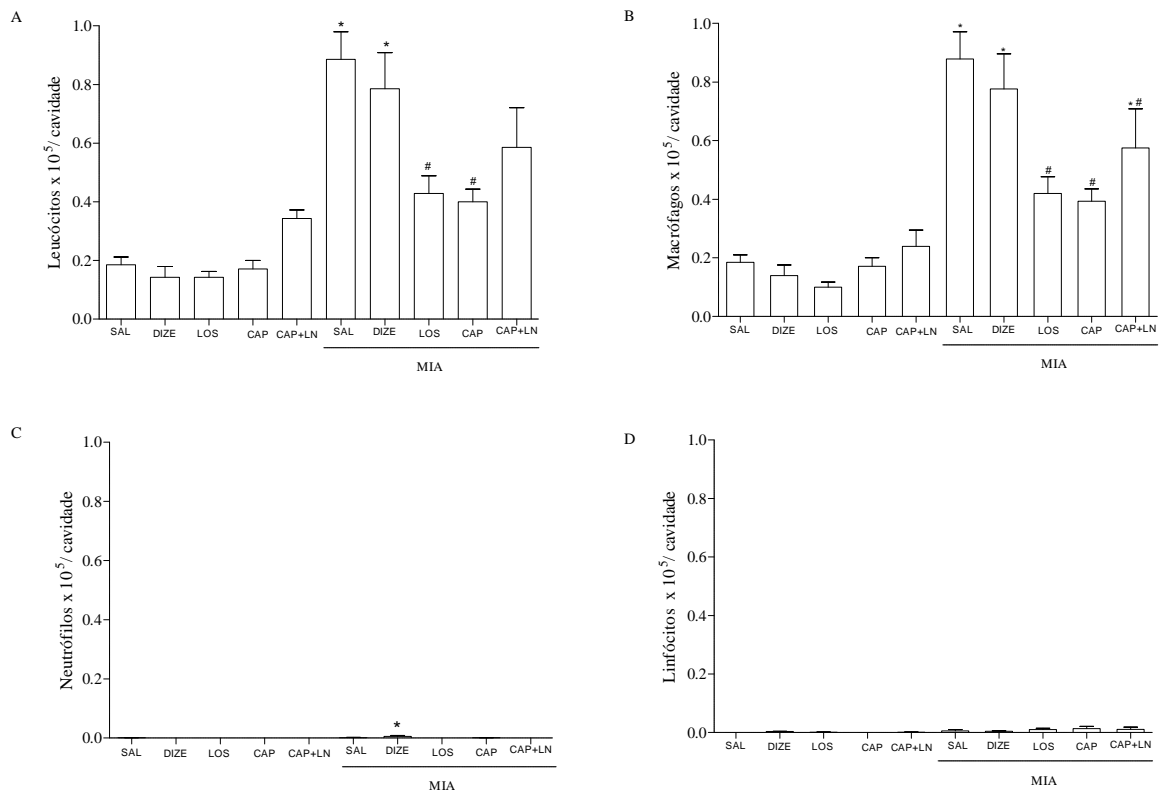


Figura 24: Perfil Inflamatório após 8 semanas de tratamentos. Tratamentos: salina (SAL), aceturato de diminazeno (DIZE), Losartan (LOS), Captopril (CAP), Captopril e L-NAME (CAP+LN). Induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA). Os valores são apresentados em média \pm SEM (n = 7 animais por grupo). Em (A), contagem total, em (B, C e D) contagem diferencial, expressa como unidades relativas, * $p < 0,05$ grupos MIA vs. seu respectivo controle e # $p < 0,05$ vs. MIA/SAL.

A quantificação das citocinas pelo ensaio de ELISA nos animais dos tratamentos não funcionou muito bem. Na leitura do ensaio de IL-10 os valores apresentaram-se bem oscilantes, alguns muito altos, outros muito baixos. Ambos os ensaios de TNF α e de IL-1 β produziram valores muito baixos e similares entre os animais induzidos e controles. No Tabela 2 estão evidenciadas os valores de média \pm SEM dos ensaios imunoenzimático para cada um dos grupos de tratamento quanto à citocinas avaliadas. Os valores obtidos no ensaio mostra diferença significativa apenas para IL-10 na comparação entre os induzidos e os controles, estando IL-10 reduzida nos animais MIA.

Citocinas	Tratamentos	Controle (média ± SEM)	MIA (média ± SEM)
IL-10	Salina	290,4 ± 25,44	15,86* ± 15,86
	DIZE	156,6 ± 36,38	36,31* ± 15,13
	Captopril	142,6 ± 39,28	42,68* ± 27,95
IL-1β	Salina	0,30 ± 0,01	0,27 ± 0,03
	DIZE	0,29 ± 0,01	0,24 ± 0,01
	Captopril	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,01
TNFα	Salina	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01
	DIZE	0,22 ± 0,01	0,20 ± 0,01
	Captopril	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,0

Tabela 2: Níveis de IL-10, IL-1β e TNFα determinados a partir do lavado articular usando o ELISA. * $p < 0,05$ na comparação entre controle e induzido. MIA: monoiodoacetato de sódio.

Na Figura 25, é exposto fotomicrografias da reação imunohistoquímica para IL-10 na cartilagem e osso subcondral. Pode-se observar na imagem CTL/SAL marcação foi positiva, principalmente, nas zonas superficial e intermediária da cartilagem, e também nos osteócitos do osso subcondral. Na imagem MIA/SAL está reduzida a intensidade de marcação e a área com marcação, essa devido a uma parte da cartilagem está desprovida de condrócitos. Na imagem CTL/DIZE observa-se redução da intensidade de marcação e menos células positivas. E na MIA/DIZE redução da intensidade de marcação. Já na CTL/CAP observa-se aumento da intensidade de marcação de área marcada. E no MIA/CAP menor área marcada.

Na Figura 26, é exposto fotomicrografias da reação imunohistoquímica para TNF-α na cartilagem e osso subcondral. O padrão de expressão nos grupos foi similar ao anterior apresentado. Porém, houve redução na intensidade de marcação, comparado com as fotomicrografias da reação para IL-10, que esta bem evidente no grupo MIA/DIZE.

As Figuras 27 e 28 apresentam fotomicrografias da reação imunohistoquímica para IL-10 e TNF-α, respectivamente, no tecido sinovial. Na figura 27, CTL/SAL, a marcação no tecido sinovial foi bem forte na região revestimento sinovial (intima), indicado com uma seta, já no substrato de tecido conjuntivo (a subintima) a marcação foi menos intensa,

indicado com uma barra. Em MIA/SAL, apesar do espessamento do revestimento sinovial, observa-se intensidade de marcação reduzida nesse. Nas imagens CTL e MIA/DIZE pode-se notar intensidade mais fraca da marcação imunohistoquímica, em relação aos grupos SAL. Por último, as imagens CTL e MIA/CAP também parecem ter uma marcação um pouco mais fraca em relação aos grupos salina. Na Figura 28, observa-se, que o padrão de expressão no revestimento sinovial para os grupos CTL/SAL e MIA/SAL foi o oposto do descrito para IL-10 na Figura 27, pois há aumento da expressão na fotomicrografia do animal MIA em relação ao CTL. Os demais grupos tiveram padrão de expressão do TNF- α similar ao apresentado em IL-10.

A Figura 29 mostra a quantificação dos ensaios realizados quanto à área marcada e intensidade de marcação. A análise morfométrica da imunohistoquímica para IL-10 demonstrou que o tratamento do controle com Captopril resultou em um aumento da área marcada (Figura 29A). A porcentagem da área positiva para esta citocina estava inalterada tanto nos animais OA não tratados quanto naqueles tratados com Captopril ou DIZE (Figura 29A). Nenhuma alteração significativa foi observada na área marcada com TNF- α nos diferentes grupos (Figura 29E). Já em relação à intensidade da marcação, o tratamento com DIZE reduziu a intensidade de marcação da IL-10 e TNF- α nos animais MIA, quando foi realizada a análise do tecido cartilaginoso (Figuras 20B e 20F). Este resultado com o DIZE foi similar quando se considerou uma análise abrangendo, além da cartilagem e o osso subcondral (Figuras 29C e 29G). Quanto ao tecido sinovial não foi verificada variação significativa para IL-10 e TNF- α , a não preservação histológica da sinóvia em dois grupos controle prejudicou a análise (Figuras 29D e 29H). O tratamento com Captopril não promoveu alteração significativa no parâmetro de intensidade de marcação.

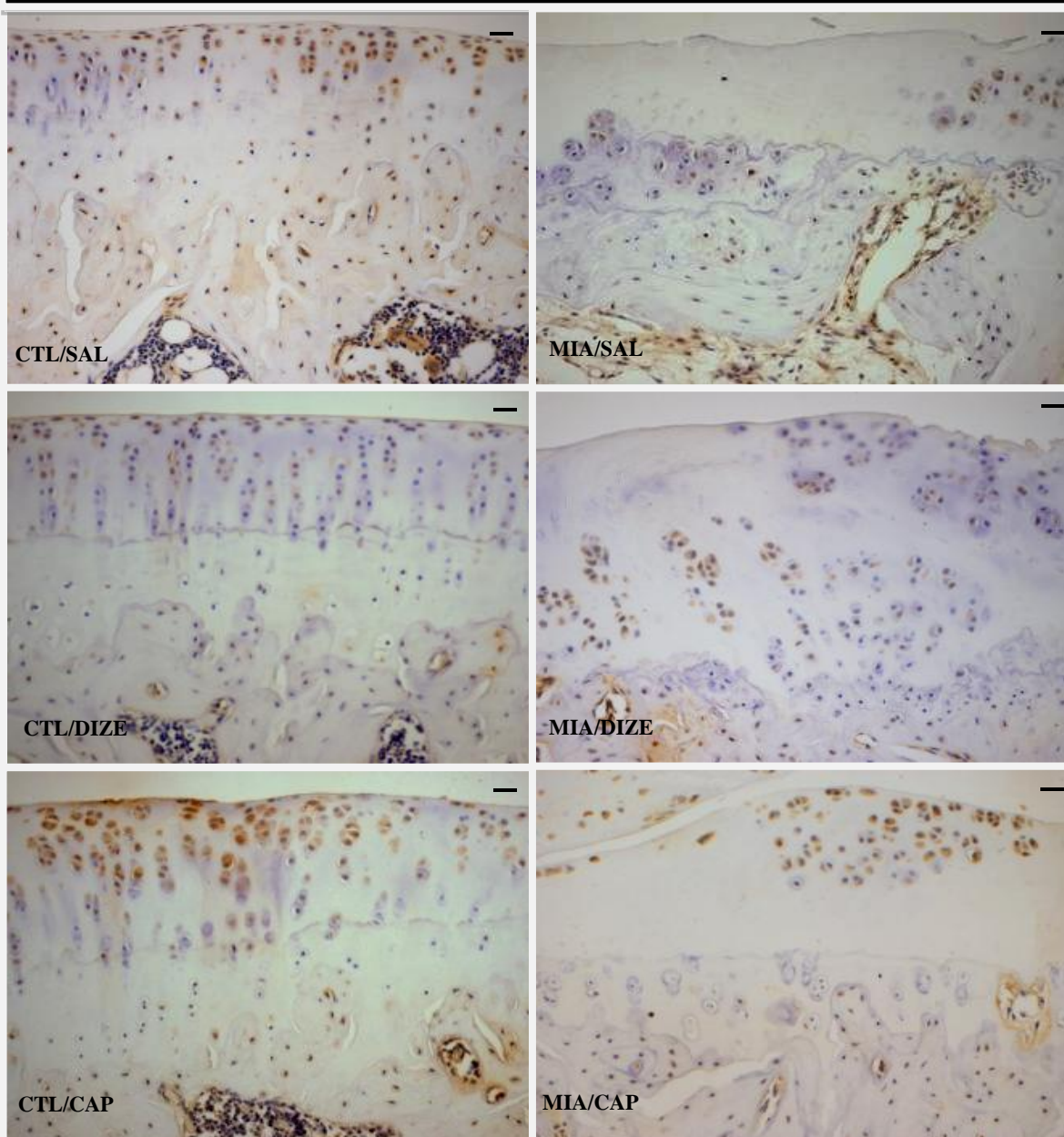
IL-10 - Cartilagem e osso subcondral

Figura 25: Fotomicrografias representativas da cartilagem e osso subcondral em preparação de imunohistoquímica para IL-10. Tratamentos: salina (SAL), aceturato de diminazeno (DIZE), Captopril (CAP). Induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles (CTL). Barra: 100 μ m.

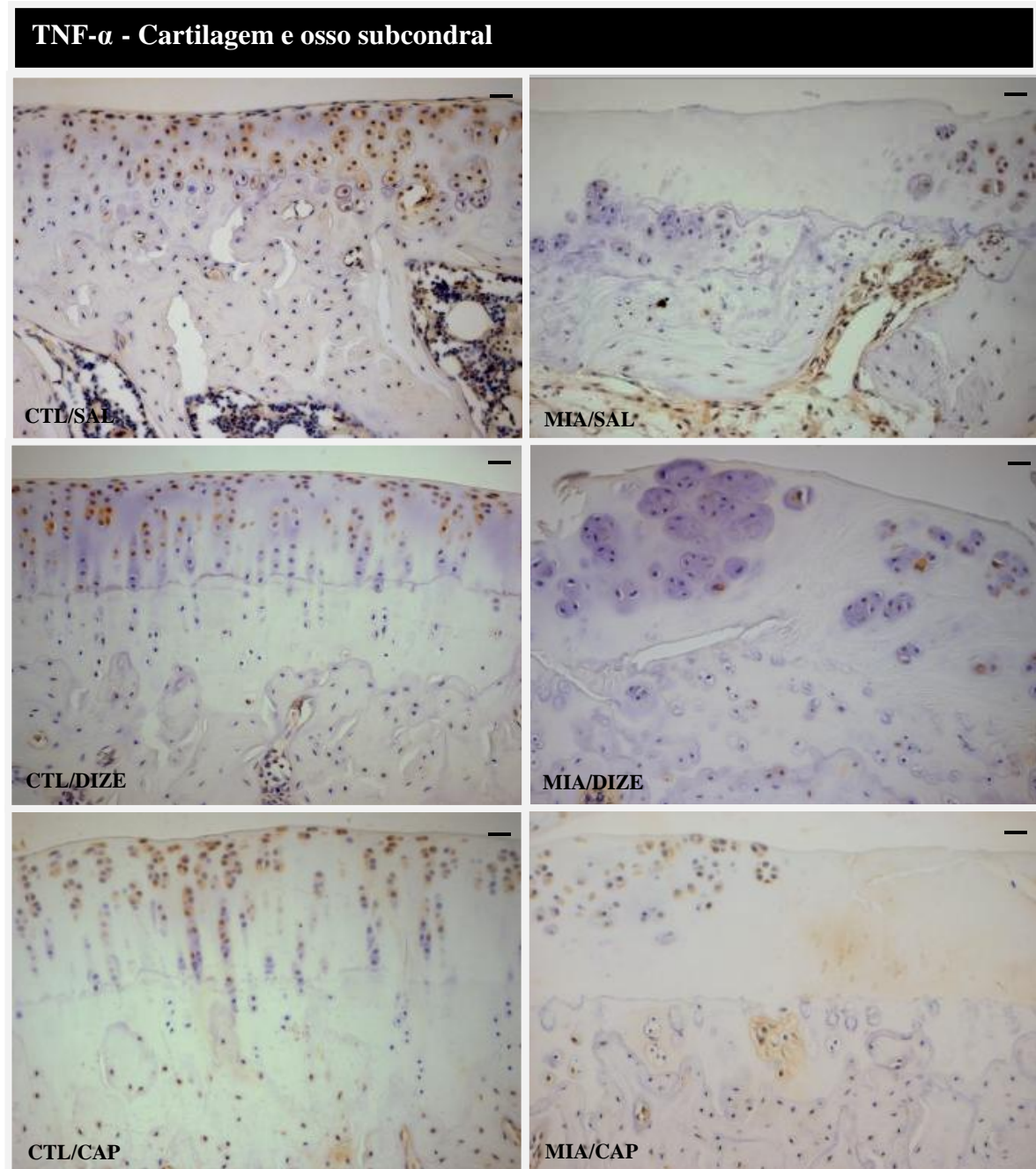


Figura 26: Fotomicrografias representativas da cartilagem e osso subcondral em preparação de imunohistoquímica para TNF- α . Tratamentos: salina (SAL), aceturato de diminazeno (DIZE), Captopril (CAP). Induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles (CTL). Barra: 100 μ m.

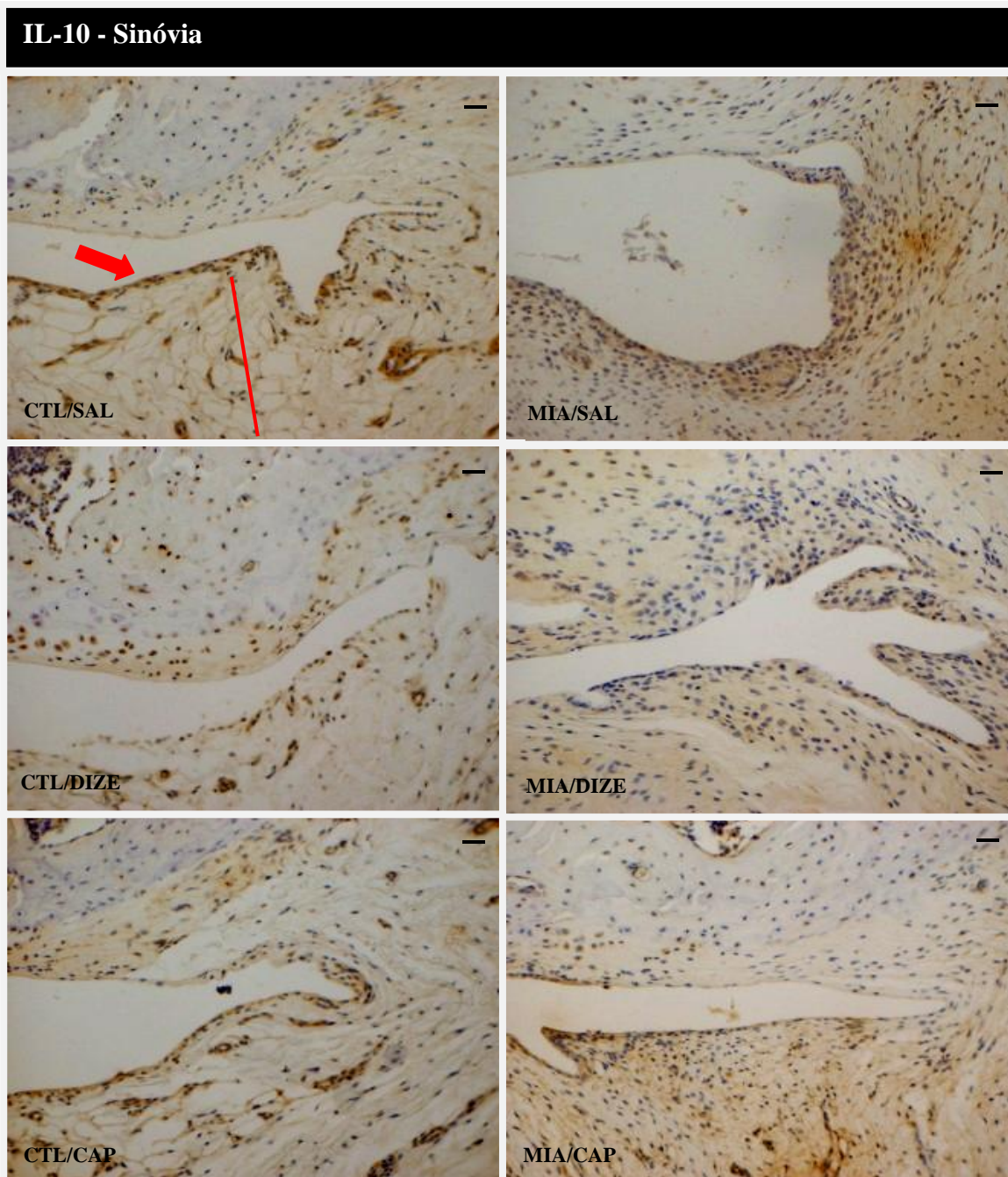


Figura 27: Fotomicrografias representativas da sinóvia em preparação de imunohistoquímica para IL-10. Tratamentos: salina (SAL), aceturato de diminazeno (DIZE), Captopril (CAP). Induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles (CTL). Barra: 100 μ m.

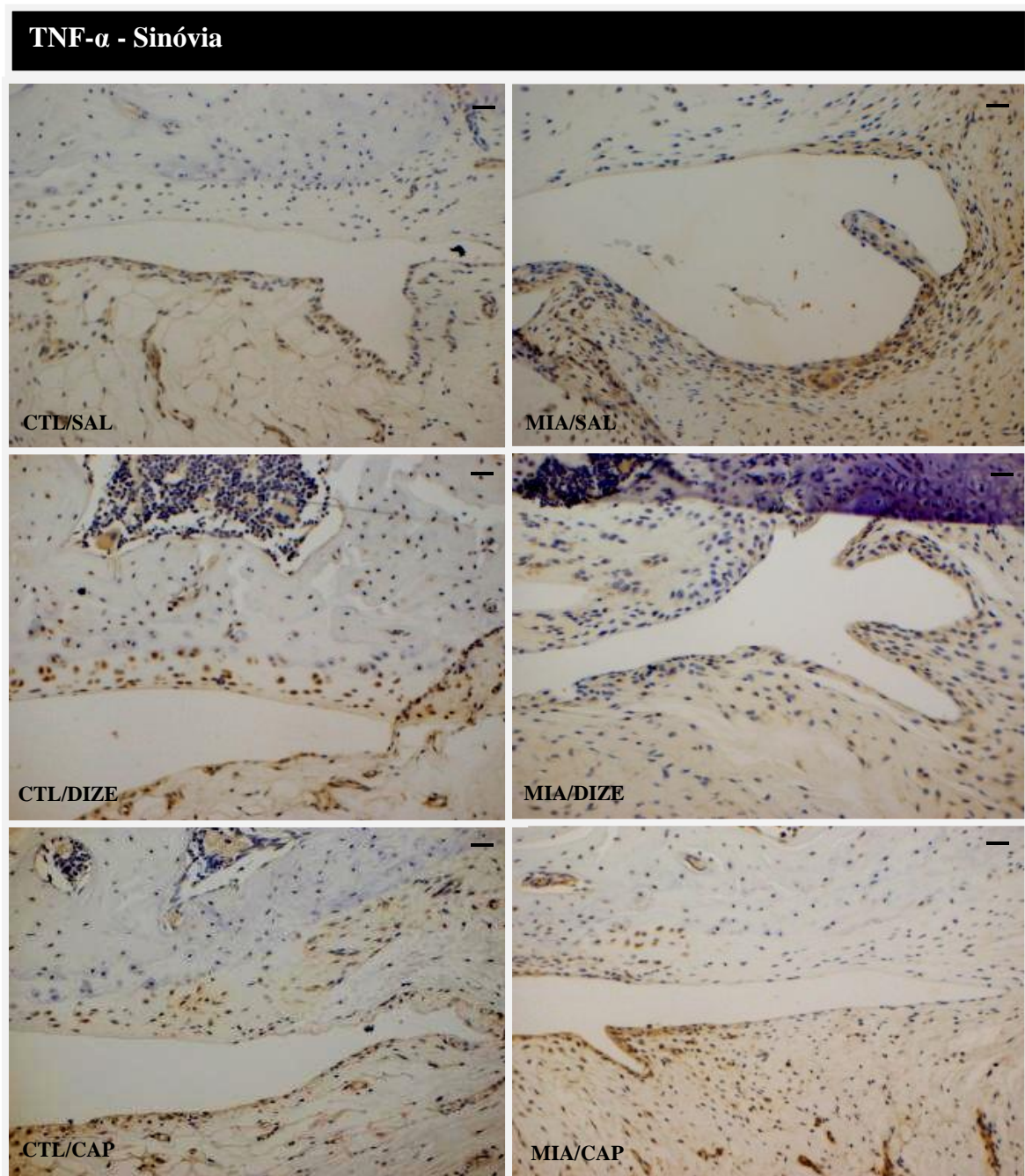


Figura 28: Fotomicrografias representativas da sinóvia em preparação de imunohistoquímica para TNF- α . Tratamentos: salina (SAL), acetato de diminazeno (DIZE), Captopril (CAP). Induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles (CTL). Barra: 100 μ m.

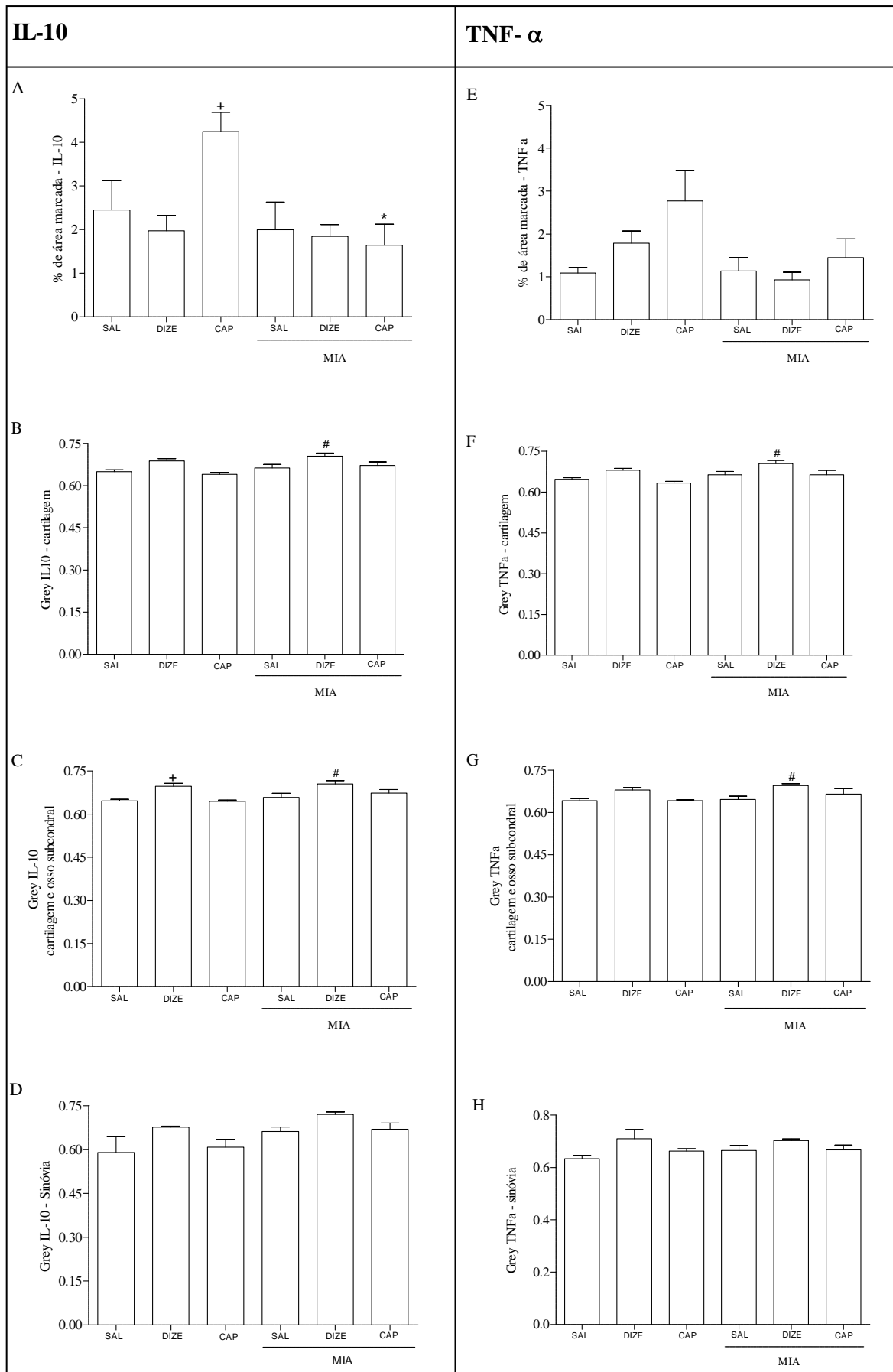


Figura 29: Avaliação da percentagem de área marcada (A e E) e da intensidade de marcação (B, C, D, F, G e H) de IL-10 e TNF- α após 8 semanas de tratamentos. Tratamentos: salina (SAL), aceturato de diminazeno (DIZE), Captopril (CAP). Induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA). Os valores são apresentados em média \pm SEM (n = 6 animais por grupo). ⁺p<0,05 vs CTL/SAL; *p<0,05 vs CTL/CAP e #p<0,05 vs MIA/SAL. Em D e H o n é igual a 3 para os grupos CTL/SAL e CTL/DIZE.

5.5 Histopatologia pós-tratamentos

A área de cartilagem hialina sobre a tibia foi avaliada morfometricamente e, como pode ser notado na Figura 30, todos os grupos MIA tiveram redução na área de cartilagem articular, de forma significativa, em relação a seu respectivo grupo controle. Mas, parece haver uma pequena recuperação dos animais MIA, tratados com Captopril, em relação aos tratados com salina. Entretanto, não houve diferença estatística significativa nessa comparação.

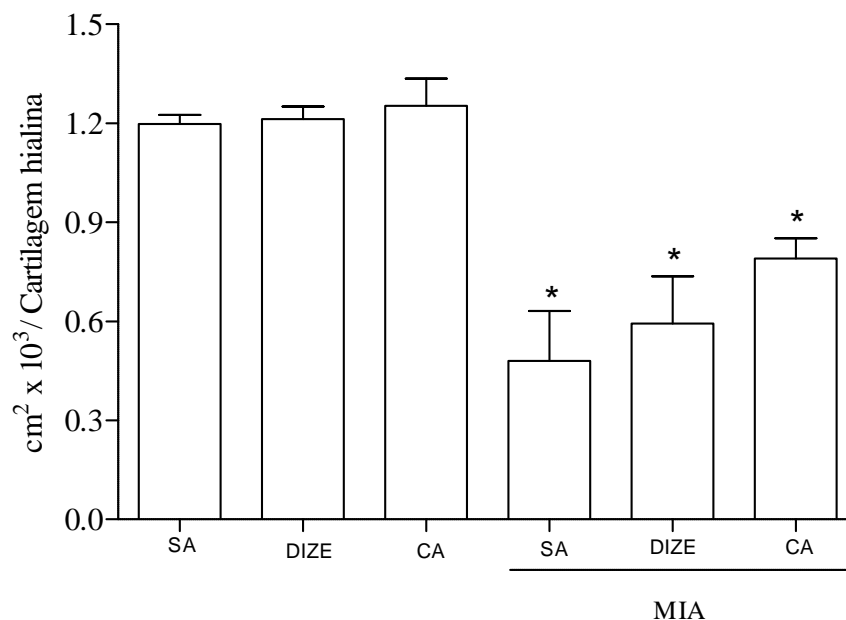


Figura 30: Área de tecido cartilaginoso hialino sobre tibia pós-tratamentos. Comparação entre grupos após 8 semanas de tratamentos: salina (SAL), aceturato de diminazeno (DIZE), Losartan (LOS), Captopril (CAP), Captopril e L-NAME (CAP+LN). Induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA). Os valores são apresentados em média \pm SEM (n = 7 animais por grupo). *p<0,05 grupos MIA vs. seu respectivo controle.

As alterações osteoartriticas após 12 semanas de indução foram variáveis, como pode ser observado na Figura 31. A erosão ocorreu em diversos níveis, como pode ser observado na Figura 31 B, C, D e E. O comprimento das regiões com erosão por desnudamento foi avaliado. Houve muita variação dentro de cada grupo experimental quanto ao desenvolvimento desta alteração. Contudo, pode-se perceber que os animais MIA tratados com Captopril tiveram uma tendência menor para desenvolver erosão, por

desnudamento, em relação aos tratados com salina ou DIZE (Figura 32). Tentativas de reparação tecidual também foram observadas (Figuras 31G e H) O desenvolvimento de tecido fibrocartilaginoso foi avaliado, mas assim como a erosão não houve homogeneidade dentro dos grupos. Enquanto alguns animais produziram muito tecido de substituição outros não produziram nada. Como consequência, a variabilidade foi grande o que impediu o aparecimento de alguma diferença entre os grupos. A média e SEM dos animais induzidos foram: MIA/SAL ($4,70 \pm 3,03 \text{ cm}^2 \times 10^3$), MIA/DIZE ($5,46 \pm 2,51 \text{ cm}^2 \times 10^3$) e MIA/CAP ($3,67 \pm 2,46 \text{ cm}^2 \times 10^3$). Além das alterações exibidas Figura 31 também foi visto fissuras verticais superficiais e profundas, desorientação de condrons e remodelamento do osso subcondral.

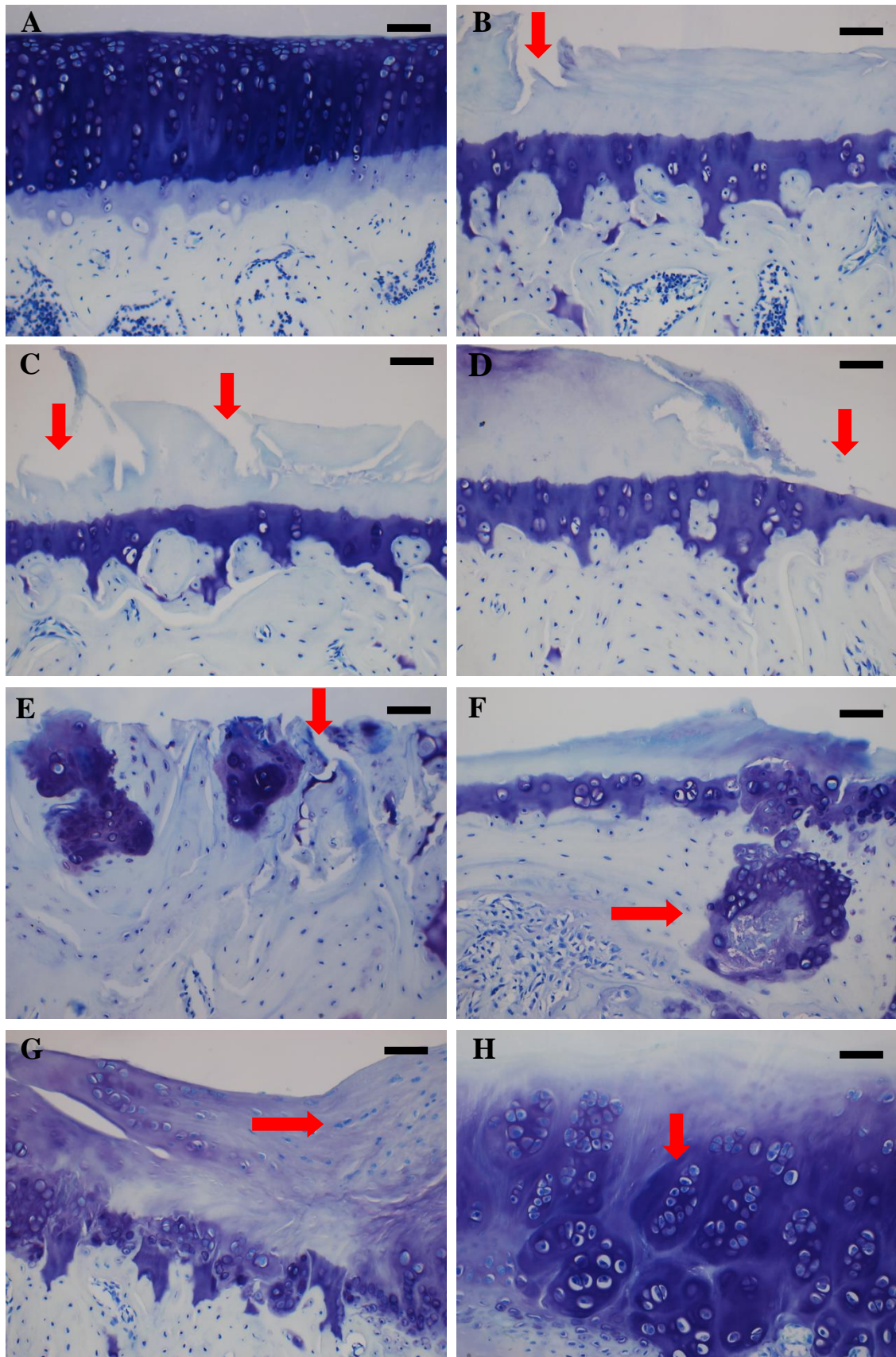


Figura 31: Alterações histopatológicas na cartilagem após 12 semanas de indução da OA. (A) cartilagem animal CTL e (B-H) cartilagem animais MIA. Em (A) observa-se que a arquitetura do tecido cartilaginoso

hialino está preservada. Em (B) a seta aponta uma região de erosão na cartilagem, pelo processo de delaminação, além disso, ausência de condrócitos na cartilagem acima da “Tide mark”. Em (C) setas apontam regiões de erosão na cartilagem, pelo processo de escavação. Em (D) seta aponta região de erosão por desnudamento no nível da cartilagem calcificada. Em (E) também está representada uma região de erosão por desnudamento, mas ao nível do osso subcondral, seta aponta microfratura óssea. Em (F) seta aponta cisto no osso subcondral. As Fotomicrografias (G) e (H) representam tentativa de recuperação do tecido, em (G) seta aponta deposição de tecido fibrocartilaginoso sobre a superfície tibial e (H) observa-se um aglomerado de clusters, seta apontando um cluster. Barra: 100 μ m.

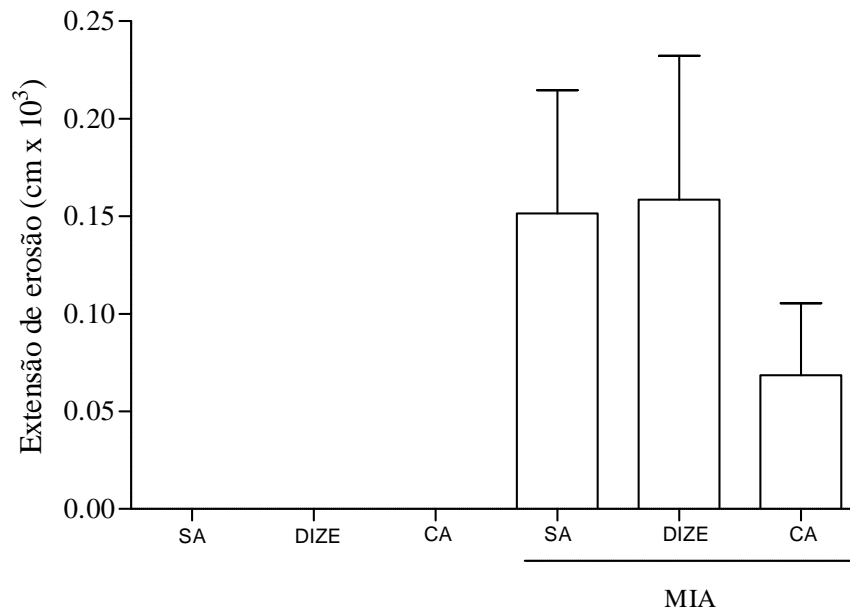


Figura 32: Extensão da erosão da cartilagem hialina sobre a tibia após 8 semanas de tratamentos. Salina (SAL), aceturato de diminazeno (DIZE) e Captopril (CAP). Animais induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles. Os valores são apresentados como média \pm SEM. (n = 7 animais por grupo) Não houve diferença estatística entre os grupos.

Na figura 33A observa-se que todos os grupos MIA apresentaram maiores valores de densidade óptica (expressa em Grey), indicando perda de proteoglicanos nos animais induzidos em relação a seus controles. Os tratamentos com Captopril ou DIZE não alteraram de forma significativa a produção de proteoglicanos. Para avaliar se a perda de proteoglicanos após 4 semanas de indução era diferente daquela observada após 12 semanas, os grupos controle e induzido foram comparados nestes tempos. Observa-se na Figura 33B uma discreta diminuição de proteoglicanos no tempo de 12 semanas nos animais controles e um aumento nos animais induzidos, porém tais variações não foram significativas.

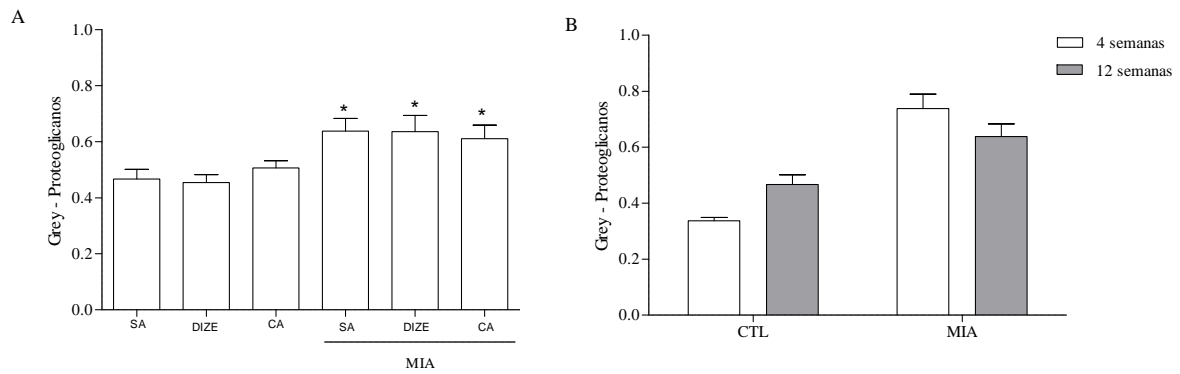


Figura 33: Presença de proteoglicanos evidenciada pela marcação com azul de Toluidina. (A) Comparação entre os grupos após 8 semanas dos tratamentos. Salina (SAL), acetato de diminazeno (DIZE) e Captopril (CAP). Animais induzidos com monoiodoacetato de sódio (MIA) e controles. (B) Comparação da perda de proteoglicanos entre as semanas 4 e 12. Os valores são expressos como média ± SEM [n = 7 animais por grupo em (A) e n = 4 e 7 animais para 4 e 12 semanas, respectivamente, em (B)]. *p<0,05 vs. o seu respectivo controle.

Mesmo em um estágio avançado de OA, o processo de calcificação da cartilagem não foi uma alteração comum, entretanto ele foi eventualmente observado. A proliferação de vasos junto ao tecido cartilaginoso e sua substituição por tecido ósseo pode ser observada na Figura 34.

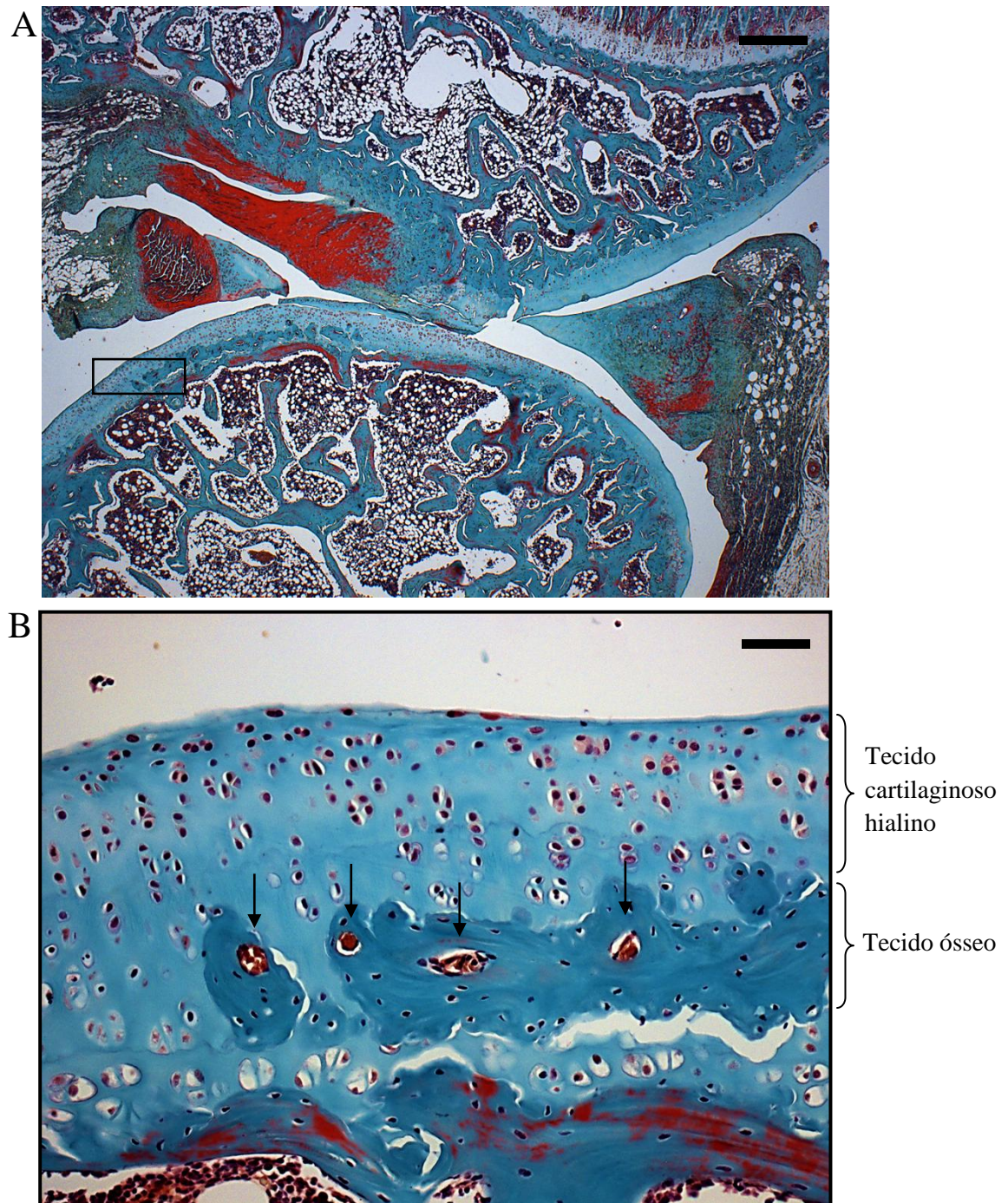


Figura 34: Cartilagem hialina articular em processo de calcificação. Animal MIA/SAL após 12 semanas de indução. Setas indicam vasos sanguíneos. Coloração em Tricrômico de Gomori. Barra: 100µm.

6 DISCUSSÃO

A escolha de terapêuticas para pacientes idosos é muito complexa, principalmente, por ser comum a presença de comorbidades nessa etapa da vida do indivíduo (Singh et al, 2002; White, 2009). O tratamento para uma determinada doença pode alterar o curso patofisiológico de outra. Logo, o estudo da interferência de terapêuticas em doenças altamente prevalentes em idosos, como a HAS e a OA, é de grande importância (Collerton et al, 2009). Neste trabalho, nós investigamos os efeitos do Captopril, um iECA amplamente utilizado no controle da HAS, e do DIZE, um ativador da ECA2, na OA de joelho, focando nos aspectos inflamatório e histopatológico.

O modelo de OA por MIA foi escolhido em função do fator tempo, pois é considerado um modelo que reproduz rapidamente as características clínicas e patológicas da OA (Guzman et al, 2003). A aplicação de 2mg de MIA levou a uma resposta inflamatória aguda e crônica. Primeiramente observamos a formação de edema articular após 12 e 24 horas de indução da OA. No tempo de 12 horas também foi observado o pico da IL-6. Essa citocina desempenha um papel chave na resposta inflamatória de fase aguda, alterando a natureza do infiltrado inflamatório, de neutrófilos para macrófagos (Gabay, 2006). Além disso, contribui para a manifestação clínica da dor, especialmente na fase inicial da OA (Shimura et al, 2013). O achado sugere que a IL-6 também participa da sinalização para acúmulo de líquido na cavidade articular, após estímulo flogogênico com MIA. Além disso, também observamos que o pico de leucócitos na cavidade articular acontece com 72 horas de indução da OA com MIA. Corroborando com o nosso trabalho, Clements et al (2009), utilizou o mesmo modelo de OA, e também verificou que o pico dos leucócitos ocorre no tempo de 72 horas. Porém, há algumas diferenças entre os trabalhos, neste trabalho a cinética de migração foi realizada a partir do lavado articular, já Clements et al (2009) utilizou o coxim adiposo infrapatelar. E enquanto observamos que há uma redução do número de leucócitos após o terceiro dia de indução, porém, continua havendo significância estatística em todos os seguintes tempos de medição (7, 14, 21 e 28 dias) realizados. No trabalho de Clements et al (2009) os os monócitos apresentaram diferença estatística apenas até o sétimo dia de medição. Tal divergência pode estar relacionada à quantidade de MIA utilizada, pois no estudo de Clements et al (2009) usou-se 1mg, que é considerada uma quantidade baixa. Ao contrário, nós utilizamos 2mg, que é considerada alta (Thakur et al, 2012). Isto é um indicativo de que quantidades diferentes do MIA

podem levar a diferenças no processo de resolução da inflamação articular. Os dados referentes ao infiltrado inflamatório na sinóvia indicam que a inflamação articular volta a aumentar no tempo de 28 dias de indução. Possivelmente, pelo estímulo dos debris provenientes da degeneração do tecido cartilaginoso hialino, que se intensifica nesse tempo. Esse aumento da inflamação pode ainda contribuir para uma maior degeneração da matriz cartilaginosa. O que vai de encontro com a compreensão atual, de que o componente inflamatório da OA é determinante para a degradação da matriz cartilaginosa (Berenbaum, 2013; Loeser, 2009).

A progressão inicial da OA ocorre com envolvimento focal da cartilagem, pela distribuição diferenciada das forças mecânica. Com a progressão as alterações são observadas em porções contínuas da cartilagem, até que, na OA avançada toda a superfície articular está envolvida (Pritzker et al, 2005). O modelo de OA por MIA levou à alterações degenerativas gradativas na MEC e nos condrócitos da cartilagem hialina. Tais alterações, como a perda de proteoglicanos e a morte celular, foram progressivas, tornando-se mais significativas nas medidas de 14, 21 e 28 dias. Janusz et al (2004) também evidenciou em modelo de OA por MIA que a perda de proteoglicanos tem um caráter progressivo no modelo. A perda de proteoglicanos na OA é tida como uma consistente característica patogênica e ocorre principalmente pela ação das MMPs (Knudson & Knudson, 2001). A atividade das MMPs é aumentada pela produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Katz et al, 2010; Hasseb, Haqqi, 2013). Entretanto as citocinas avaliadas (IL-10 e IL-6) sofreram alteração apenas na fase de inflamação aguda do modelo. Indicando que outras citocinas podem estar envolvidas no processo de inflamação-degeneração da OA no modelo por MIA. O desenvolvimento de dor no modelo de OA por MIA é complexo e envolve diferentes citocinas pró-inflamatórias. Na fase dita dor inflamatória (dia 3), foi identificado por Bowles et al (2013) que há uma maior atividade do NF- κ B e que essa atividade é fortemente correlacionada com os níveis séricos de IL-6 e com a alodonia mecânica. Além disso, os níveis de IL-1 β foram fortemente correlacionados com a sensibilidade da dor na fase crônica do modelo (dia 28) (Bowles et al, 2013). Recentemente, a quantidade de 2mg utilizada para induzir a OA foi associada a um maior grau de lesão neuronal e/ou sensibilização central (Thakur et al, 2012). Sabe-se que em alguns indivíduos a dor osteoartrítica advém da disfunção do controle inibitório descendente ou da alteração no processamento cortical de informações nocivas (Dray & Read, 2007). Esses fatos dificultam a interpretação da avaliação de terapêuticas

farmacológicas na hiperalgesia nos modelos de OA. Nossos resultados mostraram que o modelo de OA por MIA com 2mg produziu uma clara resposta álgica nos animais, sustentada ao longo do tempo.

Nenhum dos tratamentos realizado (Captopril, Losartan, DIZE, L-NAME + Captopril) foi capaz de inibir ou atenuar o quadro álgico, apesar de haver evidência científica do efeito analgésico da Ang-(1-7) e do bloqueio do AT1 em outros modelos de artrite (Silveira et al, 2010; Silveira et al, 2013). A dor nos animais controle, tratados com Captopril, mostrou certa tendência à hipersensibilidade ao estímulo da ponteira na pata. Isto pode ser em decorrência do aumento de BK circulante uma vez que o Captopril aumenta os níveis deste peptídeo (Norris et al, 2010; Meini & Maggi, 2008). No entanto, os animais MIA tratados com Captopril tiveram resposta similar aos animais MIA controle, o que torna improvável a participação da BK neste modelo de OA. Apesar da redução do número de células inflamatórias na cavidade articular causada pelo Captopril e pelo Losartan, não foi possível observar alteração no limiar de retirada da pata. A grande quantidade de MIA utilizada pode ter contribuído para este resultado, tendo em vista sua associação com alterações neuropáticas (Thakur et al, 2012).

O tratamento com o ativador da ECA2, DIZE, não alterou o número de macrófagos na cavidade articular, mas reduziu a expressão tanto do TNF- α quanto do IL-10. Sabe-se que a ativação da ECA2 leva ao aumento dos níveis de seu principal produto, a Ang-(1-7) (Ferreira et al, 2012). Esse peptídeo, por sua vez, pode modular a resposta inflamatória em macrófagos, levando a uma menor expressão de citocinas como IL-6 e TNF- α (Souza & Costa-Neto, 2012). Assim, como os macrófagos são o principal tipo celular associado ao processo patofisiológico da OA (Haseeb & Haqqi, 2013), esperávamos encontrar efeitos benéficos com o tratamento com o DIZE. Além disso, em outro modelo de artrite, artrite induzida por adjuvante, foi verificada que a ativação do Mas [receptor da Ang-(1-7)] reduziu o influxo de neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Silveira et al, 2010). A divergência entre os nossos achados com estes dados pode ser atribuída à natureza complexa da patogênese da OA, não sendo incomuns respostas diferentes nas terapias farmacológicas quando utilizadas na OA e na AR (Haseeb & Haqqi, 2013). A concentração do DIZE utilizada também pode ter influenciado nesses resultados, uma vez que a quantidade de Ang-(1-7) gerada é proporcional à quantidade do DIZE administrado.

A utilização do iECA, Captopril, por 8 semanas em animais com OA levou a uma redução significativa da população de macrófagos na cavidade articular. Quando

associamos o uso do L-NAME ao Captopril, observamos uma reversão parcial deste efeito. É importante ressaltar que o L-NAME não bloqueou completamente os efeitos do Captopril em relação aos parâmetros inflamatórios, indicando, assim, que outros mecanismos de ação desse iECA contribuíram para tal efeito protetor. Como não houve mudanças significativas na expressão e nos níveis de TNF- α e IL-10 no tratamento com Captopril, pode-se inferir que sua ação na OA de joelho não está relacionado a sua modulação. Para avaliar se os efeitos anti-inflamatórios do Captopril foram causados pela inibição direta da ECA ou pela inibição do SRA, utilizamos o Losartan que bloqueia o SRA sem inibir a ECA. Os nossos dados indicaram que a inibição da ECA por si só não foi a responsável pelos efeitos benéficos na OA no nosso modelo, uma vez que o Losartan promoveu redução similar da migração de leucócitos para a cavidade articular.

As alterações morfológicas nos animais MIA após 12 semanas de indução foram variáveis, o que dificultou a análise histopatológica. O aumento do número de animais por grupo talvez seja uma medida que permita uma melhor comparação de tratamentos no modelo de OA por MIA. Outra questão a se ponderar é a expressão do receptor AT1 em condrócitos, pois ela é bem variável em pacientes com OA e AR (Kawakami et al, 2012). Essa característica da patologia pode ter contribuído para a variabilidade em alguns resultados. Apesar da variabilidade no desenvolvimento de alterações foi visto que a inibição da ECA, de forma crônica, leva a um pequeno efeito condroprotetor. Isso vai de encontro às recentes evidências de que ON tem um papel protetor na OA (Abramson, 2008). Contudo, como houve um bloqueio parcial do efeito anti-inflamatório do Captopril pelo L-NAME, os efeitos condroprotetores podem estar relacionado a diferentes vias de ação desse iECA. Por exemplo, a tendência ao desenvolvimento de menos tecido fibrocartilaginoso pode estar relacionado ao aumento da concentração plasmática N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina, que é um inibidor natural da proliferação de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes. Tal efeito dos iECAs já foi identificado em outros modelos de patologia (Peng et al, 2005). Por fim, considerando que no momento em que se deu o início ao tratamento com Captopril já havia alterações histológicas significativas na cartilagem, podemos sugerir que o nosso protocolo pode ter limitado a capacidade de regeneração do tecido induzido pelo Captopril.

7 CONCLUSÃO

O modelo de OA induzido por MIA mostrou ser conveniente para o estudo desta doença, uma vez que as alterações patofisiológicas foram condizentes com as que ocorrem na doença em humanos. Neste trabalho foi possível verificar que as ECAs modulam os parâmetros inflamatórios e histopatológicos da OA. O tratamento com Captopril mostrou ser uma possível estratégia de controle da inflamação na OA, além de ter levado a um pequeno efeito condroprotetor. Esse resultado foi, possivelmente, limitado pela dose de MIA usada para induzir a OA e pelo longo tempo pós-indução da OA para o início dos tratamentos. Assim, é necessário verificar se o ajuste destes parâmetros pode refletir em efeitos condroprotetores mais significativos.

REFERÊNCIAS

Abramson S, Krasnokutsky S. Biomarkers in Osteoarthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. 2006; 64(1,2):77-81.

Abramson S. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2008; 10(Suppl 2):S2.

Arnold SA, Rivera LB, Carbon JG, Toombs JE, Chang C, Bradshaw AD, et al. Losartan Slows Pancreatic Tumor Progression and Extends Survival of SPARC-Null Mice by Abrogating Aberrant TGF β Activation. *Plos One*. 2012 Feb; 7(2):e31384.

Attur M, Krasnokutsky-Samuels S, Samuels J, Abramson SB. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2013 Jan; 25(1):136-44.

Bar-Yehuda S, Rath-Wolfson L, Del Valle L, Ochaion A, Cohen S, Patoka R, et al. Induction of an antiinflammatory effect and prevention of cartilage damage in rat knee osteoarthritis by CF101 treatment. *Arthritis & Rheumatism*. 2009 Oct; 60(10):3061-71.

Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskel Neuron Interact*. 2001 Jan; 1(4):363-76.

Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Research Society International*. 2013 Jan; 21(1):16-21.

Bian B, Kelton CML, Guo JJ, Wigle PR. ACE Inhibitor and ARB utilization and expenditures in the medicaid Fee-For-Service program from 1991 to 2008. *Journal of Managed Care Pharmacy*. 2010 Nov/Dec; 16(9):671-9.

Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011 Jun; 377(9783):2115-26.

Bitton R. The Economic Burden of Osteoarthritis. *Am J Manag Care* 2009 Sep; 15:S230-S235.

Bowles RD, Mata BA, Bell RD, Mwangi TK, Huebner JL, Kraus VB, Setton LA. In Vivo luminescent imaging of NF- κ B activity and serum cytokine levels predict pain sensitivities in a rodent model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2013 Mar; 66(3):637-46.

Brasil, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. *Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade para o Período 1980-2050, Revisão 2008*. [Acesso 09 abr. 2009]; Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/projecao.pdf>.

Brasil, Ministério da Saúde. *Saúde alerta para prevenção às doenças reumáticas*. Out 2011. [Acesso 12 nov. 2013]; Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/819->>>.

Burks TN, Andres-Mateos E, Marx R, Mejias R, Erp CV, Simmers JL, et al. Losartan Restores Skeletal Muscle Remodeling and Protects Against Disuse Atrophy in Sarcopenia. *Sci Transl Med*. 2011 May; 3(82):82ra37.

Costa CX; Nunes AC; Ferreira AJ, Gomes MA, Caliarí MV. Entamoeba histolytica and E. dispar trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. *Parasites & Vectors*. 2010 Mar; 3:23.

Cat AND, Touyz RM. A new look at the renin-angiotensin system-Focusing on the vascular system. *Peptides*. 2011 Sep; 32:2141-2150.

Cecil. Tratado de Medicina Interna. Vol II. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. Cap 287. Doenças Musculoesqueléticas e do Tecido Conjuntivo. p. 1980-1985.

Chan KKW, Wu RWK. Symptoms, Signs and Quality of Life (QoL) in Osteoarthritis (OA). *InTech*. 2012 Feb; 25-41.

Chua SDJr, Messier SP, Legault C, Lenz ME, Thonar EJ-MA, Loeser RF. Effect of an exercise and dietary intervention on serum biomarkers in overweight and obese adults with osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2008 Feb; 16:1047-1053.

Clarke KA, Heitmeyer SA, Smith AG, Taiwo YO. Gait Analysis in a Rat Model of Osteoarthrosis. *Physiology & Behavior*. 1997 Feb; 62(5):95-54.

Clements KM, Bally AD, Jonesz HB, Brinckmann S, Read SJ, Murray F. Cellular and histopathological changes in the infrapatellar fat pad in the monoiodoacetate model of osteoarthritis pain. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009 Jun; 17: 805-812.

Collerton J, Davies K, Jagger C, Kingston A, Bond J, Eccles MP, et al. Health and disease in 85 year olds: baseline findings from the Newcastle 85+ cohort study. *BMJ*. 2009 Dec; 399:b4904.

Çobankara V, Oztürk MA, Kiraz S, Ertenli I, Haznedaroglu IC, Pay S, et al. Renin and angiotensin-converting enzyme (ACE) as active components of the local synovial renin-angiotensin system in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2005 May; 25(4):285-91.

Coutinho DC, Foureaux G, Rodrigues KD, Salles RL, Moraes PL, Murça TM, et al. Cardiovascular effects of angiotensin A: A novel peptide of the renin-angiotensin system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2013 Feb.

Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, Chaudhuri A. Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *Journal of Human Hypertension*. 2007 Jan; 21:20-27.

Dean MF, Sansom P. Link peptide cartilage growth factor is degraded by membrane proteinases. *Biochem. J*. 2000 Apr; 349:473-479.

- Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Howell DS, Woessner JJr. Evidence for Metalloproteinase and Metalloproteinase Inhibitor Imbalance in Human Osteoarthritic Cartilage. *J. Clin. Invest.* 1989 Aug; 84:678-685.
- Dijkgraaf LC, Bont LM, Boering G, Liem RB. The Structure, Biochemistry, and Metabolism of Osteoarthritic Cartilage: A Review of the Literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995 Aug; 53:1182-1192.
- Dray A, Read SJ. Future targets to control osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther.* 2007 May; 9(3):212.
- Dunhan J, Hoedt-Schmidt S, Kalbhen DA. Prolonged effect of iodoacetate on articular cartilage and its modification by an anti-rheumatic drug. *Int J Exp Path.* 1993 Jun; 74(3):283-289.
- Espanha MM. Cartilagem articular: estrutura e composição histoquímica. *Acta Reumatol Port.* 2010; 35:424-433.
- Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors. *Annals of Internal Medicine.* 2000 Oct; 133(8):637-639.
- Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, Fox A, Rediske J, Pellas T, et al. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain.* 2004 Nov; 112:83-93.
- Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, Fraga-Silva RA, Santos RAS, Katovich JM, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activation Protects Against Hypertension-Induced Cardiac Fibrosis Involving Extracellular Signal-Regulated Kinases. *Exp Physiol.* 2011 Mar; 96(3):287-294.
- Ferreira AJ, Murça TM, Fraga-Silva RA, Castro CH, Raizada KM, Santos RS. New Cardiovascular and Pulmonary Therapeutic Strategies Based on the Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin-(1-7)/Mas Receptor Axis. *Int J Hypertens.* 2012 Jan; 2012:147825.
- Findlay DM. Vascular pathology and osteoarthritis. *Rheumatology.* 2007 Dec; 46:1763-1768.
- Flammer AJ, Sudano IS, Hermann F, Gay S, Forster A, Neidhart M, et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Improves Vascular Function in Rheumatoid Arthritis. *Circulation.* 2008 Apr; 117:2262-2269.
- Foureaux G, Nogueira JC, Nogueira BS, Fulgêncio GO, Menezes GB, Fernandes SO, et al. Antiglaucomatous Effects of the Activation of Intrinsic Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013 Jun; 54(6):4296-306.
- Gabay C. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2006; 8(Suppl 2):S3.

- Garcia P, Schwenzer S, Slotta JE, Scheuer C, Tami AE, Holstein JH, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation – role of a local renin-angiotensin system. *British Journal of Pharmacology*. 2010 Apr; 159(8): 1672-80.
- Garnero P, Ayral X, Rousseau J-C, Christgau S, Sandell LJ, Dougados M, et al. Uncoupling of Type II Collagen Synthesis and Degradation Predicts Progression of Joint Damage in Patients With Knee Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2002 Oct; 46(10): 2613-2624.
- Gordon CD, Stabler TV, Kraus VB. Variation in osteoarthritis biomarkers from activity not food consumption. *Clin Chim Acta*. 2008 Dec; 398(1-2):21-6.
- Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis and Cartilage* 2010 May; 18:S24eS34
- Grotle M, Hagen KB, Natvig B, Dahl FA, Kvien TK. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: An epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2008 Oct; 9(132):1-5.
- Guerrot D, Dussaule J-C, Mael-Ainin M, Xu-Dubois Y-C, Rondeau E, Chatziantoniou C, et al. Identification of Periostin as a Critical Marker of Progression/Reversal of Hypertensive Nephropathy. *PLoS One*. 2012 Mar; 7(3):e31974.
- Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, Terlain B, Netter P, Gillet P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1997 Sep; 40(9):1670-1679.
- Guzman RE, Evans MG, Bove S, Morenko B, Kilgore K. Mono-Iodoacetate-Induced Histologic Changes in Subchondral Bone and Articular Cartilage of Rat Femorotibial Joints: An Animal Model of Osteoarthritis. *Toxicologic Pathology*. 2003 Nov-Dec; 31(6):619-624.
- Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clinical Immunology*. 2013 Mar; 146(3):185-96.
- Helenius A, Kuhlbrandt W, Osterhelt D, Simons K. Membrane Structure. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 3th ed. New York: Garland Science Taylor e Francis Group; 2008. p. 617-50.
- Horton WE Jr, Bennion P, Yang L. Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006 Jul; 6(4):379-381.
- Cruz CI, Ruiz-Torres P, G-del Moral R, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D. Age-related progressive renal fibrosis in rats and its prevention with ACE inhibitors and taurine. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Jan; 278(1):F122-F129.

- Ishiyama Y, Gallagher PE, Averill DB, Tallant EA, Brosnihan KB, Ferrario CM . Upregulation of angiotensin-converting enzyme 2 after myocardial infarction by blockade of angiotensin II receptors. *Hypertension*. 2004 May; 43:970-976.
- Janusz MJ, Little CB, King LE, Hookfin EB, Brown KK, Heitmeyer SA, et al. Detection of aggrecanase- and MMP-generated catabolic neoepitopes in the rat iodoacetate model of cartilage degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Sep; 12(9):720-8.
- Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2009 Jun; 61(2):198-223.
- Jiang T, Gao L, Shi J, Lu J, Wang Y, Zhang Y. Angiotensin-(1-7) modulates renin-angiotensin system associated with reducing oxidative stress and attenuating neuronal apoptosis in the brain of hypertensive Rats. *Pharmacological Research*. 2013 Jan; 67(1):84-93.
- Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JWJ, Dieppe P, et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*. 2003 Jul; 62:1145-1155.
- Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obesity reviews*. 2012 Feb; 13(1):136-149.
- Katz JD, Agrawal S, Velasquez M. Getting to the heart of the matter: osteoarthritis takes its place as part of the metabolic syndrome. *Current Opinion in Rheumatology*. 2010 Sep; 22(5):512-9.
- Kawakami Y, Matsuo K, Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Shimizu H, et al. Expression of Angiotensin II Receptor-1 in Human Articular Chondrocytes. *Arthritis*. 2012 Dec; 2012:648537.
- Kma L, Gao F, Fish BL, Moulder JE, Jacobs ER, Medhora M. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors Mitigate Collagen Synthesis Induced by a Single Dose of Radiation to the Whole Thorax. *J. Radiat. Res*. 2012; 53(1):10-17.
- Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Cell & Developmental Biology*. 2001 Apr; 12(2):69-78.
- Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB. Osteoarthritis in 2007. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. 2007; 65(3):222-8.
- Kraus VB, Kepler TB, Stabler T, Renner J, Jordan J. First Qualification Study of Serum Biomarkers as Indicators of Total Body Burden of Osteoarthritis. *PLoS One*. 2010 Mar; 5(3):e9739.

- Kraus VB, Huebner JL, DeGroot J, Bendele A. The OARSI Histopathology Initiative - Recommendations for Histological Assessments of Osteoarthritis in the Guinea Pig. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Oct; 18(Suppl 3):S35-52.
- Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, et al. Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States. *Arthritis & Rheumatism*. 2008 Jan; 58(1):26-35.
- Lee YI, Pai M, Brederson JD, Wilcox D, Hsieh G, Jarvis MF, Bitner RS. Monosodium iodoacetate-induced joint pain is associated with increased phosphorylation of mitogen activated protein kinases in the rat spinal cord. *Mol Pain*. 2011 May 20; 7:39.
- Lippiello L, Hall D, Mankin HJ. Collagen Synthesis in Normal and Osteoarthritic Human Cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*. 1977 Apr; 59:593-600.
- Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, Cooper C. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *British Medical Bulletin*. 2013 Jan; 105:185-199.
- Liu J, Gong H, Zhang ZT, Wang Y. Effect of angiotensin II and angiotensin II type 1 receptor antagonist on the proliferation, contraction and collagen synthesis in rat hepatic stellate cells. *Chin Med J*. 2008 Jan; 121(2):161-165.
- Liu P, Okun A, Ren J, Guo RC, Ossipov MH, Xie J, et al. Ongoing Pain in the MIA Model of Osteoarthritis. *Neurosci Lett*. 2011 Apr; 493(3):72-5.
- Loeser RF. Aging and the development of Osteoarthritis: Not Just Wear and Tear. *Reumatol*. 2005; 21(3).
- Loeser RF. Molecular Mechanisms of Cartilage Destruction: Mechanics, Inflammatory Mediators, and Aging Collide. *Arthritis Rheum*. 2006 May; 54(5):1357-1360.
- Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2009 Mar; 17:971-979.
- Losina E, Walensky RP, Kessler CL, Emrani PS, Reichmann WM, Wright EA, et al. Cost-effectiveness of Total Knee Arthroplasty in the United States. *Arch Intern Med*. 2009 Jun; 169(12):1113-21.
- Losina E, Walensky RP, Reichmann WM, Holt HL, Gerlovin H, Solomon DH, et al. Impact of Obesity and Knee Osteoarthritis on Morbidity and Mortality in Older Americans. *Ann Intern Med*. 2011 Feb; 154(4):217-26.
- Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, Sah R, Terkeltaub R, D'Lima D. Cartilage Cell Clusters. *Arthritis Rheum*. 2010 Aug; 62(8):2206-18.
- Lundon K, Walker JM. Cartilage of Human Joint and Related Structures. In: Magee DJ, Zachazewski JE, Quillen WS. *Scientific Foundations and Principles of Practice In Musculoskeletal Rehabilitation* St Louis. São Paulo: Saunders Elsevier; 2007. p. 144-173.


- Männistö TK, Karvonen KE, Kerola TV, Ryhänen LJ. Inhibitory effect of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril and enalapril on the conversion of procollagen to collagen. *J Hypertens*. 2001 Oct; 19(10):1835-1839.
- March LM, Bagga H. Epidemiology of osteoarthritis in Australia. *Med J Aust*. 2004 Mar; 180(5):S6-10.
- Martin MFR, McKenna F, Bird HA, Surrall KE, Dixon JS, Wright V. Captopril: a new treatment for rheumatoid arthritis? *The Lancet* . 1984 Jun; 1(8390):1325-8.
- Mecca AP, Regenhardt RW, O'Connor TE, Joseph JP, Raizada MK, Katovich MJ, et al. Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Exp Physiol*. 2011 Oct ; 96(10):1084-1096.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul; 454(24):428-435.
- Meini S, Maggi CA. Knee osteoarthritis: a role for bradykinin? *Inflamm Res*. 2008 Aug; 57(8):351-61.
- Michaud CM, McKenn MT, Begg S, Tomijima N, Majmudar M, Bulzacchelli MT, et al. The burden of disease and injury in the United States 1996. *Popul Health Metr* 2006 Oct; 4:11.
- Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, et al. Lifetime Risk of Symptomatic Knee Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2008 Sep; 59(9):1207-1213.
- Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin*. 2013 Feb; 39(1):1-19.
- Norris S, Weinstein J, Peterson K, Thakurta S. Drug Class Review: Direct Renin Inhibitors, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, and Angiotensin II Receptor Blockers. Oregon Health & Science University. 2010 Jan. [Acesso 11 mar. 2012]; Disponível em: <<http://derp.ohsu.edu/about/final-products.cfm>>
- Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, Yanagitani Y, Takiuchi S, Moriguchi K, et al. Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *Journal of Hypertension*. 1999 Apr; 17(4):537-45.
- Parmet S, Lynn C, Glass RM. Osteoarthritis of the Knee. *JAMA*. 2003 Feb; 289(8):1068.
- Pattacini L, Casali B, Boiardi L, Pipitone N, Albertazzi L, Salvarani C. Angiotensin II protects fibroblast-like synoviocytes from apoptosis via the AT1-NF-kB pathway. *Rheumatology*. 2007 May; 46:1252-7.
- Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev*. 2006 Jul; 86(3):747-803.

- Pelletier J-P, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatism*. 2001 Jun; 44(6):1237-47.
- Peng H, Carretero OA, Liao TD, Peterson EL, Rhaleb NE. Role of N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline in the Antifibrotic and Anti-Inflammatory Effects of the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Captopril in Hypertension. *Hypertension*. 2007 Mar; 49(3):695-703.
- Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Nov; 19(11):1270-85.
- Peters H, Border WA, Noble, NA. Targeting TGF- β overexpression: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade in anti-Thy1 glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14(Suppl 4):22-3.
- Podowski M, Calvi C, Metzger S, Misono K, Poonyagariyagorn H, Lopez-Mercado A. Angiotensin receptor blockade attenuates cigarette smoke-induced lung injury and rescues lung architecture in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012 Jan; 122(1):229-40.
- Price A, Lockhart JC, Ferrell WR, Gsell W, McLean S, Sturrock RD. Angiotensin II Type 1 Receptor as a Novel Therapeutic Target in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2007 Feb; 56(2):441-7.
- Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Jan; 14(1):13-29.
- Puett, DW, Griffin, MR. Published trials of nonmedicinal and noninvasive therapies for hip and knee osteoarthritis. *Ann Intern Med*. 1994 Jul; 121(2):133-40.
- Ramos SG, Montenegro AP, Goissis G, Rossi MA. Captopril reduces collagen and mast cell and eosinophil accumulation in pig serum-induced rat liver fibrosis. *Pathology International*. 1994 Sep; 44(9):655-61.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II Activates Nuclear Transcription Factor κ B Through AT1 and AT2 in Vascular Smooth Muscle Cells: Molecular Mechanisms. *Circulation Research*. 2000 Jun; 86(12):1267-72.
- Sampaio, IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 3ª. Ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007, 267p.
- Scanzello CR. Pathologic and Pathogenic Processes in Osteoarthritis: The Effects of Synovitis. *HSSJ*. 2012 Feb; 8(1):20-2.
- Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Sachs D, Barroso LC, Costa VV, et al. Anti-Inflammatory Effects of the Activation of the Angiotensin-(1-7) Receptor, Mas, in Experimental Models of Arthritis. *J Immunol*. 2010 Nov; 185(9):5569-76.

- Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Sachs D, Barroso LC, Queiroz-Junior, et al. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. *Peptides*. 2013 Aug; 46:53-63.
- Shimura Y, Kurosawa H, Sugawara Y, Tsuchiya M, Sawa M, Kaneko H, et al. The factors associated with pain severity in patients with knee osteoarthritis vary according to the radiographic disease severity: a cross-sectional study. *Osteoarthritis Cartilage*. 2013 Sep; 21(9):1179-84.
- Singh G, Miller JD, Lee FH, Pettitt D, Russell MW. Prevalence of Cardiovascular Disease Risk Factors Among US Adults With Self-Reported Osteoarthritis: Data From the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *The American Journal of Managed Care*. 2002 Oct; 8(15):S383-S391.
- Souza LL, Costa-Neto CM. Angiotensin-(1-7) Decreases LPS-Induced Inflammatory Response in Macrophages. *J. Cell. Physiol*. 2012 May; 227(5):2117-22.
- Ströbel S, Loparic M, Wendt D, Schenk AD, Candrian C, Lindberg RL, et al. Anabolic and Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther*. 2010 Mar; 12(2):R34.
- Symmons D, Mathers C, Pflieger B. Global burden of osteoarthritis in the year 2000. In: *The Global Burden of Disease, 2001*. [Acesso 08 abr. 2009]; Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_osteoarthritis.pdf>.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010 Mar; 140, 805-20,
- Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, Alcalai R, Wang L, Wakimoto H, et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- β . *J Clin Invest*. 2010 Oct; 120(10):3520-9.
- Thakur M, Rahman W, Hobbs C, Dickenson AH, Bennett DL. Characterisation of a Peripheral Neuropathic Component of the Rat Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis. *PLoS One*. 2012 Mar; 7(3):e33730.
- Tikiz C, Utuk O, Pirildar T, Bayturan O, Bayindir P, Taneli F, et al. Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Statin Treatment on Inflammatory Markers and Endothelial Functions in Patients with Longterm Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol*. 2005 Nov; 32(11):2095-101.
- Whelton A, Fort JG, Puma JA, Normandin D, Bello AE, Verburg KM, et al. Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitors and Cardiorenal Function: A Randomized, Controlled Trial of Celecoxib and Rofecoxib in Older Hypertensive Osteoarthritis Patients. *Am J Ther*. 2001 Mar-Apr; 8(2):85-95.
- White WB. Hypertension Associated With Therapies to Treat Arthritis and Pain. *Hypertension*. 2004 Aug; 44(2):123-4.

- White WB. Defining the Problem of Treating the Patient with Hypertension and Arthritis Pain. *The American Journal of Medicine*. 2009 May; 122(5 Suppl):S3-9.
- World Health Organization (WHO). Disease incidence, prevalence and disability. In: *The Global Burden of Disease, 2004*. [Acesso 08 abr. 2009]; Disponível em: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf.
- World Health Organization (WHO). Chronic rheumatic conditions: Osteoarthritis. [Acesso 06 ago. 2013]; Disponível em: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>.
- Wilson W, Burken CV, Donkelaar CV, Buma P, Rietbergen BV, Huiskes R. Causes of Mechanically Induced Collagen Damage in Articular Cartilage. *J Orthop Res*. 2006 Feb; 24(2):220-8.
- Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II Type 1 Receptor Interaction Is a Major Regulator for Liver Fibrosis Development in Rats. *Hepatology*. 2001 Oct; 34(4Pt1):745-50.
- Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. 2010 Aug; 26(3):355-69.
- Zhu D, Tong Q, Liu W, Tian M, Xie W, Ji L, Shi J. Angiotensin (1-7) protects against stress-induced gastric lesions in rats. *Biochem Pharmacol*. 2013 Feb; 87(3):467-76.
- Zhuo JL, Li XC. New Insights and Perspectives on Intrarenal Renin-Angiotensin System: Focus on Intracrine/Intracellular Angiotensin II. *Peptides*. 2011 Jul; 32(7):1551-65.
- Zhuo Q, Yang W, Chen J, Wang Y. Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Dec; 8(12):729-37.
- Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983; 2:109-10.

ANEXOS



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Anderson José Ferreira,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO SRA NA RENOVAÇÃO DO COLÁGENO E NO PERFIL INFLAMATÓRIO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE, submetido a esta comissão pelo protocolo 344 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 21/11/2012.

Para acessar ao seu projeto clique no link:
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 22/11/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br