

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Morfologia**

**Tese de Doutorado**

**EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA  
DE ANGIOTENSINA NA OSTEOARTRITE  
EXPERIMENTAL EM RATOS**

GRAZIELLE AGUIAR DE SÁ

**EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA NA OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Julho/2018

GRAZIELLE AGUIAR DE SÁ

**EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE  
ANGIOTENSINA NA OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Co-orientador: Dr. Celso Martins Queiroz-Junior

Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais

Julho/2018



**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE**

**GRAZIELLE AGUIAR DE SÁ**

195/2018  
entrada  
1º/2014  
2014714155

Às **quatorze horas** do dia **30 de julho de 2018**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, "o trabalho final intitulado: **"EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA NA OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL EM RATOS"**, requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Anderson José Ferreira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Anderson José Ferreira	UFMG	APROVA DA
Dr. Celso Martins Queiroz Junior	UFMG	Aprovada
Dra. Danielle Carvalho de Oliveira Coutinho	UFMG	APROVADA
Dra. Walkyria N. Oliveira Sampaio	Universidade de Itaúna	Aprovada
Dra. Magda Francisca Gonçalves Rocha	PUC-Minas	APROVADA
Dra. Paula Peixoto Campos	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 30 de julho de 2018.**

Dr. Anderson José Ferreira (Orientador) \_\_\_\_\_

Dr. Celso Martins Queiroz Junior (Coorientador) \_\_\_\_\_

Dr. Danielle Carvalho de Oliveira Coutinho \_\_\_\_\_

Dr. Walkyria N. Oliveira Sampaio \_\_\_\_\_

Dr. Magda Francisca Gonçalves Rocha \_\_\_\_\_

Dr. Paula Peixoto Campos \_\_\_\_\_

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge  
Coordenadora do Programa de Pós Graduação  
em Biologia Celular ICB/UFMG

*Erika Cristina Jorge*

Este trabalho foi realizado 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), Biologia Oral e do Desenvolvimento (Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG), Protozooses (Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG) e Biomateriais (Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais do Instituto de Ciências Exatas - UFMG). Contamos com o auxílio das seguintes instituições: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig).

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sabedoria e discernimento concedidos pelo seu Santo Espírito, por toda a transformação que passei neste processo de formação, pois pude evoluir muito neste caminhar!

Ao meu marido Marcos, grande companheiro da jornada da vida, pela família que estamos construindo juntos e pelo amor que nos uni.

A meu filho Guilherme, razão do meu viver, por me inspirar a ser uma pessoa cada dia melhor.

Aos meus pais, Lindinalva e Anelito, exemplos de integridade e de persistência, pelo apoio, pela interseção a Deus e pelo amor durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos, Suellen e Guilherme, e cunhados, Maicon e Rosimary e sobrinhos Samuel e Sara pelos momentos de alegria de nossa vivência.

Ao meu orientador, professor Anderson José Ferreira, pela compreensão, pela confiança e por tudo que pude aprender com você durante o mestrado e o doutorado, sua tranquilidade e sabedoria me ajudaram muito no meu crescimento pessoal.

Ao meu co-orientador, Celso Martins Queiroz-Junior, pela paciência, pelos ensinamentos de bancada e por me colocar para frente, sempre!

Às alunas de iniciação científica Diniellen, Giovanna e Anna Clara por todo tempo dedicado neste trabalho aqui apresentado. Especialmente a Anna, um delicado anjo que veio somar em nosso laboratório. Também agradeço ao companheirismo dos demais alunos de iniciação que integram o laboratório, Samuel, Júlia e Lídia.

Aos professores colaboradores Flávio Almeida Amaral, Erika Cristina Jorge, Marcelo Vidigal Caliani e Marivalda de Magalhães Pereira, que gentilmente permitiram que eu realizasse em seus laboratórios experimentos cruciais para o meu trabalho.

Aos colegas Diogo e Júlia que me ajudaram com experimentos importantes, sou muito grata a vocês pela dedicação que empregaram.

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

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

Às fundações CAPES, CNPq e Fapemig.

Meus sinceros agradecimentos.

**“A persistência é o menor caminho do êxito.”**

(Charles Chaplin)

**“... Hoje me sinto mais forte  
Mais feliz, quem sabe  
Só levo a certeza  
De que muito pouco sei  
Ou nada sei ...”**

(Almir Sater e Renato Teixeira, 1991)



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) na resposta fisiopatológica dos tecidos articulares durante a osteoartrite (OA). A OA foi induzida com monoiodoaceto de sódio (MIA) em ratos Wistar e, 7 dias depois, iniciou-se tratamento com captopril (80 mg/kg, diário, gavagem), por 21 dias. No 28º dia, foi feita a eutanásia dos ratos para obtenção de lavado articular (contagem total de leucócitos e ELISA) e coleta do joelho para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica. A inibição da ECA não aumentou a hiperalgesia induzida pelo MIA. O tratamento com captopril levou à redução do *score* OARSI, preveniu a morte de condrócitos e a perda de proteoglicanos, reduziu o tecido de reparação e influenciou a expressão de IL-10 na cartilagem articular e tecido de reparação. Além disso, foi observado redução das alterações ósseas induzidas pelo MIA, houve menos tecido fibroso no osso dos animais tratados, que foi relacionado com a redução dos osteoclastos nas áreas de reabsorção óssea e aumento da expressão de IL-10. Houve redução do número de leucócitos migrados a partir da sinóvia e dos níveis de TNF, bem como aumento de IL-6 e TGF- $\beta$  com o tratamento com captopril. Apesar disso, hiperplasia sinovial induzida por MIA não reduziu. De modo parcialmente semelhante ao MIA, a injeção de Ang II no joelho de ratos promoveu hiperalgesia, edema articular e aumento do número de leucócitos na cavidade articular. A injeção diária de Ang II no joelho de ratos, por 14 dias, também desencadeou discreta perda de proteoglicanos, desorganização de condrócitos na MEC e morte de condrócitos. A fim de confirmar se o efeito condroprotetor do captopril na OA é relacionado à inibição da ECA e consequente redução de Ang II nos condrócitos, realizou-se cultura primária de condrócitos obtidos das articulações de ratos Wistar neonatos. As células foram estimuladas com MIA ou Ang II e tratadas com captopril ou enalapril para avaliação de viabilidade celular (MTT), conteúdo de proteoglicanos (*Alcian Blue*) e expressão de mRNA por PCR quantitativo (AT1R, AT2R, MasR, ECA, ECA2, TGF- $\beta$ , MMP-13, Col2A1, Agrecan e Beta-actina). A estimulação dos condrócitos com MIA ( $6 \times 10^{-6}$  M) ou Ang II ( $10^{-5}$  M) por 36 horas reduziu a viabilidade celular, o que foi prevenido pelo tratamento com captopril ( $10^{-9}$  M), assim como pelo enalapril ( $10^{-9}$  M). Após 14 dias, o efeito observado foi semelhante para o MIA, mas não para a Ang II, visto que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Os estímulos com MIA e Ang II também desencadearam redução da produção de proteoglicanos (porcentagem de área marcada, 14 dias após estímulos) que foi restaurada após o tratamento com captopril. Tal fenótipo de modulação do SRA pelo captopril parece decorrer do eixo ECA/AngII/AT2R, visto que o MIA reduziu a expressão de mRNA de AT2R, efeito que foi

revertido pelo captopril. O tratamento com captopril em condrócitos estimulados com MIA também induziu redução da expressão de MasR e o aumento da expressão de mRNA de ECA, TGF- $\beta$  e colágeno tipo II. Este trabalho reforça a importância do SRA local do joelho, a inibição da ECA com o captopril no MIA levou a atenuação das lesões da cartilagem, do osso subcondral e normalizou o recrutamento de leucócitos a partir da sinóvia. Também vimos que a injeção articular da Ang II reproduz alguns dos efeitos induzidos pelo MIA e que o captopril protege os condrócitos *in vitro* após estímulos MIA ou Ang II. Em conjunto esses dados indicam que a Ang II participa da fisiopatologia da OA e apontam o captopril como uma promissora estratégia terapêutica para OA de joelho.

**Palavras Chaves:** Osteoartrite, Condroproteção, Tecido fibroso do osso, Monoiodoacetato de sódio, Angiotensina II, Enzima conversora de angiotensina, Captopril.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) on the pathophysiological response of articular tissues during osteoarthritis (OA). OA was induced with sodium monoiodoacetate (MIA) in Wistar rats and, 7 days later, treatment with captopril (80 mg/kg, daily, gavage) was conducted for 21 days. On day 28, rats were euthanized to obtain joint lavage (total leukocyte count and ELISA) and knee samples for histopathological and immunohistochemical evaluation. Inhibition of ACE did not increase MIA-induced hyperalgesia. Treatment with captopril led to reduced OARSI score, prevented chondrocyte death and loss of proteoglycans, reduced repair tissue, and influenced IL-10 expression in joint cartilage and repair tissue. In addition, reduction of MIA-induced bone changes was observed, there was less fibrous tissue in the bone of the treated animals, which was related to reduction of osteoclasts in the areas of bone resorption and increased expression of IL-10. There was a reduction in the number of leukocytes migrated from synovium and TNF levels, as well as an increase in IL-6 and TGF- $\beta$  with captopril treatment. In contrast, synovial hyperplasia induced by MIA did not reduce. Similarly to MIA, Ang II injection in the rat knee promoted hyperalgesia, joint edema and increased the number of leukocytes in the joint cavity. Daily injection of Ang II in rat knee for 14 days also triggered mild cationic depletion, chondrocyte disorganization in ECM and chondrocyte death. In order to investigate whether the chondroprotective effects of captopril on OA is related to the inhibition of ACE and consequent reduction of Ang II in the chondrocytes, a primary culture of chondrocytes obtained from the joints of neonatal Wistar rats was performed. Cells were stimulated with MIA or AngII and treated with captopril or enalapril to assess cell viability (MTT), proteoglycan content (Alcian Blue) and mRNA expression by quantitative PCR (AT1R, AT2R, MasR, ACE, ACE2, TGF- $\beta$ , MMP-13, Col2A1, Aggrecan and Beta-actin). *In vitro*, chondrocyte stimulation with MIA ( $6 \times 10^{-6}$  M) or Ang II ( $10^{-5}$  M) for 36 hours reduced cell viability, which was prevented by treatment with captopril ( $10^{-9}$  M), as well as enalapril ( $10^{-9}$  M). After 14 days, the observed effect was similar for MIA but not for Ang II, as no significant differences were observed between groups. MIA and Ang II stimuli also triggered a reduction in proteoglycan content (percentage of labeled area, 14 days after stimulation) that was restored after captopril treatment. Such a phenotype of RAS modulation by captopril seems to proceed from the ACE / AngII / AT2R axis, since MIA reduced the expression of AT2R mRNA, an effect that was reversed by captopril. Captopril treatment in MIA-stimulated cells also induced reduction of MasR expression and increased mRNA expression of ACE, TGF- $\beta$  and collagen type II. This

work underlines the importance of the local RAS knee, inhibition of ACE with captopril in MIA led to attenuation of cartilage lesions, subchondral bone and normalized recruitment of leukocytes from synovium. We have also seen that Ang II joint injection replicates some of the effects induced by MIA and that captopril protects chondrocytes *in vitro* after MIA or Ang II stimulation. In conclusion, these data indicate that Ang II is involved in the pathophysiology of OA and uses captopril as a promising therapeutic strategy for knee OA.

**Key words:** Osteoarthritis, Chondroprotection, Bone fibrous tissue, Sodium monoiodoacetate, Angiotensin II, Angiotensin converting enzyme, Captopril.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Desenho esquemático das alterações osteoartíticas em uma articulação.....	21
<b>Figura 2:</b> Taxas de incidência específicas por idade e sexo (/1.000 pessoas-ano) de OA do joelho (preto), OA do quadril (vermelho) e OA da mão (verde).....	23
<b>Figura 3:</b> Interação entre cartilagem e sinóvia na patogênese da OA.....	26
<b>Figura 4:</b> Coloração de Azul de Toluidina e representação esquemática da morfologia e estrutura da cartilagem hialina.....	29
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática do Sistema renina-angiotensina.....	36
<b>Figura 6:</b> (A) Reconhecimento molecular da tríade peptídica Phe-His-Leu pela ECA. As linhas tracejadas indicam regiões onde há interação entre o substrato e a enzima. (B) Interação dos fármacos captopril com o sítio ativo da ECA.....	38
<b>Figura 7:</b> Fluxograma ilustrando o desenho do estudo.....	42
<b>Figura 8:</b> Esquema demonstrando os protocolos experimentais do tratamento com captopril.....	44
<b>Figura 9:</b> Esquema demonstrando os protocolos experimentais de injeção de Ang II.....	49
<b>Figura 10:</b> Expressão da ECA nos tecidos articulares de ratos.....	55
<b>Figura 11:</b> Avaliação do conteúdo de proteoglicanos, área de cartilagem e <i>score</i> OARSI nos diferentes protocolos de tratamento com captopril.....	57
<b>Figura 12:</b> Hiperalgisia pós-indução da OA.....	58
<b>Figura 13:</b> Alterações histológicas da cartilagem induzidas pelo MIA.....	61
<b>Figura 14:</b> Histopatologia da cartilagem e tecidos de reparação.....	62
<b>Figura 15:</b> Evidências morfológicas de apoptose nos condrócitos.....	64
<b>Figura 16:</b> Expressão de IL-10 e TNF na cartilagem hialina.....	65
<b>Figura 17:</b> Histopatologia do osso subcondral.....	67
<b>Figura 18:</b> Expressão de IL-10, TNF e VEGF no tecido fibroso do osso subcondral.....	68
<b>Figura 19:</b> Marcação para TRAP em osteoclastos subcondrais da tíbia e do fêmur.....	69
<b>Figura 20:</b> Morfometria da sinóvia e contagem de leucócitos.....	71
<b>Figura 21:</b> Concentração de TNF, IL-10, IL-6 e TGF- $\beta$ no joelho de ratos.....	72
<b>Figura 22:</b> Efeitos da injeção de Ang II (2 $\mu$ g) 4-4 dias no edema articular (A); hiperalgisia (B); e no recrutamento de leucócitos para a cavidade articular (C).....	74
<b>Figura 23:</b> Efeitos da injeção de Ang II (2 $\mu$ g ou 4 $\mu$ g) diária no edema articular (A e B); hiperalgisia (C e D); e no recrutamento de leucócitos para a cavidade articular (E).....	75
<b>Figura 24:</b> Alterações histológicas induzidas pela injeção de Ang II (diária).....	76

<b>Figura 25:</b> Ensaio de MTT em cultura de condrócitos.....	79
<b>Figura 26:</b> Análise do conteúdo de proteoglicanos em cultura de condrócitos por <i>Alcian Blue</i> .....	80
<b>Figura 27:</b> Ensaio de PCR em tempo real após 36 horas – componentes do SRA.....	81
<b>Figura 28:</b> Ensaio de PCR em tempo real após 36 horas – elementos da MEC.....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência dos <i>primers</i> usados para as análises da PCR.....	42
<b>Tabela 2:</b> Morfometria da cartilagem e tecido de reparação.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AINES** – anti-inflamatórios não esteroidais
- Ang I** – Angiotensina I
- Ang II** – Angiotensina II
- AR** – Artrite reumatoide
- AT1R** – Receptor de angiotensina II tipo 1
- AT2R** – Receptor de angiotensina II tipo 2
- BSA** – *Bovine serum albumin*
- CAP** – Captopril
- CC** – Cartilagem calcificada
- CEBIO** – Centro de Bioterismo
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- Col2A1** – Colágeno tipo II alfa 1
- COX-2** – Ciclooxigenase 2
- DAMP** – Padrão molecular associado a danos
- DMOAD** – Drogas modificadoras da doença osteoartrite
- ECA** – Enzima conversora da angiotensina
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA** – *Enzyme-linked immuno sorbent assay*
- EPM** – Erro padrão da média
- HA** – Ácido hialurônico
- HAS** – Hipertensão arterial sistêmica
- HE** – Hematoxilina e eosina
- iECA** – Inibidor da enzima conversora de angiotensina
- IGF-I** – Fator de crescimento semelhante à insulina I
- IL** – Interleucinas
- L-NAME** – N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster hidrocloreto
- MasR** – Receptor da Ang-(1-7)
- MEC** – Matriz extracelular
- MIA** – Monoiodoacetato de sódio
- MMPs** – Metaloproteinases
- mRNA** – RNA mensageiro
- MTT** – Ensaio de redução de tetrazólio



**NEP** – Endopeptidase neutra  
**NOS2** – Óxido nítrico sintase 2  
**OA** – Osteoartrite  
**OARSI** – Osteoarthritis Research Society International  
**ON** – Óxido nítrico  
**OS** – Osso subcondral  
**PAM** – Pressão arterial média  
**PBS** – Salina tamponada com fosfato  
**PCR** – *Polymerase chain reaction*  
**PEP** – Prolyl endopeptidase  
**PGE<sub>2</sub>** – Prostaglandina E2  
**((P)RR)** – receptores (pro)renina  
**RAGE** – Receptor para produtos finais de glicação avançada  
**SEM** – Erro padrão da média  
**SRA** – Sistema renina angiotensina  
**TENS** – Neuroestimulação elétrica transcutânea  
**TGF- $\beta$ 1** – Fator de transformação do crescimento beta 1  
**TLR** – Receptor do tipo Toll  
**TNF** – Fator de necrose tumoral  
**TRAP** – Fosfatase ácida resistente ao tartarato  
**VEGF** – Fator de crescimento endotelial vascular  
**ZS** – Zona superficial  
**ZI** – Zona intermediária  
**ZP** – Zona profunda

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>1.1 Osteoartrite</b> .....	<b>20</b>
<i>1.1.1 Conceito</i> .....	20
<i>1.1.2 Epidemiologia</i> .....	21
<i>1.1.3 Patogênese</i> .....	23
<i>1.1.4 Cartilagem e tecido de reparação</i> .....	26
<i>1.1.5 Dor osteoartrítica</i> .....	29
<i>1.1.6 Comorbidades e OA</i> .....	31
<i>1.1.7 Terapêuticas de gestão da OA</i> .....	32
<i>1.1.8 Modelo experimental de osteoartrite de joelho</i> .....	33
<b>1.2 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)</b> .....	<b>35</b>
<i>1.2.1 Conceito</i> .....	35
<i>1.2.3 Captopril – Agente químico modulador do SRA</i> .....	37
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>39</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>41</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>41</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 Animais</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2 Osteoartrite induzida por MIA</b> .....	<b>42</b>
<b>4.3 Avaliação do edema articular</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4 Protocolos de tratamento</b> .....	<b>43</b>
<b>4.5 Mensuração da pressão arterial média (PAM)</b> .....	<b>44</b>
<b>4.6 Avaliação da hiperalgesia</b> .....	<b>44</b>
<b>4.7 Avaliação do infiltrado celular na cavidade articular do joelho</b> .....	<b>45</b>
<b>4.8 Avaliação das alterações histopatológicas</b> .....	<b>45</b>
<i>4.8.1 Aplicação do Score da Osteoarthritis Research Society International (OARSI)</i> .....	<i>47</i>
<b>4.9 Dosagem de citocinas por Elisa (Enzyme-linked immuno sorbent assay)</b> .....	<b>47</b>
<b>4.10 Avaliação dos efeitos articulares da injeção de Ang II</b> .....	<b>48</b>

<b>4.11</b>	<b>Cultura primária de condrócitos.....</b>	<b>49</b>
4.11.1	<i>Avaliação da viabilidade celular.....</i>	<i>50</i>
4.11.2	<i>Avaliação do conteúdo de proteoglicanos .....</i>	<i>50</i>
4.11.3	<i>Avaliação da expressão de mRNA de componentes do SRA e da MEC por PCR em tempo real.....</i>	<i>51</i>
<b>4.12</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>54</b>
5.1	Expressão da ECA nos tecidos articulares .....	54
5.2	Definição do protocolo de tratamento .....	56
5.3	PAM após tratamento com captopril.....	56
5.4	Edema articular após injeção de MIA .....	56
5.5	Hiperalgia após injeção de MIA e tratamento com captopril (80 mg/kg).....	58
5.6	Efeitos do captopril (80 mg/kg) nos parâmetros histopatológicos da cartilagem e tecidos de reparação .....	58
5.7	Efeito do captopril (80 mg/kg) nas alterações ósseas induzidas pelo MIA.....	66
5.8	Efeitos do captopril (80 mg/kg) na sinóvia, leucócitos totais, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento .....	70
5.9	Efeitos da Ang II nos tecidos articulares.....	72
5.10	Efeitos do captopril e da Ang II em cultura primária de condrócitos.....	77
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>111</b>

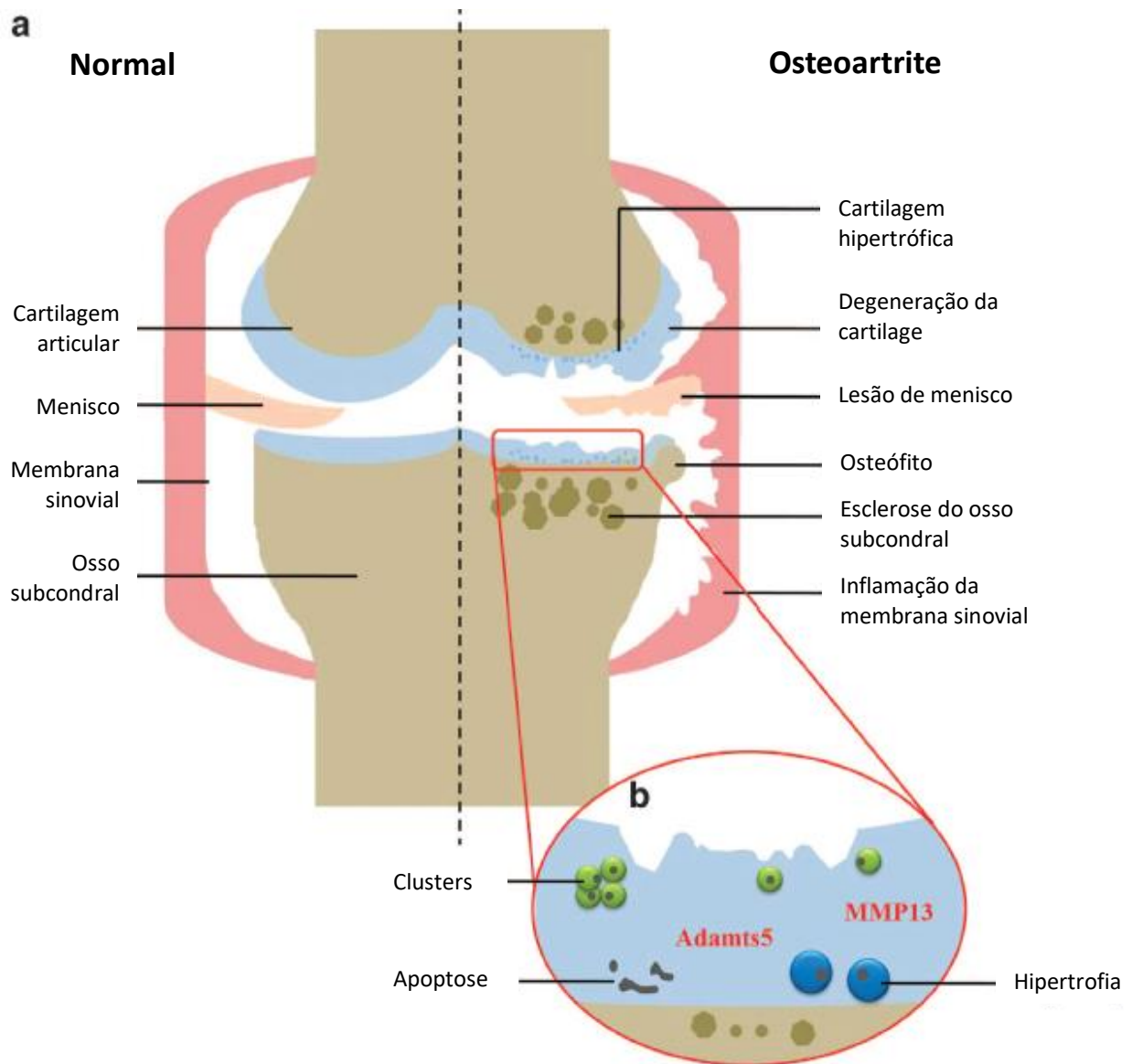
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Osteoartrite

### 1.1.1 Conceito

O entendimento das doenças é constantemente aperfeiçoado. E isto se deve, principalmente, ao grande volume de pesquisas realizadas na atualidade. Entre as possíveis implicações do fluxo contínuo de novas informações está a forma como as doenças são conceituadas e abordadas. E isto se aplica à osteoartrite (OA), forma mais comum de artrite (Felson, 2000; Lawrence et al, 2008), caracterizada por degeneração crônica do tecido cartilaginoso hialino, inflamação da membrana sinovial, lesão de menisco, 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 1). Até a década 1990, essa condição clínica era denominada osteoartrose. O consenso para a utilização do sufixo *ite* (osteoartrite) no lugar do sufixo *ose* (osteoartrose) ocorreu com a compreensão de que o componente inflamatório da doença é determinante para a degradação da matriz cartilaginosa (Berenbaum, 2013; Loeser, 2009). Apesar desta compreensão ser atual, o estudo de Collins e McElliogott (1960) já evidenciava que os condrócitos da cartilagem osteoartrítica eram metabolicamente ativos, indicando a OA como uma reação biológica e não apenas uma condição mecânica de desgaste da cartilagem.

A OA pode ser classificada em primária (idiopática) ou secundária (com base na atribuição a fatores causais reconhecidos, como trauma, cirurgia nas estruturas articulares e articulações anormais no nascimento, por exemplo) (Altman et al, 1986; Martel-Pelletier et al, 2016). OA primária resulta de uma combinação de fatores de risco, sendo a idade e a obesidade os mais importantes (Martel-Pelletier et al, 2016). Apesar dessa divisão, o quadro clínico não difere, os sintomas mais significativos são dor, rigidez articular e limitação ao movimento e estão associados ao processo de lesão articular permanente e ao surgimento de incapacidade (Puett e Griffin, 1994; Jordan et al, 2003; Litwic et al, 2013). Desse modo, a OA é definida como um grupo de distúrbios articulares distintos sobrepostos com desfechos biológicos, morfológicos e clínicos semelhantes (Martel-Pelletier et al, 2016).



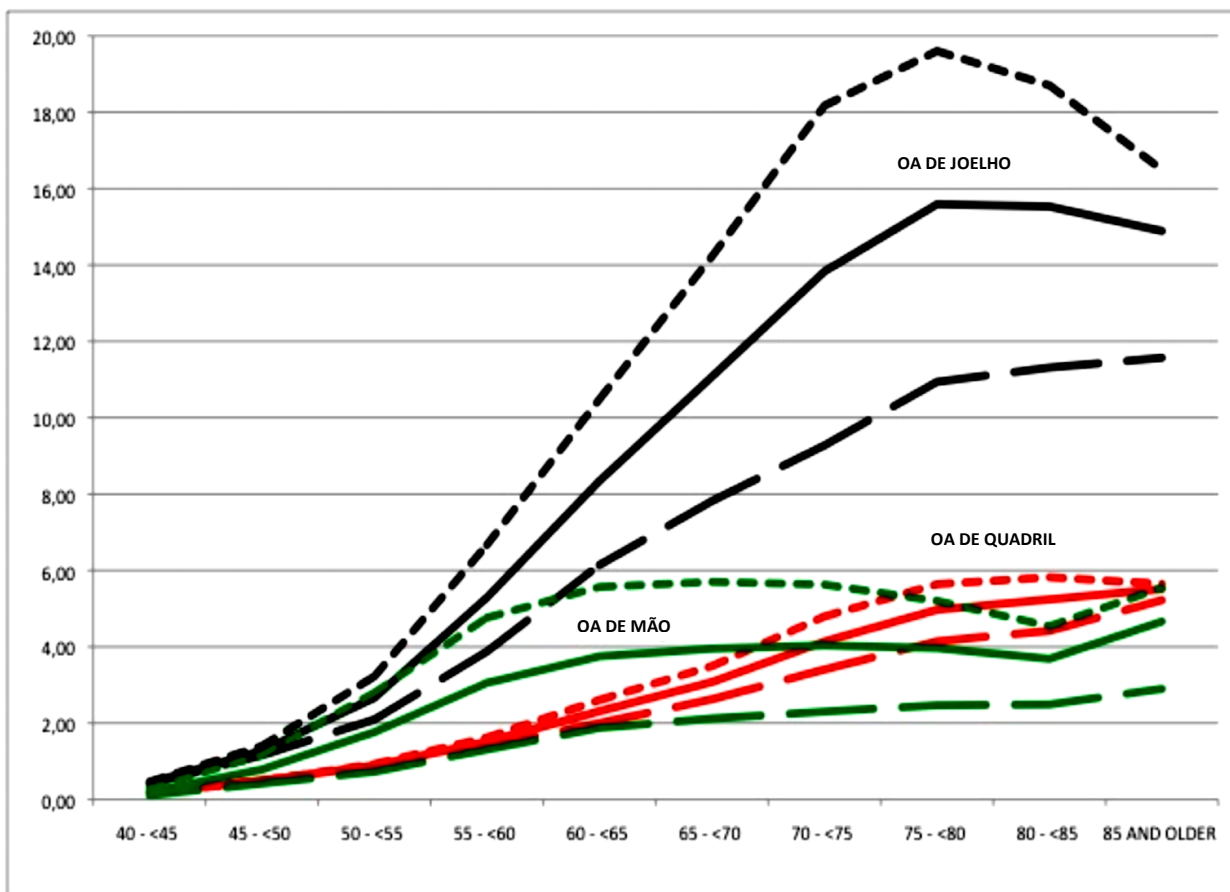
**Figura 1:** Desenho esquemático das alteraçoes osteoartrosicas em uma articulaçao. (a) Alteraçoes da estrutura articular durante a progressao da OA. (b) Respostas celulares na cartilagem com OA. OA, osteoartrite. Adaptado de Zhang et al, 2016.

### 1.1.2 Epidemiologia

A OA é considerada a principal causa de dor e incapacidade em idosos, sendo uma das principais causas de reduçao da expectativa de vida devido à incapacidade (March e 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 realizaçao da artroplastia do quadril e do joelho (Bitton, 2009; Losina et al, 2009).

A Organização Mundial de Saúde estima que, no mundo, 9,6% dos homens e 18% das mulheres acima de 60 anos tenham OA (WHO, 2013). A alta prevalência da OA é atribuída, principalmente, ao envelhecimento e ao aumento da prevalência da obesidade da população (Neogi e Zhang, 2013). Entretanto, a prevalência e a incidência da OA podem ser bem variáveis, dependendo da definição utilizada, idade, sexo e área geográfica estudada (Litwic et al, 2013). As alterações articulares estruturais nem sempre são acompanhadas dos sintomas (OA estrutural ou radiográfica), assim como os sintomas podem ser manifestos sem a identificação radiológica da OA (OA sintomática) (Martel-Pelletier et al, 2016). 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 têm OA com maior frequência na coluna e quadril e as mulheres no joelho e mãos (Felson, 2000; Neogi e Zhang, 2013). Porém, um estudo epidemiológico na Catalunha com mais de cinco milhões de pessoas mostrou a OA de joelho com maior incidência tanto em mulheres quanto em homens (Figura 2) (Prieto-Alhambra et al, 2014). O Brasil carece de estudos epidemiológicos sobre as doenças reumatológicas. Mas, dados da Previdência Social mostraram que as doenças do sistema osteomuscular e do tecido conjuntivo representaram 18,5% dos casos totais de concessão do auxílio-doença em 2017. Desses, a OA representou 8,2%, sendo a OA de joelho a mais frequente, totalizando 47% dos casos (Brasil, 2018).

O risco de desenvolver OA é 2,96% maior nos indivíduos obesos e com sobrepeso em relação àqueles com peso normal (Neogi e Zhang, 2013). Além disso, a perda de peso reduz o risco de desenvolvimento da OA sintomática (Zhang e Jordan, 2010). A obesidade gera sobrecarga mecânica articular, principalmente para a articulação do joelho. Articulações da mão são mais comumente afetadas em indivíduos obesos, isso é justificado pela estreita relação da obesidade com a síndrome metabólica (Katz et al, 2010).



**Figura 2:** Taxas de incidência específicas por idade e sexo (/1.000 pessoas-ano) de OA do joelho (preto), OA do quadril (vermelho) e OA da mão (verde). Sólido = toda a população; Linha de traço curto = mulheres; Linha longa do traço = homens (Prieto-Alhambra et al, 2014).

### 1.1.3 Patogênese

A OA é uma doença multifatorial (Neogi e Zhang, 2013). Uma complexa interação de fatores genéticos, metabólicos, bioquímicos e biomecânicos, seguida pela ativação da resposta inflamatória resulta em degeneração crônica do tecido cartilaginoso, além de alterações no osso subcondral e sinóvia (Haseeb, 2013). A sequência das alterações patológicas da 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 mais alterações ósseas. Já em um indivíduo obeso, a alteração primária pode ser a formação óssea aumentada, seguida pela destruição articular e sinovite (Loeser, 2009). Embora os processos patológicos possam ter como alvo um único tecido, todos os tecidos articulares são afetados na OA por causa da íntima associação física e funcional, assim a OA é considerada uma doença da articulação (Martel-Pelletier et al, 2016).

A resposta inicial do tecido cartilaginoso a estresses físicos ou químicos é a proliferação dos condrócitos e maior atividade metabólica desses (Dijkgraaf et al, 1995; Krasnokutsky, 2007; Loeser, 2005). 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 metaloproteinases de matriz (MMPs), 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 e Krasnokutsky, 2006). Assim, a manutenção do quadro inflamatório parece contribuir para a degradação progressiva do tecido cartilaginoso (Dean e Sansom, 2000; Ströbel et al, 2010).

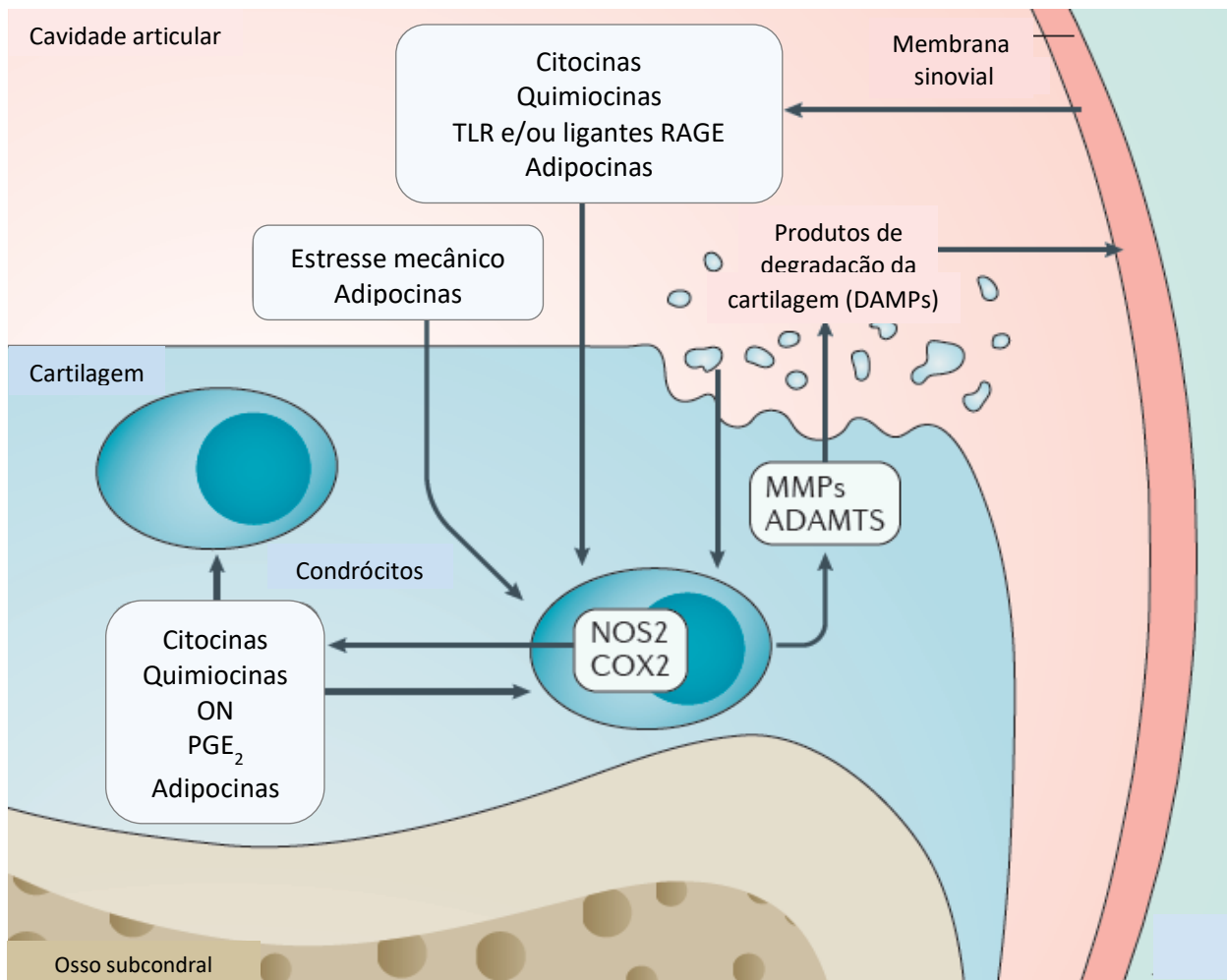
A complexa resposta inflamatória da OA começou a ser entendida com a identificação de vários mediadores inflamatórios, como as interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-7 e IL-8, o fator de necrose tumoral (TNF), o óxido nítrico (ON) e prostaglandinas nas articulações afetadas (Berenbaum, 2013; Katz et 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 e Haqqi, 2012). As diferentes fontes e o tipo de mediador podem interferir no fenótipo da doença (Berenbaum, 2013). Apesar de ser uma doença local foram identificados marcadores de inflamação sistêmicos relacionados com os sintomas da OA, como a proteína C-reativa e adipocinas (Glyn-Jones et al, 2015).

É consenso que o osso subcondral também está envolvido na patogênese da OA. No entanto, se as alterações ósseas subcondrais precedem a OA, ou se ocorrem após a degradação da cartilagem ainda é uma questão de debate. Ocorre neoformação óssea, como uma tentativa do organismo de aumentar a área de superfície, mas há também processos de reabsorção óssea, os níveis de colágeno I no osso são aumentados, a mineralização é reduzida, há lesões na medula óssea e formação de osteófitos (Lajeunesse, 2004; Martel-Pelletier et al, 2016). Essas mudanças são mediadas por alterações na atividade de osteoclastos e osteoblastos (Martel-Pelletier et al, 2016). No estágio inicial a médio há a formação de osso novo em múltiplos focos. Em fases posteriores, processos



intensos de remodelação óssea ocorrem em áreas de destruição avançada da cartilagem articular subjacente. Além da esclerose óssea extensa, a necrose óssea asséptica é uma característica comum da degeneração articular avançada na OA. Em áreas de destruição total da cartilagem, o fluido sinovial obtém acesso à medula óssea e induz alterações fibrocíticas e mesmo condrometaplásicas de células precursoras mesenquimais. Isso leva aos nódulos-cartilagem característicos, que são frequentemente encontrados nessas áreas na doença em estágio avançado (Aigner et al, 2006). As lesões da medula óssea são caracterizadas por necrose gordurosa, fibrose medular localizada e microfraturas do osso trabecular. Essas lesões estão associadas com a remodelação e o reparo ósseo ativo e tendem a se associar com regiões de danos da cartilagem, locais desnudados no osso subcondral (Martel-Pelletier et al, 2016). Pelo menos nas lesões moderadas a avançadas, as alterações no osso subcondral representam um tecido responsável pela dor articular osteoartrítica (Aigner et al, 2006).

A sinovite é caracterizada por hiperplasia do revestimento sinovial, infiltrado de macrófagos e linfócitos, angiogênese 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 produzirem mediadores inflamatórios, desencadeando um ciclo de retroalimentação de inflamação-degeneração (Berenbaum, 2013) (Figura 3). A angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos, contribui para a inflamação na OA por garantir o desenvolvimento da sinóvia hiperplásica e favorecer a formação de infiltrado celular. É reportado o aumento do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) na cartilagem articular e fluido sinovial. Tal aumento é associado com a diferenciação hipertrófica anormal dos condrócitos na OA. A angiogênese aumentada pode contribuir para maior percepção algica, em razão da relação da hiperplasia sinovial com o aumento do fator de crescimento neural (Lotz, 2012).



**Figura 3:** Interação entre cartilagem e sinóvia na patogênese da OA. COX2, ciclooxigenase 2; DAMP, padrão molecular associado a danos; ON, óxido nítrico; NOS2, óxido nítrico sintase 2; PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E2; RAGE, receptor para produtos finais de glicação avançada; TLR, receptor do tipo Toll. Adaptado de Martel-Pelletier et al, 2016.

### 1.1.4 Cartilagem e tecido de reparação

A cartilagem hialina articular é um tipo de tecido conjuntivo especializado, constituído por condrócitos e MEC (Dijkgraaf 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 (Dijkgraaf 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

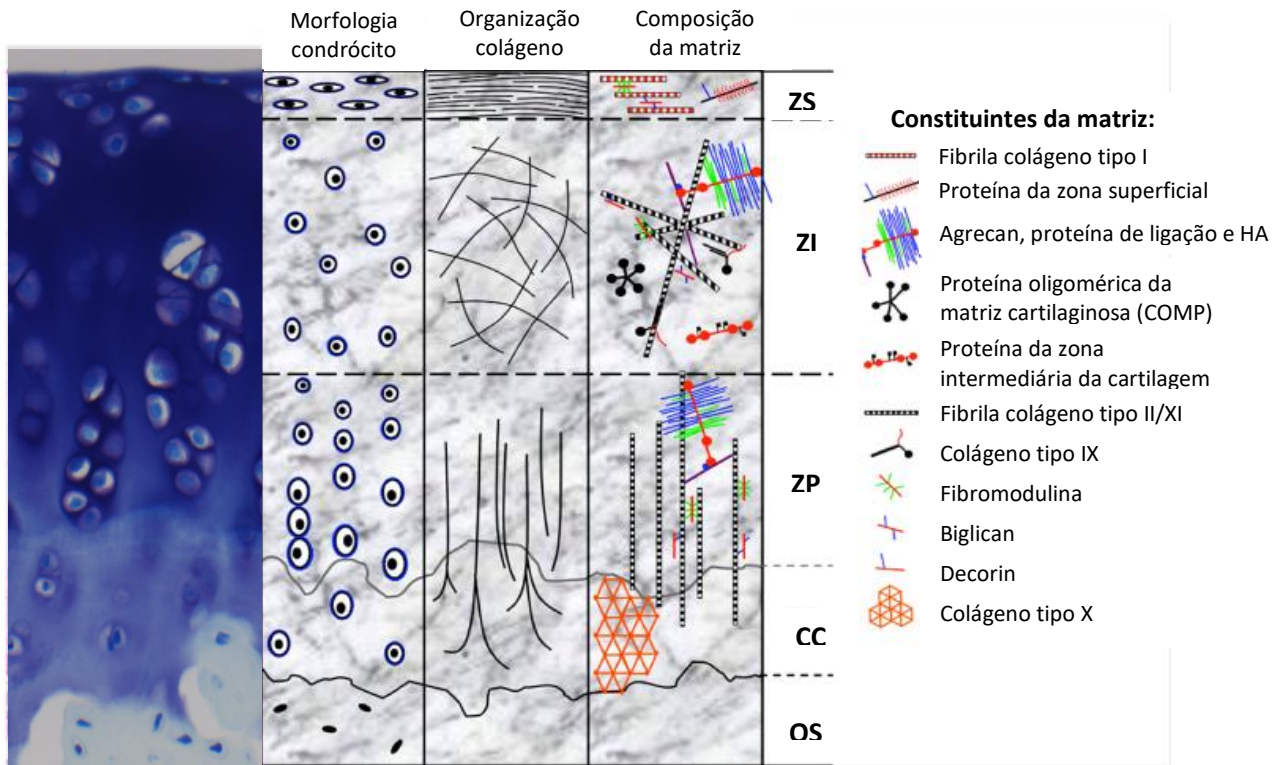
sinovial, cápsula, músculos e tecido ósseo subcondral. Também é avascular e alinfática, sendo que a nutrição e eliminação de resíduos se dá através de difusão na matriz cartilaginosa com o fluido sinovial (Dijkgraaf et al, 1995).

A cartilagem hialina normal é estruturalmente dividida em zonas, sendo que cada zona tem forma e orientação características (Figura 4). 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, 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 a atividade anabólica quanto a catabólica (Lundon e Waker, 2007). Os condrócitos mantêm a MEC estável porque, além de produzirem as fibras colágenas e os proteoglicanos, também produzem fatores de crescimento, como fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- $\beta$ 1) e fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), e MMPs, responsáveis pelo equilíbrio entre a síntese e degradação da MEC no estado fisiológico (Dean et al, 1989; Loeser, 2006; Lundon e Waker, 2007). As citocinas e os fatores de crescimento produzidos pelos condrócitos possuem ação parácrina e autócrina (Lundon e 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). Os proteoglicanos estão constantemente sendo renovados e possuem uma meia-vida de semanas (Cecil, 2005; Lundon e Waker, 2007). Os glicosaminoglicanos possuem alta densidade de cargas negativas, o que atrai

cátions, especialmente de Na<sup>+</sup>. 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 e 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).

A erosão da cartilagem é uma das principais características histológicas da OA (Pritzker et al, 2005). Basicamente, três tipos de tecidos de reparo são possíveis: tecido fibroso, fibrocartilagem e cartilagem de reparo semelhante à hialina de semelhança variável à cartilagem articular original (Aigner et al, 2006). O tecido de reparo fibroso pode ser considerado uma tentativa de reparo malsucedida. As células produzem uma matriz com um conteúdo pobre em glicosaminoglicanos e rica em colágeno tipo I. A fibrocartilagem é a forma mais comum de tecido de reparação alcançada. A matriz da fibrocartilagem é composta de colágeno tipo I (típico de tecido fibroso) e de colágeno tipo II (típico da cartilagem hialina). Apesar da integridade macroscópica da cartilagem parecer restaurada, a fibrocartilagem não possui as propriedades biomecânicas da cartilagem articular. A cartilagem de reparo semelhante à hialina apresenta uma abundância de glicosaminoglicanos, colágenos tipo II, IX e XI e os condrócitos possuem fenótipo típico. Contudo, essa cartilagem apresenta algumas diferenças da cartilagem hialina normal, como orientação das fibras colágenas e ausência da “tide mark” (Aigner et al, 2006; Barley et, 2010; Sakata et al, 2013).



**Figura 4:** Coloração de Azul de Toluidina e representação esquemática da morfologia e estrutura da cartilagem hialina. ZS, zona superficial; ZI, zona intermediária; ZP, zona profunda; CC, cartilagem calcificada; OS, osso subcondral; HA, ácido hialurônico. Adaptado de Di Bella, 2015.

### 1.1.5 Dor osteoartrítica

A dor nas articulações é o sintoma cardinal acompanhado por vários graus de alterações funcionais, como rigidez e instabilidade articular. As apresentações clínicas da dor são diversificadas, dependendo de qual articulação é afetada, quão severamente é afetada e do número de articulações envolvidas (Chan e Wu, 2012). A dor osteoartrítica pode ser do tipo mecânica, que é agravada pela movimentação e pelo uso prolongado da articulação, e do tipo inflamatória, descrita como uma dor em queimação que pode persistir por dias sem tratamento (Chan e Wu, 2012; Haviv et al, 2013). A dor osteoartrítica também pode ser classificada temporalmente como aguda ou crônica. A aguda é auto-limitada e tem uma função biológica de proteção, agindo como um aviso de dano tecidual permanente. Já a dor crônica não tem nenhuma função biológica protetora, é um sintoma do processo patológico da doença, não é auto-limitada e pode persistir por anos após o insulto inicial (Haviv et al, 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 e Wu, 2012). Isso 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). Nesse contexto, a presença de co-morbidades pode complicar ainda mais a situação, por afetar os desfechos clínicos e afetar a qualidade de vida (Chan e Wu, 2012).

Apesar da dor osteoartrítica nem sempre ser diretamente proporcional à gravidade das anormalidades estruturais das articulações (Chan e Wu, 2012), algumas alterações como a lesão de medula óssea e a sinovite estão envolvidas nas manifestações álgicas. A lesão de medula óssea é associada a dor no joelho nos pacientes com OA (Hunter et al, 2008; Muratovic et al, 2016). Outras causas de dor relacionadas ao osso incluem periostite associada à formação de osteófitos, microfraturas subcondrais e angina óssea devido à diminuição do fluxo sanguíneo e pressão intraóssea elevada (Hunter et al, 2008). A reação sinovial na OA inclui hiperplasia sinovial, fibrose, espessamento da cápsula sinovial, sinoviócitos ativados e infiltrado linfocitário. As causas sinoviais da dor incluem a irritação das terminações nervosas sensoriais no interior da sinóvia a partir de osteófitos e inflamação sinovial que é devida, pelo menos em parte, à liberação de prostaglandinas, leucotrienos, proteinases, neuropeptídeos e citocinas (Hunter et al, 2008).

Comumente, a partir de um movimento nocivo, que gera sobrecarga articular no joelho, unidades nociceptoras periféricas são ativadas e a informação de dor é transportada por nervos espinhais aferentes até o sistema nervoso central, no qual passa pela medula, tálamo até chegar ao córtex somatossensorial, onde ela é contextualizada e modulada. O estímulo químico também é importante no contexto do processo álgico da OA, mediadores como bradicinina, prostaglandinas e substância P podem sensibilizar os nociceptores articulares. Além disso, mediadores como a substância P pode estimular o tecido sinovial à produção de mediadores inflamatórios e ao recrutamento de células inflamatórias (Haviv et al, 2013). E citocinas inflamatórias como o TNF pode aumentar a sensibilidade nervosa para percepção álgica. Ou seja, tanto as alterações associadas ao processo inflamatório podem levar a sensibilização nociceptiva, assim como essa sensibilização também pode estimular o processo inflamatório (Schaible et al, 2010).

### ***1.1.6 Comorbidades e OA***

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 e 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). A prevalência de HAS nos pacientes com OA é em torno de 40%, enquanto na população geral este índice está em torno de 25% (Singh et al, 2002). Um estudo longitudinal de 3 anos com 1690 participantes mostrou que o acúmulo dos componentes da síndrome metabólica (sobrepeso, HAS, dislipidemia e intolerância à glicose) estão associados ao desenvolvimento e a progressão da OA de joelho (Yoshimura et al, 2012). Recentemente, outro estudo longitudinal, 8 anos de acompanhamento de 3558 pacientes (1930 OA/1628 controles), mostrou que a incidência da HAS foi significativamente maior nos pacientes com OA de joelho. Indicando que os pacientes com OA de joelho tem maior risco de desenvolver a HAS (Veronese et al, 2018). Um estudo de meta-análise mostrou relação significativa entre a HAS e a OA de joelho (radiográfica e sintomática) (Zhang et al, 2017). Não é bem claro o porquê desta associação, mas a OA e a HAS compartilham fatores de risco importantes, como a obesidade, o envelhecimento e o sedentarismo (Zhuo et al, 2012). Entre os possíveis mecanismos subjacentes à associação da OA e HAS está a disfunção do sistema do ON nos vasos (Findlay, 2007; Katz et al, 2010). Outra possibilidade é que a isquemia subcondral possa comprometer a troca de nutrientes e gases entre a cartilagem articular e o osso, iniciando mudanças degradativas na cartilagem. Também é hipotetizado que a apoptose de osteócitos nas regiões isquêmicas do osso subcondral possa desencadear reabsorção osteoclástica, reduzindo o suporte ósseo (Zhuo et al, 2012).

Um problema que deve ser considerado no caso das comorbidades é a interação medicamentosa. Já está bem evidenciado que medicações usadas para o controle álgico por pacientes com OA podem interferir no controle da PA, especialmente em pacientes hipertensos (Whelton et al, 2001; White, 2009; Aljadhey et al, 2012). Mas é igualmente necessário investigar se o uso de medicamentos anti-hipertensivos por pacientes que também apresentam OA teria alguma implicação clínica.

### ***1.1.7 Terapêuticas de gestão da OA***

A gestão da OA deve basear-se em uma combinação de tratamentos não medicamentosos e medicamentosos direcionados à prevenção, modificando o risco e a progressão da doença (Yu e Hunter, 2015).

Existem várias abordagens não farmacológicas para a OA, entre elas pode-se citar: perda de peso, treinamento de força, treino aquático, educação sobre a doença, órteses, acupuntura, TENS (Neuroestimulação Elétrica Transcutânea) (Zhang et al, 2010; McAlindon et al, 2014). A forte evidência que a redução de peso leva a melhora da dor e função. O treinamento de força dos membros inferiores, principalmente do quadríceps, demonstrou efeito moderado na redução da dor e melhora da função. Exercícios aquáticos levam de pequena a moderada melhora da função e qualidade de vida, mas os efeitos sobre a dor são limitados. A auto-gestão da OA por programas educativos apresenta benefício modesto em relação a incapacidade. A evidência sobre os efeitos de joelheiras e órteses de pé na melhora da função é fraca. Ensaios clínicos controlados sobre os efeitos da acupuntura na OA apotam eficácia da técnica. Os estudos sobre os efeitos do TENS sobre a dor são inconclusivos, devido a baixa qualidade dos estudos incluídos (McAlindon et al, 2014).

O tratamento medicamentoso mais frequentemente adotado para a gestão dos sintomas da OA são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (Yu e Hunter, 2015). Os AINES seletivos para COX-2 são direcionados aos pacientes com risco elevado de lesão gástrica, por possuírem um perfil de segurança gastrointestinal ligeiramente melhorado (Shi e Klotz, 2008). Entretanto, a comparação em uma revisão sistemática entre os AINES não seletivos e os seletivos para COX-2 concluiu que não havia diferença entre as duas classes (Costa et al, 2017). O diferencial dos seletivos para COX-2 parece ser os efeitos diretos nos tecidos articulares (Nakata et al, 2018). O analgésico de escolha para dor leve a moderada é o paracetamol, apesar das evidências científicas apontarem que ele que é menos eficaz no alívio da dor do que drogas anti-inflamatórias (Zhang et al, 2004; Yu e Hunter, 2015; Costa et al, 2017). Os opioides também são utilizados para o alívio da dor em pacientes com OA, mas as evidências apotam que os benefícios são pequenos a moderados e há grande chance de os pacientes desenvolverem um evento adverso grave após a retirada (McAlindon et al, 2014). Um estudo de meta-análise identificou o regime de tratamento com diclofenaco o mais eficaz em termos de dor e função física (Costa et al, 2017). Entretanto, a presença de co-morbidades deve ser considerada, pois o diclofenaco aumenta o risco de eventos cardiovasculares. Quanto as complicações gastrointestinais seus efeitos são semelhantes aos



inibidores seletivos de COX-2. Em contraste, o naproxeno não parece aumentar o risco de eventos cardiovasculares, mas aumenta a probabilidade de complicações gastrointestinais (Costa et al, 2017). De forma geral, as terapias farmacológicas tradicionais para controle da OA, paracetamol, AINES e opióides são eficazes no alívio da dor, mas incapazes de reverter os danos da cartilagem e são frequentemente associados a eventos adversos (Zhang et al, 2016).

Há também as drogas modificadoras da doença osteoartrite (DMOAD), consideradas uma promessa no avanço das intervenções farmacológicas na OA. O uso de uma DMOAD pode causar o retardo (retardamento da taxa de progressão da doença), uma parada completa na progressão da doença, reversão na progressão da doença (regeneração do tecido alvo) e até mesmo a prevenção do desenvolvimento da doença (Hunter, 2011). Entre os vários agentes farmacológicos estudados no âmbito das DMOADs pode-se citar: calcitonina; bisfosfonatos; proteína óssea morfogenética 7; inibidores de IL-1, TNF, MMPs, catepsina K, agreganase, ON sintase; fator de crescimento de fibroblasto-18, antagonista da bradicinina; leptina; doxiciclina; vitamina D; e colágeno hidrolisado (Krasnokutsky, 2007; Hunter, 2011; Glyn-Jones et al, 2015). Ensaios clínicos envolvendo novos medicamentos são comumente classificados em quatro fases diferentes. A fase I é sem objetivo terapêutico, faz a avaliação inicial da segurança e tolerabilidade do novo fármaco e traça o perfil farmacocinético e farmacodinâmico. Na fase II é feita a avaliação da eficácia terapêutica, determinação da dose e do regime terapêutico, relação dose/resposta, perfil de segurança a curto prazo. Na fase III é realizada a confirmação do benefício terapêutico e obtenção de autorização de introdução no mercado. Na fase IV é feita a avaliação das interações medicamentosas e a descrição de padrão do uso do medicamento. A calcitonina e a ASU (composto de associação de soja com abacate) encontram-se na fase III (Hunter, 2011). As abordagens farmacológicas atuais são paliativas, a maioria dos tratamentos ainda é direcionada ao controle sintomático da OA (Hunter, 2011; Martel-Pelletier et al, 2012). Tendo em vista a necessidade de controle da progressão da OA a pesquisa das DMOADs precisa avançar para prover estratégias capazes de alterar o curso da doença e trazer benefícios clínicos associados (Aini et al, 2015).

### ***1.1.8 Modelo experimental de osteoartrite de joelho***

Modelos animais de OA são utilizados, principalmente, para a compreensão da patogênese da doença e para avaliação do potencial terapêutico de fármacos antiartríticos (Bendele, 2001). Diversos tipos de animais podem ser usados para o estudo da OA, entre eles pode-se citar cavalo,

cachorro, camundongo, rato, porco, galinha e 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 o 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, 2012). Diferentes quantidades de MIA e de solvente (salina estéril) podem ser usados para indução da OA: 0,8 mg/50 µL, 1 mg/50 µL, 2 mg/50 µL, 2 mg/25 µL, 3 mg/50 µL, 4,8 mg/60 µL, por exemplo (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). Entretanto, o uso de alta dose (2 mg) do MIA para induzir a OA não só produz degeneração articular, mas também provoca lesões axonais significativas nas células DRG, incluindo alvos fora da articulação do joelho, como a pele da pata trazeira. O componente neuropático do MIA não foi observado com o uso de baixa dose (1 mg) (Thakur et al, 2012).

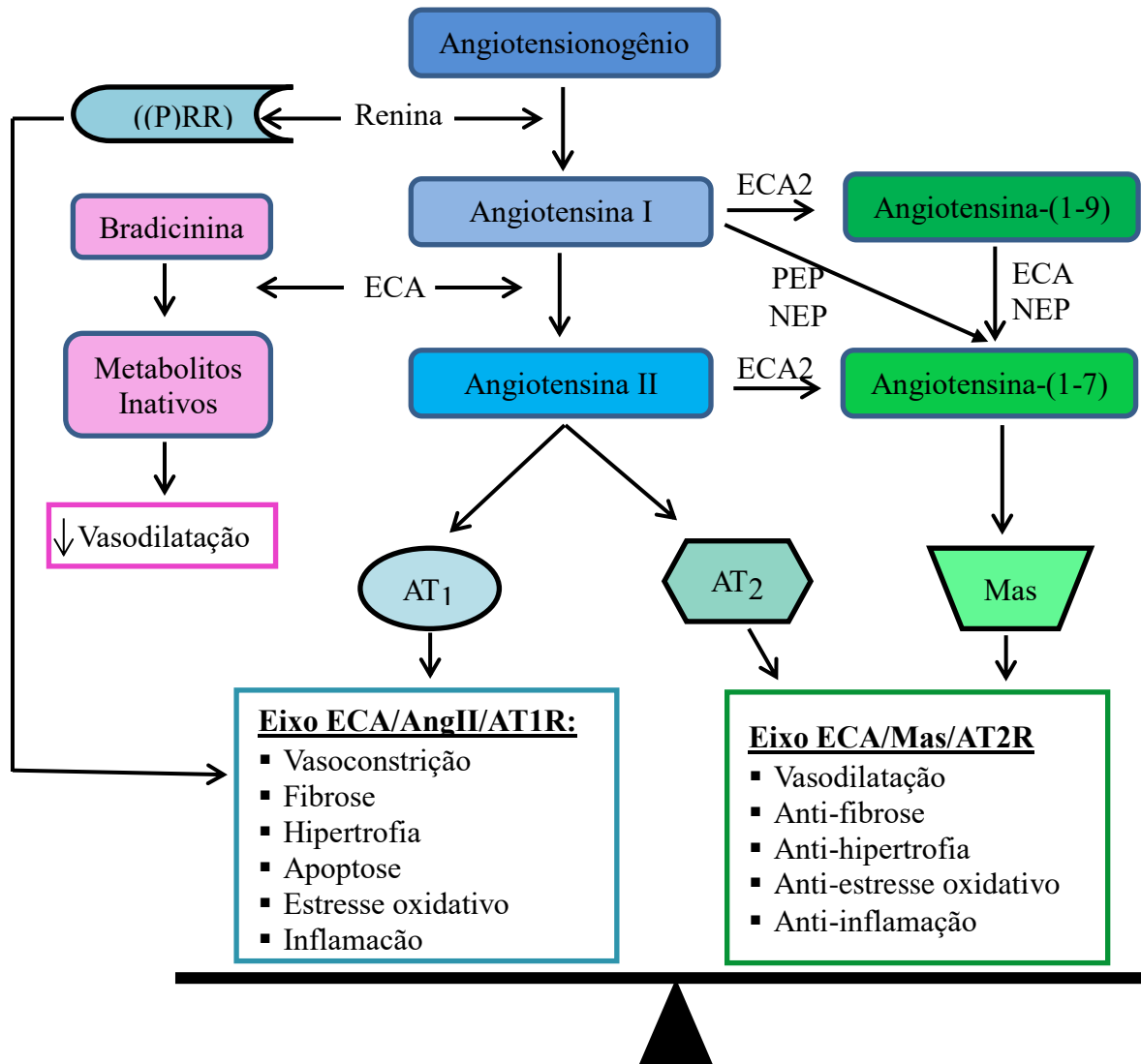
O modelo é geralmente avaliado entre 14 e 28 dias após indução, mas avaliações podem se estender para além de dois meses, dependendo dos objetivos do estudo (Dunhan et al, 1993; Guingamp et al, 1997; Fernihough et al, 2004, Thakur et al 2012). A lesão por MIA ocorre pela inibição da atividade de enzimas glicolíticas e oxidativas nos condrócitos. As desidrogenases, após 4 semanas de indução da OA, têm uma inibição quase completa, com destaque para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Dunhan, 1993; Guzman et al, 2003). A degeneração articular observada no modelo de MIA compartilha muitas características histológicas com a condição clínica, por exemplo, edema articular, infiltrado de células inflamatórias, espessamento sinovial, perda de cartilagem, morte de condrócitos, formação de osteófitos, fragmentação e colapso das trabéculas ósseas do osso subcondral, reabsorção óssea osteoclástica, cistos subcondrais e esclerose subcondral (Guzman et al, 2003; Thakur et al, 2012). Além disso, os fragmentos da degradação de proteoglicanos e colágenos na OA induzida com MIA mostraram similaridade nos mecanismos de degeneração da cartilagem aos observados na cartilagem articular com OA (Janusz et al, 2004).

## 1.2 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

### 1.2.1 Conceito

A compreensão do SRA começou há mais de um século com Tigerstedt e Bergman (Tigerstedt e Bergman, 1898). O SRA é primordial na regulação da pressão arterial e na homeostase dos eletrólitos, através da produção de Angiotensina II (Ang II), um potente vasoconstritor que induz a secreção de aldosterona e, com isso, a retenção de sódio e água, o que aumenta o volume de líquido circulante e mantém a pressão arterial normal (Dandona et al, 2007). Além disso, o SRA também interfere em vias metabólicas relacionadas à inflamação, à cicatrização, ao remodelamento e ao crescimento e desenvolvimento tecidual (Kalupahana e Moustaid-Moussa, 2012; Garcia et al, 2010; Dzau, 2001). Estes efeitos estão relacionados à presença de um SRA local ou em nível subcelular (núcleo e mitocôndrias) (Abadir et al, 2012). Nos últimos anos, houve uma revolução no conhecimento sobre o SRA, com a identificação de novas funções para os peptídeos e receptores e a descoberta de novas enzimas, bem como a identificação de dois eixos principais que se contraregulam (Figura 5) (Cat e Touyz, 2011).

A ativação do SRA começa com a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I) pela renina. A atividade catalítica da enzima conversora de angiotensina (ECA) é dependente de zinco II ( $Zn^{2+}$ ) e as bases químicas necessárias ao reconhecimento molecular de seu substrato estão associadas a uma sequência tripeptídica específica presente na Ang I. Esta sequência tripeptídica é capaz de realizar coordenação com o íon  $Zn^{2+}$  e sofrer um ataque nucleofílico, que resulta na clivagem do substrato decapeptídico inativo em um octapeptídeo ativo, Ang II (Tavares et al, 2015) (Figura 6). A Ang II, por sua vez, pode se ligar aos receptores AT1R ou AT2R (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 AT1R induz vasoconstrição, fibrose, crescimento celular e retenção de fluido. Já a ativação do AT2R induz efeitos contraregulatórios ao do AT1R, assim como o receptor MasR quando estimulado pela angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], produzida a partir da Ang II pela ação enzimática da ECA2 (Ferreira et al, 2011; Cat e Touyz, 2011; Ferreira et al, 2012) (Figura 5). A descoberta de outros peptídeos ativos do SRA, como a Ang-(1-7) que possui efeitos contraregulatórios aos produzidos pela Ang II, sugere que o equilíbrio do SRA depende do balanço entre seus componentes (Cat e Touyz, 2011; Ferreira et al, 2012).



**Figura 5:** 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 e Touyz, 2011.

### 1.2.2 SRA local

O SRA possui ações locais em diversos tecidos corporais de forma específica, desempenhando um importante papel na mediação de processos biológicos como inflamação, angiogênese, proliferação e morte celular (Garcia et al, 2010; Cat e Touyz, 2011). Essas ações são mediadas, principalmente, pela Ang II, reconhecida como uma molécula pró-inflamatória (Ferreira et al, 2011). A ação local do SRA pode ocorrer de forma independente do SRA circulante, podendo

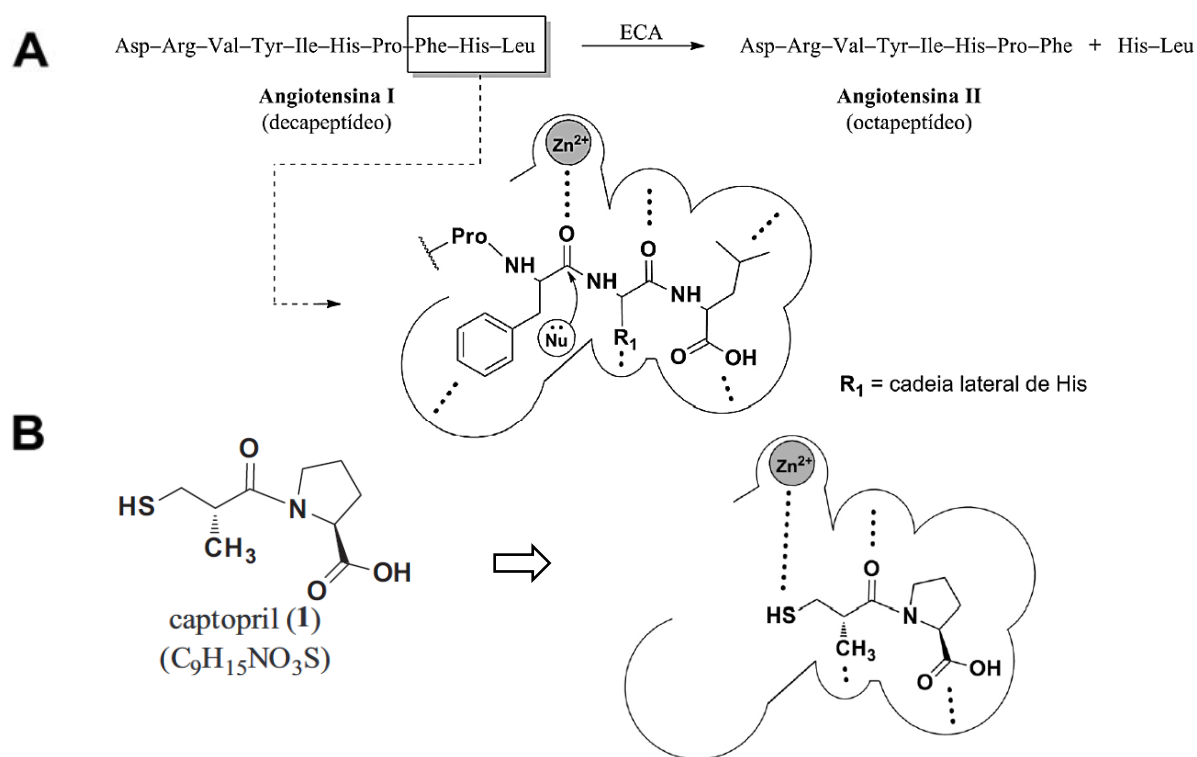
ser ativado tanto em situações em que o SRA circulante está normal quanto em situações em que ele está suprimido (Cat e Touyz, 2011). A ampla distribuição dos componentes do SRA e seus aspectos funcionais no organismo têm sido intensamente investigados (Garcia et al, 2010; Cat e Touyz, 2011). O SRA local tem sido identificado em vários sistemas orgânicos, como o digestório, respiratório, nervoso, reprodutor masculino e feminino, linfático, tegumentar, adiposo, em órgãos como coração, rins, osso e também na articulação do joelho (Çobankara et al, 2005; Paul et al, 2006; Pattacini et al, 2007; Garcia et al, 2010; Cat e Touyz, 2011; Zhuo e Li, 2011; Kalupahana e Moustaid-Moussa, 2012; Tang et al, 2015). A identificação do SRA em vários órgãos e tecidos é um dos principais embasamentos para a pesquisa da sua modulação farmacológica, além da regulação pressórica (Cat e Touyz, 2011; Abadir et al, 2012).

Evidências sustentam a ideia de um SRA local no joelho, que parece influenciar a biologia dos tecidos articulares. Kawakami et al (2012) verificaram a expressão dos AT1R e AT2R em cartilagem articular de pacientes com OA, artrite reumatoide (RA) ou que haviam sofrido fratura traumática. A exposição à IL-1 estimulou o aumento da expressão dos AT1R e AT2R na cartilagem dos pacientes com OA ou RA, mas não houve efeito na cartilagem sem condição patológica associada. Çobankara et al (2005) avaliaram o nível de renina e ECA no líquido sinovial de pacientes com OA, RA ou saudáveis e notaram que os pacientes com RA possuíam níveis mais elevados. O uso do captopril em modelo de lesão mecânica de OA de joelho modulou o nível de mRNA e/ou de expressão protéica da renina, ECA, Ang II, AT1R e AT2R na tibia proximal (Tang et al; 2015).

### ***1.2.3 Captopril – Agente químico modulador do SRA***

O captopril (D-3-mercaptop-2-metil-propionil-L-prolina) (Cushman et al, 1977), inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA), foi o primeiro agente químico utilizado para modular o SRA. Sua ação leva ao bloqueio da ECA com conseqüente redução na produção de Ang II (Figura 6) (Norris et al, 2010). O captopril é um anti-hipertensivo, amplamente utilizado na medicina cardiovascular (Garcia et al, 2010). No entanto, a redução na formação da Ang II por este iECA tem outros efeitos benéficos, além da diminuição da pressão arterial (Dandona et al, 2007; Bian et al, 2010), como anti-inflamatório, anti-fibrótico e antioxidante (Martin et al, 1984; Cruz et al, 2000; Tikiz et al, 2005; Flammer et al, 2008; Peters et al, 2010; Sládkova et al, 2007). 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). O efeito anti-inflamatório do captopril é atribuído a menor ativação do AT1R pela Ang II, reduzindo seus efeitos sobre moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas, leucócitos, células endoteliais e células musculares lisas vasculares (Dandona et al, 2007), bem como a inibição do fator de transcrição nuclear kappa B (Miguel-Carrasco et al, 2010; Cat e Touyz, 2011). A presença do grupo tiol na sua molécula também parece contribuir para esse efeito (Martin et al, 1984; Sládkova et al, 2007). Além disso, o uso dos iECAs traz um efeito colateral que é a tosse crônica devido ao aumento de bradicinina na árvore brônquica (Norris et al, 2010).



**Figura 6:** (A) Reconhecimento molecular da tríade peptídica Phe-His-Leu pela ECA. As linhas tracejadas indicam regiões onde há interação entre o substrato e a enzima. (B) Interação dos fármacos captopril com o sítio ativo da ECA. Fonte: Adaptado de Tavares et al, 2015.

## 2 JUSTIFICATIVA

A OA é a doença articular crônica mais prevalente em idosos, podendo gerar incapacidade física e morbidade significativas (Bijlsma et al, 2011; Losina et al, 2011). Atualmente, a maioria dos tratamentos para a OA ainda é direcionada para o controle sintomático da doença, mas o avanço na compreensão dos seus processos fisiopatológicos tem impulsionado o estudo das DMOAD. Esses compostos têm potencial para reduzir a progressão da doença (Hunter, 2011; Martel-Pelletier et al, 2012), contudo eles ainda não estão disponíveis para o uso clínico (Martel-Pelletier et al, 2012; Kloppenburg, 2014).

Existe uma necessidade real para melhorar as intervenções terapêuticas da OA (Yu e Hunter, 2015) e as DMOADs são uma estratégia promissora neste contexto (Hunter, 2011). Mas, considerando que a OA é uma doença que afeta toda a articulação é necessário pensar em drogas que possam atuar de forma ampla na fisiopatologia da doença. Uma aposta promissora neste sentido são as drogas moduladoras do SRA, pois há evidências da presença de um SRA local no joelho, uma das articulações mais comumente afetadas pela OA (Parmet et al, 2003; Çobankara et al, 2005; Pattacini et al, 2007; Kawakami et al, 2012; Tsukamoto et al, 2014; Prieto-Alhambra, 2014). Além disso, os macrófagos, principais células imunes associadas à patogênese da OA (Haseeb e Haqqi, 2013), também expressam componentes do SRA (Okamura et al, 1999).

O captopril é um agente anti-hipertensivo, amplamente utilizado na medicina cardiovascular (Garcia et al, 2010). Entretanto, a redução na formação da Ang II por este iECA tem outros efeitos biológicos, como ações anti-inflamatórias, anti-fibróticas e antioxidantes (Martin et al, 1984; Cruz et al, 2000; Tikiz et al, 2005; Flammer et al, 2008; Peters et al, 2009; Sládkova et al, 2007). Além disso, foram identificados efeitos condroprotetores do captopril após tratamento oral (Tang et al, 2015) ou local (Weinstein et al, 2014) em modelo experimental de OA induzida por lesão mecânica. Foi observada uma redução na expressão de renina, ECA, Ang II e AT1R e aumento na expressão do AT2R com o tratamento oral com o captopril (Tang et al, 2015).

Os conhecimentos emergentes mostram que há um SRA local no joelho e que sua modulação pelo captopril pode proteger a cartilagem articular das lesões induzidas experimentalmente (Tsukamoto et al, 2014; Tang et al, 2015; Yamagishi et al, 2018). Porém, mais estudos são necessários para investigar o potencial terapêutico do captopril como uma DMOAD e o papel da Ang II na fisiopatologia da OA. Além disso, a OA é uma doença que afeta toda a

articulação, então é importante avaliar os efeitos da modulação do SRA pelo captopril na cartilagem juntamente com a sinóvia e o osso subcondral, pois todos estão intimamente envolvidos nas alterações osteoartríticas.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da inibição da ECA na resposta fisiopatológica dos tecidos articulares durante a OA.

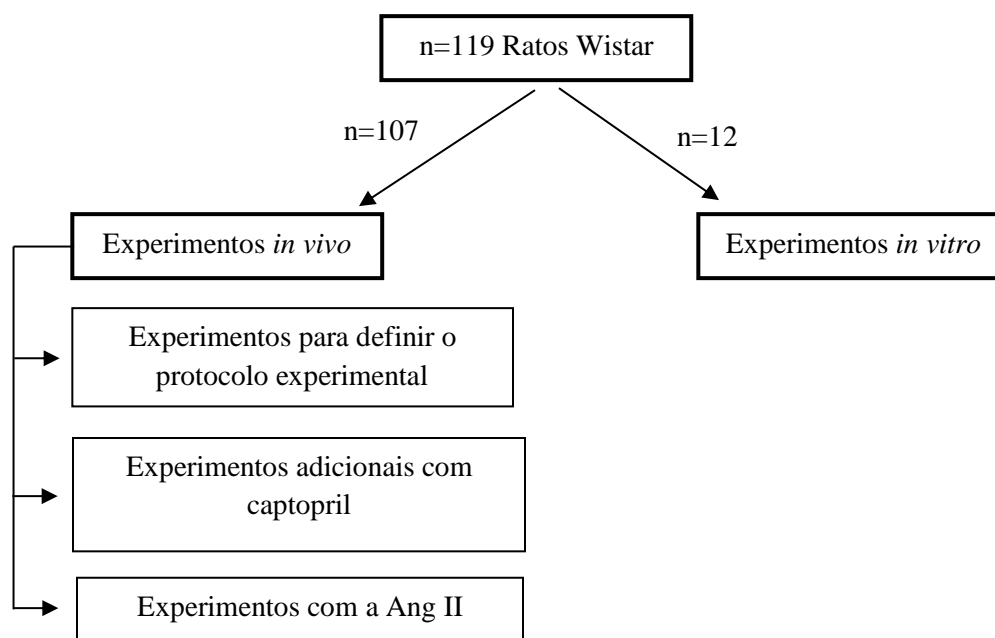
#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar análise qualitativa da expressão da ECA nos tecidos articulares (cartilagem, sinóvia, tecido de reparação da cartilagem, osso subcondral e fibrose do osso subcondral).
- Avaliar e definir o protocolo de tratamento com captopril para o estudo.
- Avaliar se o captopril altera a progressão das lesões osteoartríticas em ratos no modelo de OA induzida por MIA.
- Analisar se o tratamento com captopril modula a inflamação da OA induzida por MIA.
- Investigar o papel da Ang II na integridade biológica dos tecidos articulares do joelho.
- Analisar os efeitos do captopril e da Ang II em cultura primária de condrócitos.
- Verificar se os efeitos do captopril são devidos a sua ação direta na inibição da ECA ou se há influência do grupo tiol presente na fórmula desse composto.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Ratos Wistar machos (n=107), pesando 180-200 g, 7 semanas de vida (adulto jovem) e ratos Wistar neonatos (n=12), 5 dias de vida (Figura 7), foram obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG (CEBIO). Os ratos foram mantidos em biotério apropriado, com ciclo dia/noite de 12 h/12 h, com livre acesso a água e comida (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Brasil). Todos os procedimentos experimentais descritos no presente estudo foram realizados de acordo com o comitê de ética local (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais – CEUA – UFMG). Protocolos de aprovação (344/2012 e 92/2018) em anexo.



**Figura 7:** Fluxograma ilustrando o desenho do estudo

### 4.2 Osteoartrite induzida por MIA

Este estudo utilizou o modelo experimental de OA induzida por MIA, como descrito anteriormente (Guzman et al, 2003). Inicialmente, os ratos foram anestesiados com 100 mg/kg de

quetamina (Syntec, Cotia, SP, Brasil) e 15 mg/kg de xilazina (Syntec, Cotia, SP, Brasil). Os joelhos foram depilados e limpos com solução de etanol 70 %. Em seguida, a OA foi induzida com uma injeção de 1 mg de MIA (Sigma, São Paulo, SP, Brasil) em 50 µL de solução salina estéril no espaço intra-articular do joelho direito (Clarke et al, 1997; Bar-Yehuda et al, 2009). A articulação do joelho esquerdo serviu como controle recebendo apenas o veículo.

### **4.3 Avaliação do edema articular**

A avaliação do edema articular foi realizada para confirmação da indução da OA, pois após 24 h de indução é observado um edema articular significativo causado pelo MIA, que não é observado na injeção apenas do veículo (Aguiar, 2014). A avaliação do edema também foi realizada para avaliar os efeitos das injeções intra-articulares de Ang II. Foi usado um paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil) para medir o diâmetro do joelho direito e esquerdo. Os bicos fixo e móvel do paquímetro foram posicionados no sentido medial-lateral do joelho. Os valores foram expressos em milímetros (mm) e a diferença entre a medida basal e após 24 horas de indução foi calculada e utilizada para análise dos dados.

### **4.4 Protocolos de tratamento**

Os ratos foram ambientalizados por uma semana antes do início dos experimentos. Foram realizados 3 protocolos de tratamento com captopril (Zhejiang Chemicals, Hangzhou, Zhejiang, China): tratamento local, tratamento oral preventivo e tratamento oral terapêutico (Figura 8). No tratamento local (n=16) foi realizada uma injeção (agulha 30 G - BD Ultra fine II) intra-articular de captopril (0,1, 1, 100 ou 1000 mg/kg/cavidade) em 50 µL de salina estéril nos joelhos MIA e controle. A aplicação da injeção foi diária, por sete dias, e os animais foram sedados/anestesiados com halotano 5% (Figura 8A). No protocolo oral preventivo (n=8) o tratamento com captopril (30 mg/kg/mL) foi iniciado 1 dia antes da indução da OA e mantido por 29 dias (Figura 8B). Finalmente, no protocolo de tratamento oral terapêutico (n=28) foram usadas as doses de 30 e 80 mg/kg/mL de captopril e a gavagem da droga foi iniciada após sete dias da indução e mantida por 21 dias, sendo o tratamento diário (Figura 8C). O veículo do tratamento oral com o captopril foi a salina 0,9% não estéril.



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 1cm<sup>2</sup> para proporcionar acesso a pata do animal. 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. Os dados foram avaliados como  $\Delta$  do limiar de retirada (g), subtraindo a média das medições da média da avaliação basal.

#### **4.7 Avaliação do infiltrado celular na cavidade articular do joelho**

Os ratos foram eutanasiados 14 dias (tratamento local) e 28 dias (demais tratamentos) após a indução da OA (300 mg/kg de quetamina e 45 mg/kg de xilazina, i.m.) (n=4-8 por grupo). A lavagem intra-articular foi realizada com 3 x 20  $\mu$ L de PBS/BSA a 0,01%. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1200 rpm e a 4 °C e o sobrenadante (120  $\mu$ l) foi coletado e diluído em 100  $\mu$ l da solução de extração de citocinas (NaCl 0,4M; tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1mM; ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (8g NaCl, 0,2g KCl e 2,89g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O diluídos em 1 litro). Após, o sobrenadante foi armazenado em freezer -20 °C para análises posteriores. O sedimento foi ressuspenso no líquido de Turk para contagem de células utilizando uma câmara de Neubauer.

#### **4.8 Avaliação das alterações histopatológicas**

Após a eutanásia, os tecidos moles e patela foram removidos das articulações. A articulação tibiofemoral foi seccionada cerca de 2 cm acima e abaixo da linha média do joelho. As amostras foram fixadas durante 3 dias em formalina neutra tamponada 10% e descalcificadas em EDTA 10% durante 4 semanas. Quando as amostras estavam em descalcificação avançada, elas foram cortadas em duas metades semelhantes no plano sagital. Posteriormente, os tecidos foram lavados com água, desidratados em série graduada de etanol, diafanizados em xileno e incluídos em

parafina histológica. O material foi cortado em secções seriadas de 6 µm de espessura. Os cortes foram utilizados para colorações histológicas (azul de toluidina e hematoxilina-eosina), para o ensaio de TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) e para imunohistoquímica.

As colorações em azul de toluidina e hematoxilina-eosina foram utilizadas para as avaliações morfométricas (conteúdo de proteoglicanos e área de cartilagem) e o *score* OARSI nos grupos experimentais (n=66). Após definição do protocolo oral terapêutico do captopril (80 mg/kg), as análises morfométricas descritas acima foram repetidas e adicionado (celularidade, área de tecido e densidade celular dos tecidos articulares) (n=17). As imagens foram digitalizadas usando uma microcâmara (Q-Color5, Olympus) acoplada ao microscópio BX53 (Olympus) com auxílio do *software* Q-Capture Pro 7.0. Posteriormente, o *software* KS300 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) ou o ImageJ (Bethesda, Maryland, USA) foram usados para as quantificações pré-estabelecidas.

O ensaio para TRAP foi realizado para demonstração citológica da fosfatase ácida nos osteoclastos subcondrais da tíbia e do fêmur (n=17). O ensaio foi realizado seguindo as orientações do fabricante (Sigma, St. Louis, MO, USA). Um avaliador sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais contou o número de osteoclastos, sendo analisados 4 campos na tíbia e 4-6 no fêmur. Foi realizada a média de osteoclastos por campo, contados no aumento de 40x.

Na imunohistoquímica (n=17), os tecidos passaram por recuperação antigênica em solução de citrato, bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 10% em metanol, bloqueio de ligações inespecíficas com BSA 1% e foram incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos: 10 µg/mL de anti-IL-10 (AF519, R&D Systems); 4,4 µg/mL de anti-TNF (AF510-NA, R&D Systems); 20 µg/mL de anti-VEGF (VEGF A-20, sc-152, Santa Cruz Biotechnology); e 5,5 µg/mL de ECA (MAB4051, Millipore). Na sequência, os cortes foram incubados com biotina e estreptavidina (LSAB2, DAKO), revelados com DAB e contra-corados com hematoxilina. Para as reações de IL-10, TNF e VEGF foram avaliados o número de células positivas, porcentagem de células positivas, área de marcação, porcentagem de área marcada. Na reação para VEGF, acrescentou-se a avaliação da densidade de vasos no osso subcondral e na sinóvia. Nessa unidade, quanto mais próximos de zero estiverem os valores, mais intensa é a marcação. A reação de ECA foi realizada qualitativamente. Todas as análises foram realizadas por avaliador sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais.

#### **4.8.1 Aplicação do Score da Osteoarthritis Research Society International (OARSI)**

O sistema de avaliação histopatológica OARSI para a cartilagem com OA é baseado nas características histológicas de progressão da OA. O *score* OARSI é um método semi-quantitativo de avaliação do grau e extensão das lesões osteoartísticas (Pritzker et al, 2005).

O grau é definido como a profundidade de progressão da OA dentro da cartilagem, sendo um índice da gravidade ou da progressão biológica do processo osteoartístico. O grau é avaliado observando-se o presente grau mais avançado no interior da cartilagem, independente de sua extensão horizontal. A gravidade da OA é dividida em seis graus. Com a cartilagem normal o grau é zero. Grau 1-4 envolve alterações apenas na cartilagem articular. Já os graus 5 e 6 envolvem o osso subcondral também.

A fase é definida como a extensão horizontal do envolvimento da cartilagem dentro um local do compartimento articular. A fase representa a proporção da superfície articular que está envolvida com a OA em relação ao comprimento da superfície total, independente do grau da OA subjacente ou se o envolvimento é descontínuo (lesões múltiplas). As fases definidas são: Fase 0: não é observado atividade da OA; Fase 1: inferior a 10% da superfície está afetada; Fase 2: entre 10-25% da superfície está afetada; Fase 3: entre 25-50% da superfície está afetada; Fase 4: mais de 50% da superfície está afetada.

O *score* é definido pela relação entre o grau e da fase da OA. Portanto, o *score* representa uma combinação da gravidade e da extensão da OA avaliados. A pontuação recomendada é a combinação entre o grau e a fase, pela fórmula: [**Score: grau X fase**]. Este método produz uma pontuação que varia de 0 a 24 pontos.

#### **4.9 Dosagem de citocinas por Elisa (*Enzyme-linked immuno sorbent assay*)**

O material para dosagem de citocinas foi o lavado articular e amostras de tecidos articulares (sinóvia, gordura infra-patelar, fragmento de cartilagem do fêmur e osso subcondral) (n=13). O lavado foi realizado como descrito anteriormente. Amostras de tecidos articulares foram pesadas, adicionado solução de extração de citocinas (1 ml para cada 100 mg de tecido) e homogeneizadas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado para a dosagem das citocinas. Foi realizado ensaio de Elisa para TGF-β1 (Abcam,

Cambridge, United Kingdom), TNF, IL-6 e IL-10 (Sigma, Darmstadt, Germany), seguindo as orientações dos fabricantes.

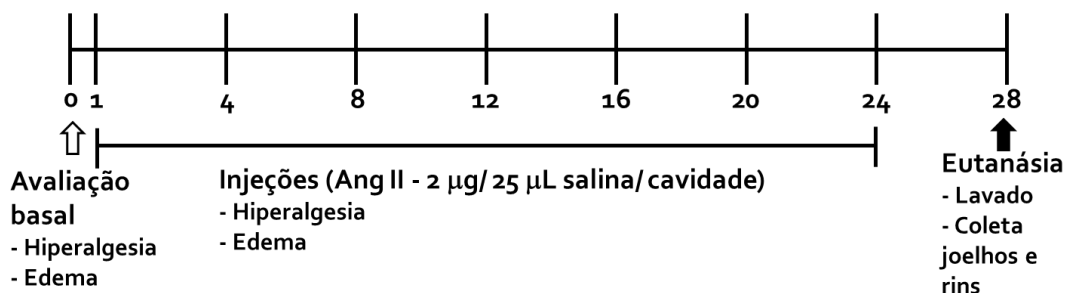
A quantificação de proteínas totais pelo método Bradford foi utilizada para normalizar a dosagem de TGF- $\beta$ 1 e IL-10 no lavado articular realizada pelo ensaio de Elisa. O método Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Zaia et al, 1998). A proteína utilizada como padrão foi o BSA. O procedimento consistiu em realizar a leitura de diferentes concentrações conhecidas de BSA para elaboração da curva padrão a partir da equação da reta e cálculo da quantidade de proteína presente. A comparação dos resultados com valores de concentrações conhecidos da curva padrão permitiu a determinação da concentração da proteína nas amostras.

#### **4.10 Avaliação dos efeitos articulares da injeção de Ang II**

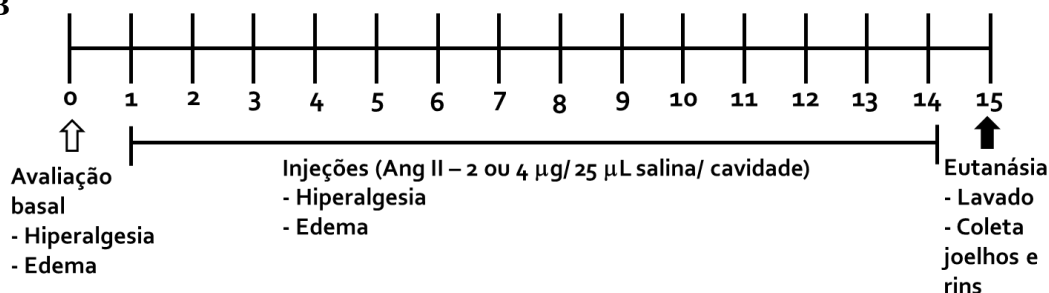
Os efeitos locais da Ang II (Bachem, King of Prussia, PA, EUA) no joelho de ratos foram investigados (n=25). Dois protocolos experimentais foram realizados (Figura 9), em um dos protocolos o peptídeo Ang II foi injetado de 4 em 4 dias, na dose 2  $\mu$ g/cavidade, dissolvido em 25  $\mu$ l de salina estéril, sendo 7 injeções num período de 28 dias. No outro, a injeção foi diária, sendo adotada as doses de 2 ou 4  $\mu$ g de Ang II, dissolvido em 25  $\mu$ l de salina estéril. As injeções foram aplicadas por 14 dias. O joelho esquerdo recebeu apenas o veículo em ambos os protocolos. O edema articular e a hiperalgesia foram avaliados, como descrito anteriormente, foram realizadas aferições basal e após 8 horas das injeções, os valores foram calculados subtraindo o tempo pós-8 horas pelo basal. Ao término dos experimentos procedeu-se com o lavado do joelhos e contagem total de leucócitos. Além disso, os joelhos foram coletados e processados histologicamente para avaliação histopatológica através do *score* OARSI.



A



B



**Figura 9:** Esquema demonstrando os protocolos experimentais de injeção de Ang II. A: injeção de 4 em 4 dias de 2 µg de Ang II. B: injeção diária de 2 ou 4 µg de Ang II.

#### 4.11 Cultura primária de condrócitos

A cultura primária de condrócitos foi realizada a partir de ratos neonatos (5 dias de vida) (n=12). A extração de condrócitos foi realizada seguindo as orientações de Gosset et al (2008). Fragmentos de cartilagem foram deixados *overnight* na colagenase tipo II 0,5 mg/mL (Gibco, Madrid, Espanha), na incubadora de CO<sub>2</sub>, em placa de petri. A solução de células foi filtrada com *cell strainer* 70 µm, centrifugada (1250 rpm, 5 min), o sobrenadante foi descartado e o pellet células ressuspendido com meio (Dulbecco, Cultilab, São Paulo). A solução de células foi homogeneizada e transferida para garrafa, que foi mantida em incubadora de CO<sub>2</sub>. Após as células atingirem confluência de aproximadamente 90%, o meio foi removido, a garrafa lavada com PBS rapidamente, então foi adicionado 2 ml de tripsina (0,25%) (Gibco, Madrid, Espanha), após o descolamento total das células o conteúdo foi centrifugado (1500 rpm, 5 min, temperatura ambiente). O pellet foi ressuspendido em meio, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer e calculado a densidade celular. Uma solução de células foi preparada e plaqueado de

3 x 10<sup>3</sup> células/100 µl em cada poço, na placa de 96 poços para os ensaios de viabilidade celular e avaliação do conteúdo de proteoglicanos. Também foi realizado plaqueamento das células em placas de 6 poços, sendo 1 x 10<sup>5</sup> células/2ml/poço, em triplicata, para avaliação da expressão de mRNA. As placas permaneceram 48 horas na incubadora de CO<sub>2</sub> para adesão das células. Então, procedeu-se com os tratamentos, captopril (10<sup>-9</sup> M) (Sigma, Darmstadt, Germany), enalapril (10<sup>-9</sup> M) (Zhejiang Huahai Pharmaceutical, Xunqiao, Zhejiang, China), MIA (6 x 10<sup>-6</sup> M) (Sigma, Darmstadt, Germany), Ang II (Bachem, King of Prussia, PA, EUA) (10<sup>-5</sup> M). A incubação com drogas foi por 36 horas.

#### **4.11.1 Avaliação da viabilidade celular**

O MTT é um (ensaio de redução de Tetrazólio) que verifica a capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o substrato [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de cristais de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O ensaio de viabilidade celular foi realizado após o período de 36h de incubação com as drogas, e também 7 e 14 dias após os estímulos. O meio foi retirado e realizou-se lavagem rápida com PBS (1X), em seguida, foi adicionado 200 µl de MTT (1mg/mL) (Sigma, Darmstadt, Germany) diluído em meio. As placas foram mantidas por 4 horas na incubadora de CO<sub>2</sub>. Após este período, foi realizada nova lavagem com PBS (1X) e, na sequência, foi adicionado 200 µ de solução de isopropanol/HCl para promover a dissolução dos cristais de formazan. Os cristais eluídos passaram por 10 minutos de agitação e o sobrenadante foi quantificado pela leitura dos valores de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. Foram realizados três experimentos independentes.

#### **4.11.2 Avaliação do conteúdo de proteoglicanos**

A coloração de *Alcian Blue* foi realizada para avaliação do conteúdo de proteoglicanos seguindo o protocolo proposto por Gosset et al (2008). O meio foi removido por aspiração, os poços foram lavados 2 vezes com PBS (1X) e adicionou-se 100 µL de glutaraldeído 4% por 15 minutos para fixar as células com a MEC. Em seguida, os poços foram lavados com 200 µL HCl 0,1 N. Então, 100 µL de *Alcian Blue* 1% foi adicionado aos poços para corar a matriz, por 30 minutos. Na sequência, os poços foram lavados com 200 µL HCl 0,1 N e aspirados para secagem.

Quando secos, os poços foram reidratados com 100 µL HCl 0,1 N. Para análise morfológica, 6 fotos por poço foram capturadas a partir de microscópio invertido (Motic, AE31, USA), acoplado ao sistema de captura Moticom 2300. As fotomicrografias foram analisadas pelo *software* ImageJ (Bethesda, Maryland, USA) para determinar a porcentagem de área de proteoglicanos.

#### ***4.11.3 Avaliação da expressão de mRNA de componentes do SRA e da MEC por PCR em tempo real***

Para extrair o RNA total, as células foram coletadas com 1 mL de TRIzol Reagent (Ambion, Van Allen Way, Carlsbad, CA, USA), diretamente do poço, por pipetagens sucessivas e estocadas em freezer -80 °C. Após trazer as amostras para temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio, as amostras foram incubadas por 5 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 12.000g, por 15 minutos a 4°C. A sobrefase, contendo o RNA total, foi transferida para um tubo limpo. Em seguida, 500 µL de isopropanol foi adicionado à fase aquosa, que foi incubada por 10 minutos para promover a precipitação do RNA. O RNA total precipitado foi concentrado por centrifugação a 12.000g, por 10 minutos a 4 °C. O *pellet* foi lavado em etanol 75% (preparado com água tratada com 0,01% de dietilpirocabonato - DEPC, para a remoção das RNases) e ressuspendido em 20 µL com água também tratada com DEPC. O material foi ainda quantificado em NanoDrop ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer e sua integridade foi confirmada após eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), aproximadamente 3 µg de RNA total foram utilizados, seguindo instruções dos fabricantes do kit *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas). Ao RNA total, foi adicionado 0,5 µg de Oligo dT e incubados a 65°C por 5 minutos, em um volume final de 10 µL, para permitir o anelamento do oligo às caudas poli(A) dos RNAs mensageiros (mRNA) presentes na amostra. Após esse período, foram adicionados 2 µL de 10 mM dNTP mix, 4 µL do tampão da enzima [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl], 20 U da RiboLock RNase Inhibitor e 200 U da RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. A reação foi incubada a 42 °C por 1 hora, seguida de uma desnaturação da enzima por 5 minutos a 70 °C. O cDNA foi estocado em freezer -20 °C.

Pares de oligonucleotídeos foram desenhados para permitir à amplificação de um fragmento do mRNA dos genes AT1R, AT2R, MasR, ECA, ECA2, TGF-β, MMP-13, Col2A1, Agrecan e β-actina de rato (*Rattus norvegicus*) (Tabela 1). As seqüências do mRNA utilizadas como molde para

o desenho dos oligos foram obtidas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). O programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) foi utilizado para o desenho dos oligonucleotídeos direto e reverso. A especificidade dos *primers* foi confirmada através de BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e os pares de *primers* foram avaliados segundo o software NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Os *primers* foram sintetizados pela Thermo Fisher Scientific, São Paulo, SP, Brasil.

A RT-qPCR foi realizada utilizando-se o iTAq™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0,4 µM de cada oligo e os cDNAs diluídos na proporção 1:10. As reações de amplificação de cada fragmento foram realizadas segundo o protocolo: um ciclo de 2 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 60 °C e 20 segundos a 72 °C e um ciclo de 5 minutos a 72 °C. A reação de controle negativo ou branco dos *primers* utilizados foi realizada na ausência de cDNA. A RT-qPCR foi realizada com o equipamento Cubett (Qiagen) e a análise de expressão diferencial foi realizada utilizando-se o software Prisma.

**Tabela 1:** Sequência dos *primers* usados para as análises da PCR.

<b>AT1R</b>	F 5'-3' CGTCATCCATGACTGTAAAATTTC
	R 5'-3' GGGCATTACATTGCCAGTGTG
<b>AT2R</b>	F 5'-3' GCAGATAAGCATTGGAAGCA
	R 5'-3' TAGGTTGCCAGAGAGGAAG
<b>MasR</b>	F 5'-3' TTGGTGGTGAAGATACGGAAG
	R 5'-3' ATGGTGGAGAAAAGCAAGGA
<b>ECA</b>	F 5'-3' GCCACATCCAGTATTTTCATGCAGT
	R 5'-3' AACTGGAAGTGGATGATGAAGCTGA
<b>TGF-β</b>	F 5'-3' TGACGTCCTGGAGTTGTACGG
	R 5'-3' GGTCATGTCATGGATGGTGC
<b>MMP-13</b>	F 5'-3' CCCTGGAGCCCTGATGTT
	R 5'-3' TGGGTCACACTTCTCTGGTG
<b>Col2A1</b>	F 5'-3' GCAGCAAGAGCAAGGAGAAG
	R 5'-3' CAGTGGACAGTAGACGGAGGA
<b>Agregan</b>	F 5'-3' TTCCCAACTATCCAGCCATC

	R 5'-3' TCGGTCAAAGTCCAGTGTGT
<b>β-Actina</b>	F 5'-3' CGTTGACATCCGTAAAGACC
	R 5'-3' TAGAGCCACCAATCCACACA

F: Forward; R: Reverse; Col2A1: Colágeno tipo II alfa 1

#### 4.12 Análise estatística

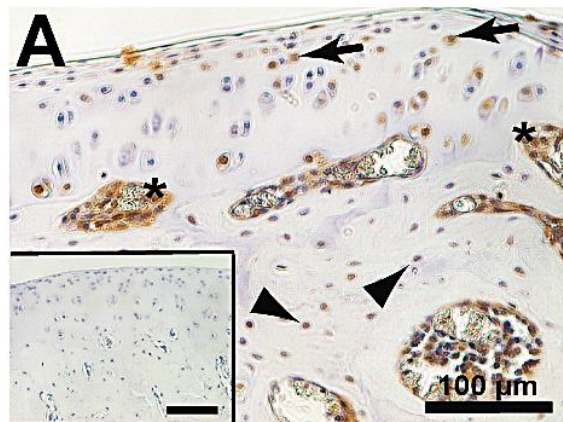
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os grupos de tratamento local e *naive* foram compostos por 4 animais por grupo e os demais grupos por 5-8 animais. Utilizou-se a análise de variância *one-way* ANOVA. Para dados com distribuição não-paramétrica, aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Para dados com distribuição paramétrica aplicou-se o *one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. Para as análises que envolviam duas variáveis foi utilizado o *two-way* ANOVA e o pós-teste de Bonferroni. Valores detectados como *outliers* pelo teste de Grubb foram removidos. O teste foi aplicado uma única vez sobre a relação de dados. 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 6.

## **5 RESULTADOS**

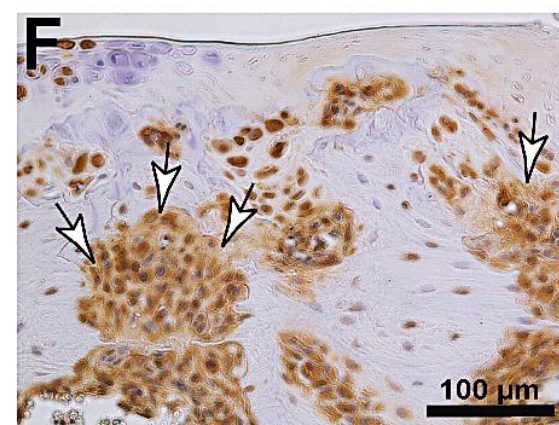
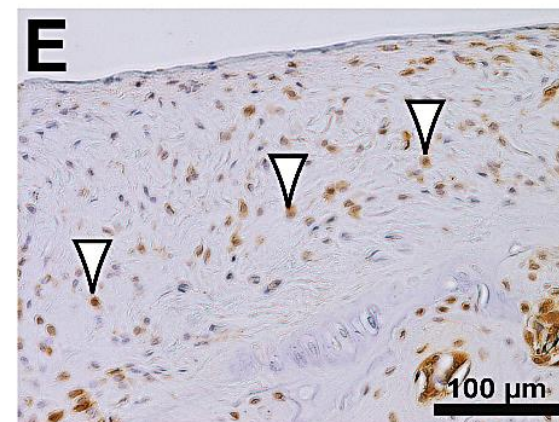
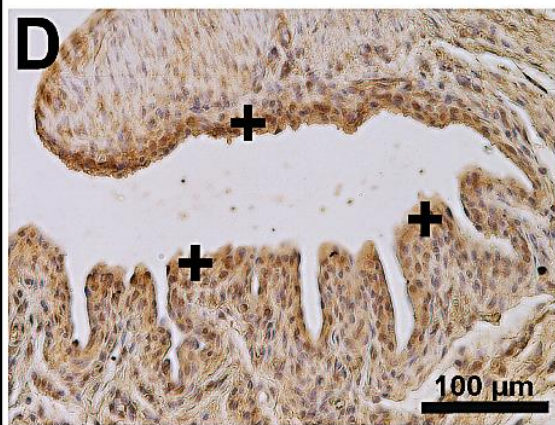
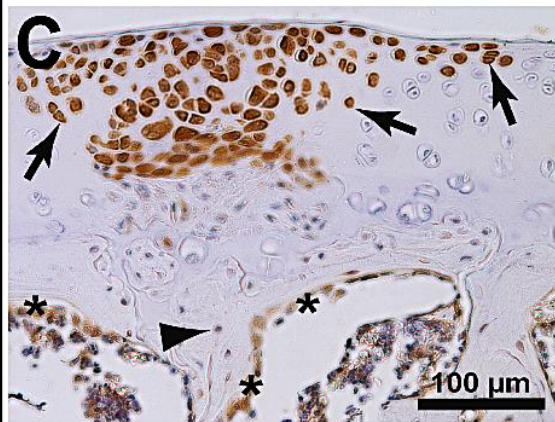
### **5.1 Expressão da ECA nos tecidos articulares**

Todos os tecidos articulares (sinóvia, cartilagem, osso, tecido fibroso no interior do tecido ósseo e tecidos de reparação da cartilagem) de ratos mostraram algum nível de expressão da ECA. A avaliação qualitativa da reação imuno-histoquímica mostrou marcação mais intensa nos condrócitos do grupo MIA em relação ao controle (Figuras 10A e 10C). No tecido ósseo subcondral foi observada marcação nos osteoblastos e osteócitos, sem diferença entre animais com ou sem OA (Figuras 10A e 10C). As células do tecido de reparação da cartilagem também foram positivas para ECA (Figura 10E). A sinóvia apresentou marcação similar entre os grupos MIA e controle, porém como os animais MIA possuem sinóvia hiperplásica, com espessamento das camadas íntima e subíntima, observou-se uma maior área marcada (Figuras 10B e 10D). O tecido fibroso do osso subcondral apresentou marcação intensa no grupo MIA (Figura 10F).

## Controle



## MIA



**Figura 10:** Expressão da ECA nos tecidos articulares de ratos. (A) cartilagem: controle negativo da reação; (B) cartilagem: controle; (C) cartilagem: MIA; (D) tecido de reparação: MIA; (E) sinóvia: controle negativo da reação; (F) sinóvia: controle; (G) sinóvia: MIA; (H) tecido fibroso do osso: MIA. Setas pretas: condrócitos marcados; Cabeças de seta preta: osteócitos marcados; Asteriscos: osteoblastos marcados; Cabeças de seta branca: fibrócitos; Símbolo mais: sinoviócitos marcados; Setas brancas: tecido fibroso ósseo.

## 5.2 Definição do protocolo de tratamento

A avaliação dos efeitos do captopril nas lesões articular induzida por MIA foi, inicialmente, realizada por meio de 3 protocolos distintos. O tratamento local com captopril (0,1, 1, 100 ou 1000 mg/kg/cavidade) no joelho de ratos previamente injetados com MIA não produziu alterações significativas em relação ao grupo MIA/veículo nas avaliações realizadas, ou seja, área de cartilagem e *score* OARSI (Figuras 11A e 11B). No protocolo de tratamento oral preventivo com captopril (30 mg/kg) também não foi possível observar efeito significativo do tratamento nos parâmetros avaliados (Figuras 11C, 11D). O oral terapêutico do captopril não apresentou efeitos para a dose de 30 mg/kg, porém na dose de 80 mg/kg foi observada uma preservação significativa da cartilagem hialina (Figura 11E) bem como uma redução do *score* da OARSI (Figura 11F). Este resultado definiu o protocolo oral terapêutico do captopril com a dose 80 mg/kg do captopril para a realização dos experimentos seguintes.

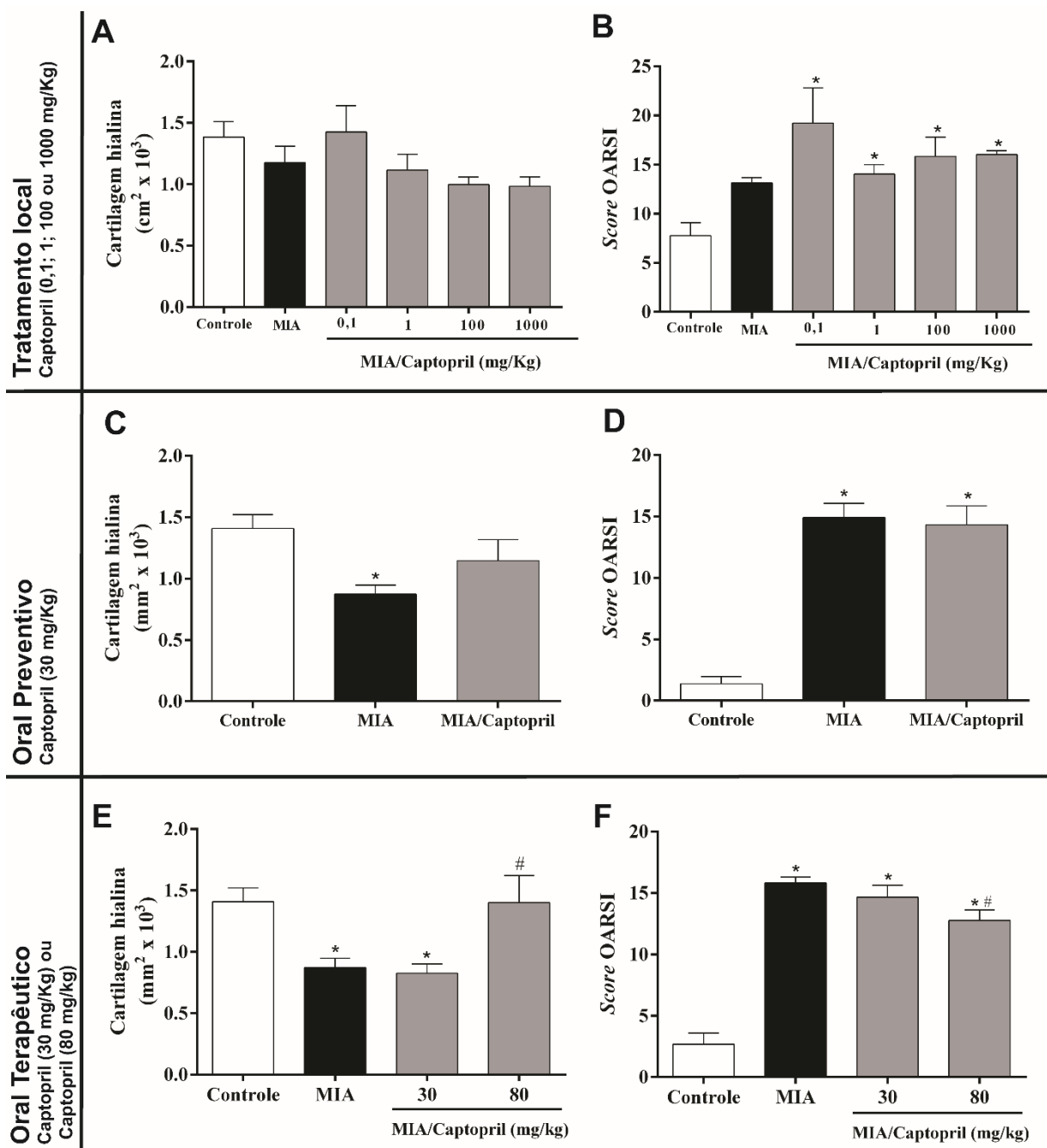
## 5.3 PAM após tratamento com captopril

Para determinar se a dose de 80 mg/kg do captopril causa alteração na pressão arterial, a PAM foi avaliada. Não foram observadas variações significativas da PAM após 21 dias de tratamento com o captopril MIA/veículo:  $92 \pm 11$  mmHg vs. MIA/captopril:  $100 \pm 12$  mmHg, ( $p > 0,05$ ).

## 5.4 Edema articular após injeção de MIA

A medida de edema após 24h de indução de OA apresentou diferenças significativas na comparação entre os grupos controle e MIA, controle:  $12,1 \pm 0,1$  mm vs. MIA:  $16,5 \pm 0,4$  mm, ( $p < 0,05$ ). O edema resolveu-se sem intervenção, não sendo mais observado após 3 dias de injeção do MIA.

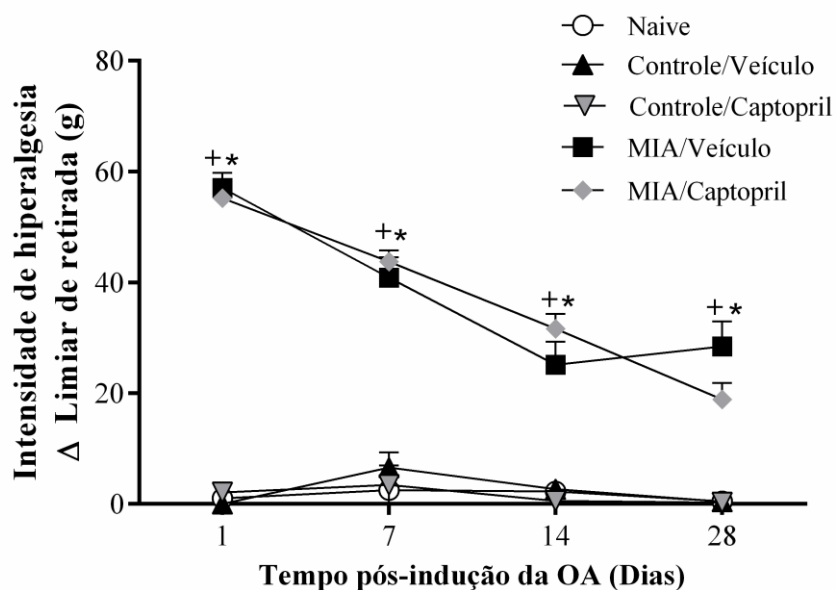




**Figura 11:** Avaliação da área de cartilagem e score OARSI nos diferentes protocolos de tratamento com captopril. (A) e (B) tratamento local; (C) e (D) tratamento preventivo; (E) e (F) tratamento oral terapêutico, \* $p < 0,05$  vs. controle/veículo; + $p < 0,05$  vs. MIA/captopril e # $p < 0,05$  vs. MIA/veículo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M.;  $n = 4-6$  por grupo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

### 5.5 Hiperalgisia após injeção de MIA e tratamento com captopril (80 mg/kg)

A injeção do MIA gerou hiperalgisia na pata dos animais, tanto na comparação com o grupo naive quanto na comparação com os animais injetados apenas com veículo, em todos os tempos avaliados (Figura 12). Contudo, é possível observar que a hiperalgisia está mais exacerbada nos tempos iniciais de avaliação e reduz ao logo do tempo. Apesar de o captopril aumentar os níveis circulantes de bradicinina, a dose adotada (80 mg/kg) não aumentou o estímulo álgico gerado pela injeção do MIA. Ao invés disso, houve uma tendência de redução da hiperalgisia no final do tratamento.



**Figura 12:** Hiperalgisia pós-indução da OA. \* $p < 0.05$  MIA/veículo ou MIA/captopril vs. seus respectivos controles; + $p < 0.05$  vs. naive. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n = 6-8$  por grupo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

### 5.6 Efeitos do captopril (80 mg/kg) nos parâmetros histopatológicos da cartilagem e tecidos de reparação

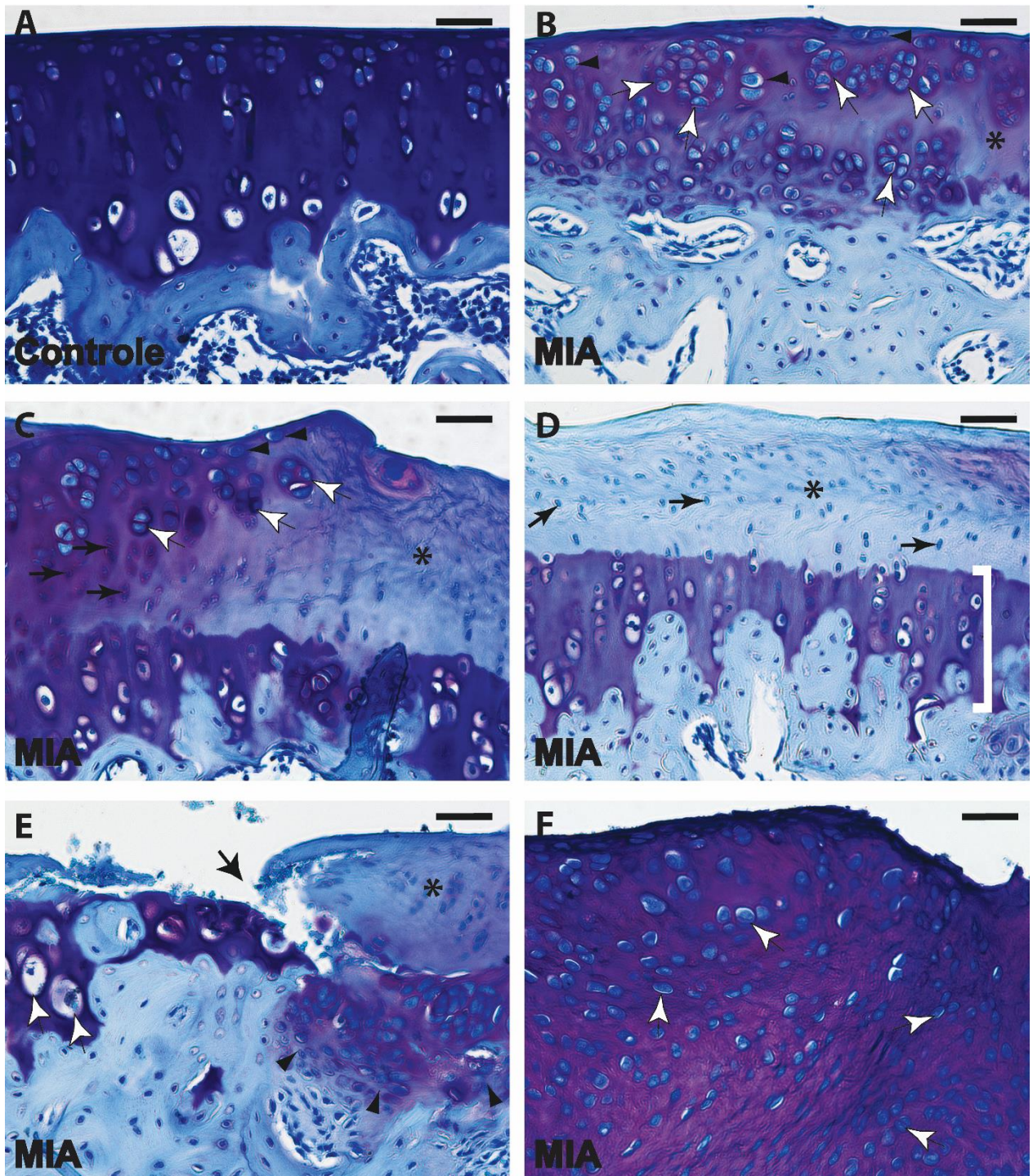
A análise histológica da cartilagem dos animais controle mostrou superfície articular lisa, condrócitos organizados adequadamente nas três zonas, nenhuma distorção ou alargamento dos

condrons, nem alterações proliferativas foram observadas, assim sendo, a cartilagem hialina não estava envolvida com a OA (Figura 13A). Já a análise da cartilagem articular dos animais injetados com MIA no joelho foram observadas diversas alterações histológicas típicas da OA, incluindo perda de proteoglicanos, proliferação e desorientação de condrócitos, hipertrofia dos condrócitos, aumento focal da coloração pericondral, superfície articular irregular, morte de condrócitos, erosão de cartilagem com exposição da cartilagem calcificada ou do osso subcondral, presença de tecido de reparação (fibrocartilagem e fibrose) (Figuras 13B, 13C, 13D, 13E e 13F). O tratamento com captopril foi capaz de atenuar as alterações histológicas induzidas pelo MIA (Figura 14), houve redução *score* OARSI e menor área de perda de proteoglicanos (Figura 14G e 14H). O tratamento com captopril também reduziu a morte de condrócitos induzida pelo MIA e esse efeito é mantido quando a área é considerada para o cálculo da densidade celular (Tabela 2). A observação morfológica da morte celular induzida pelo MIA nos condrócitos mostrou indícios de apoptose (picnose, cariólise e ausência de condrócitos no condron) (Figura 15). Quanto ao tecido de reparação a celularidade foi menor com o tratamento com captopril, mas a densidade celular não foi alterada (Tabela 2).

Além disso, a área de marcação para IL-10 e TNF no tecido cartilaginoso hialino foi maior no grupo MIA/captopril que no MIA/veículo (Figuras 16F e 16L). A quantificação da marcação para VEGF na cartilagem apresentou perfil similar à do IL-10 e TNF, com redução da área no grupo MIA/veículo em relação aos outros grupos, mas pela variabilidade dos dados não houve diferença estatística, ( $p > 0,05$ ), MIA/veículo:  $3,68 \pm 2,53 \mu\text{m}^2 \times 10^4$  vs. MIA/captopril:  $28,90 \pm 12,18 \mu\text{m}^2 \times 10^4$ . A maior expressão de IL-10 e TNF na cartilagem do grupo MIA/captopril parece ter decorrido da preservação estrutural da mesma, pois não houve diferença na avaliação da porcentagem da área marcada ( $p > 0,05$ ). Porcentagem da área de marcação de IL-10: MIA/veículo:  $3,33 \pm 1,2\%$  vs. MIA/captopril:  $6,44 \pm 1,02\%$ . Porcentagem da área de marcação de TNF: MIA/veículo:  $6,42 \pm 1,78\%$  vs. MIA/captopril:  $6,01 \pm 0,79\%$ . Entretanto, é possível notar que apesar dos valores de porcentagem de área marcada de IL-10 não serem diferentes estatisticamente, houve uma tendência de aumento no grupo MIA/captopril em relação ao MIA/veículo, o que não é observado na porcentagem de área marcada do TNF. Quanto aos tecidos de reparação, a porcentagem de marcação para IL-10 não apresentou diferença entre os grupos MIA/veículo:  $8,9 \pm 2,0\%$  e MIA/captopril:  $19,1 \pm 5,6\%$  ( $p > 0,05$ ). Porém, como a celularidade e a área de tecido estavam reduzidos no grupo MIA/captopril quando comparado ao grupo MIA/veículo (Tabela 2),

pode-se entender que houve um aumento relativo de IL-10 nos tecidos de reparação dos animais tratados com captopril. A expressão de TNF e VEGF no tecido de reparação também não apresentou diferença entre os grupos MIA (dados não mostrados).

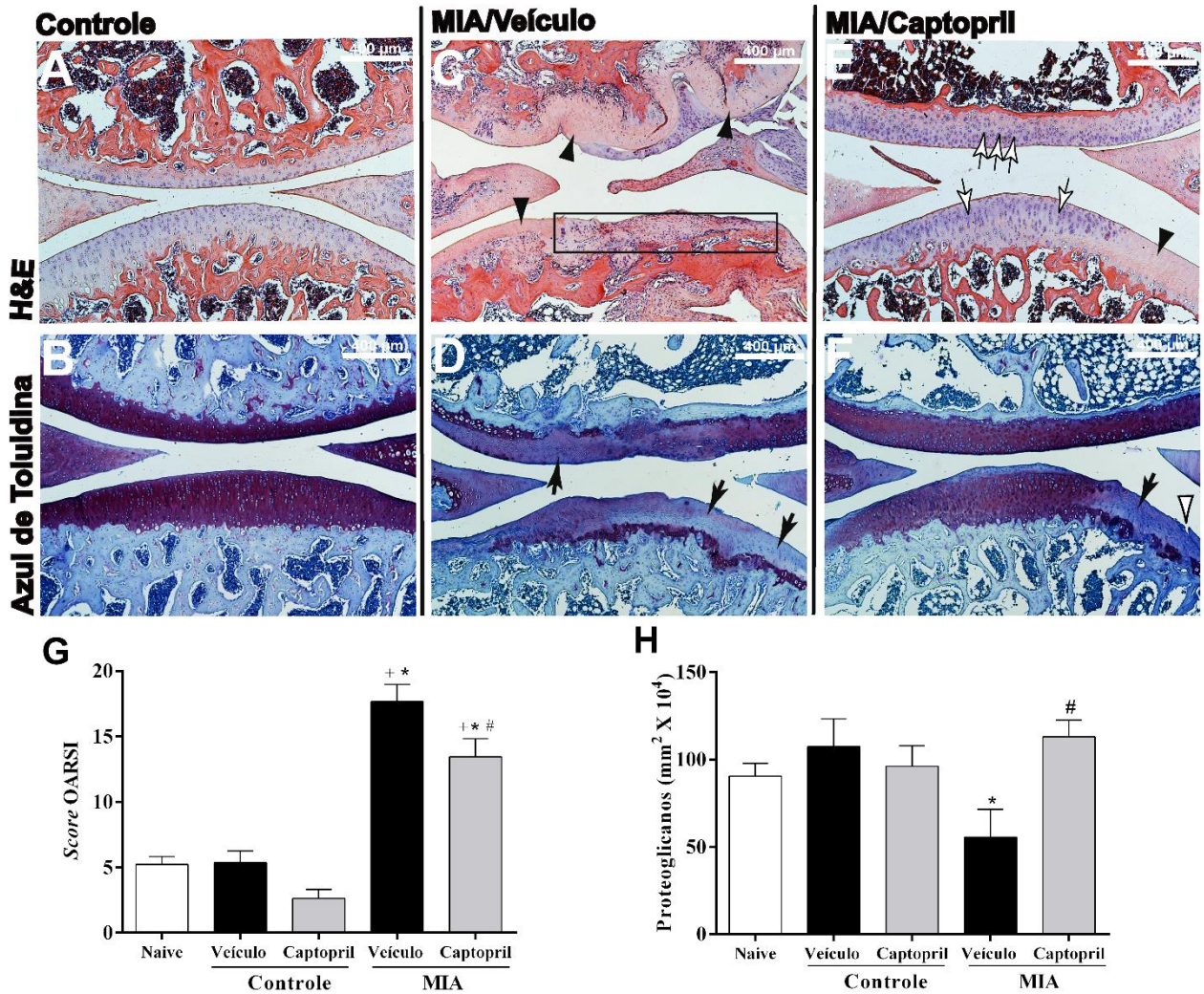
Em síntese os dados morfométricos da cartilagem e do tecido de reparação apresentados evidenciaram o efeito condroprotetor do captopril na OA induzida pelo MIA, apesar das diferenças de expressão das citocinas nos tecidos serem discretas.



**Figura 13:** Alterações histológicas da cartilagem induzidas pelo MIA. (A) controle; (B) MIA, cabeças de seta preta: hipertrofia de condrócitos, setas brancas: proliferação (clusters) e desorientação de condrócitos, asterisco: depleção da coloração catiônica da matriz; (C) MIA, cabeças de seta preta: hipertrofia de condrócitos, setas brancas: aumento focal da coloração pericondral, setas pretas: morte de condrócitos, asterisco: depleção da coloração catiônica da matriz; (D) MIA, setas pretas: morte de condrócitos, asterisco: depleção da coloração catiônica da matriz, colchete branco: expansão e aumento da basofilia da cartilagem calcificada; (E) MIA, seta preta: erosão da cartilagem hialina por desnudamento e descontinuidade da cartilagem calcificada com exposição do osso subcondral, asterisco: depleção da coloração catiônica da matriz, setas brancas: alargamento de condron e condrócito apoptótico na zona de cartilagem



calcificada, cabeças de seta preta: processo de ossificação endondrinal na cartilagem calcificada; (F) MIA, setas brancas: núcleos de fibrocondrócitos de diferentes tamanhos e sem alinhamento. Azul de toluidina, 200x, Barra 50  $\mu\text{m}$ .

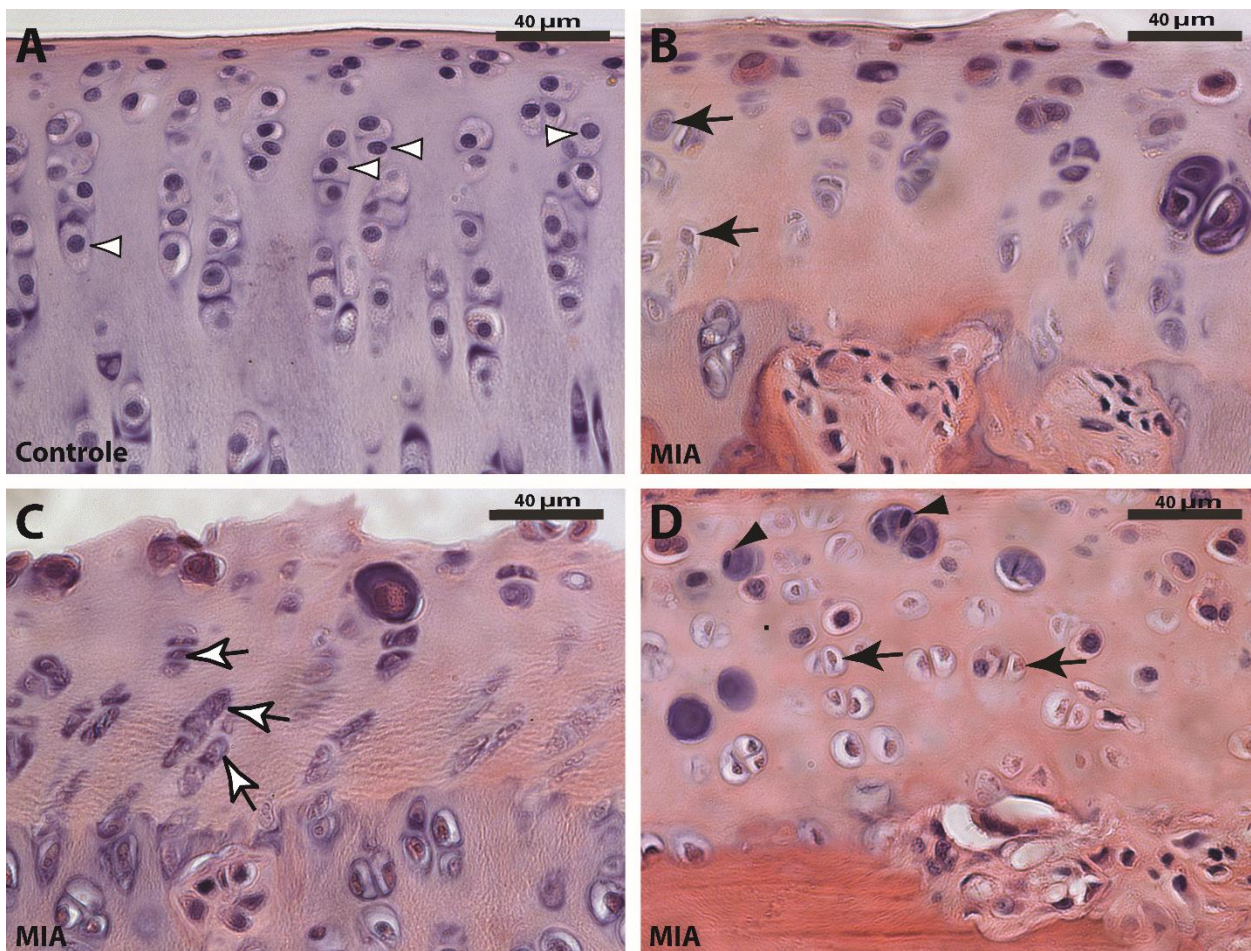


**Figura 14:** Histopatologia da cartilagem e tecidos de reparação. (A) e (B) controle; (C) e (D) MIA/veículo; (E) e (F) MIA/captopril. Retângulo: erosão da cartilagem e tecido de reparação dentro da superfície desnuda; Cabeças de seta preta: morte de condrócitos; Setas pretas: depleção catiônica - azul de toluidina. Setas brancas: proliferação e desorientação de condrócitos; Cabeça de seta branca: descontinuidade da zona superficial. HE, 40x, Barra 400  $\mu\text{m}$ . Azul de toluidina, 40x, Barra 400  $\mu\text{m}$ . (G) *score* OARSI; (H) conteúdo de proteoglicanos. \* $p < 0.05$  MIA/veículo ou MIA/captopril vs. seus respectivos controles; + $p < 0.05$  vs. naive; # $p < 0.05$  vs. MIA/veículo. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n = 6-8$  por grupo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

**Tabela 2:** Morfometria da cartilagem e tecido de reparação.

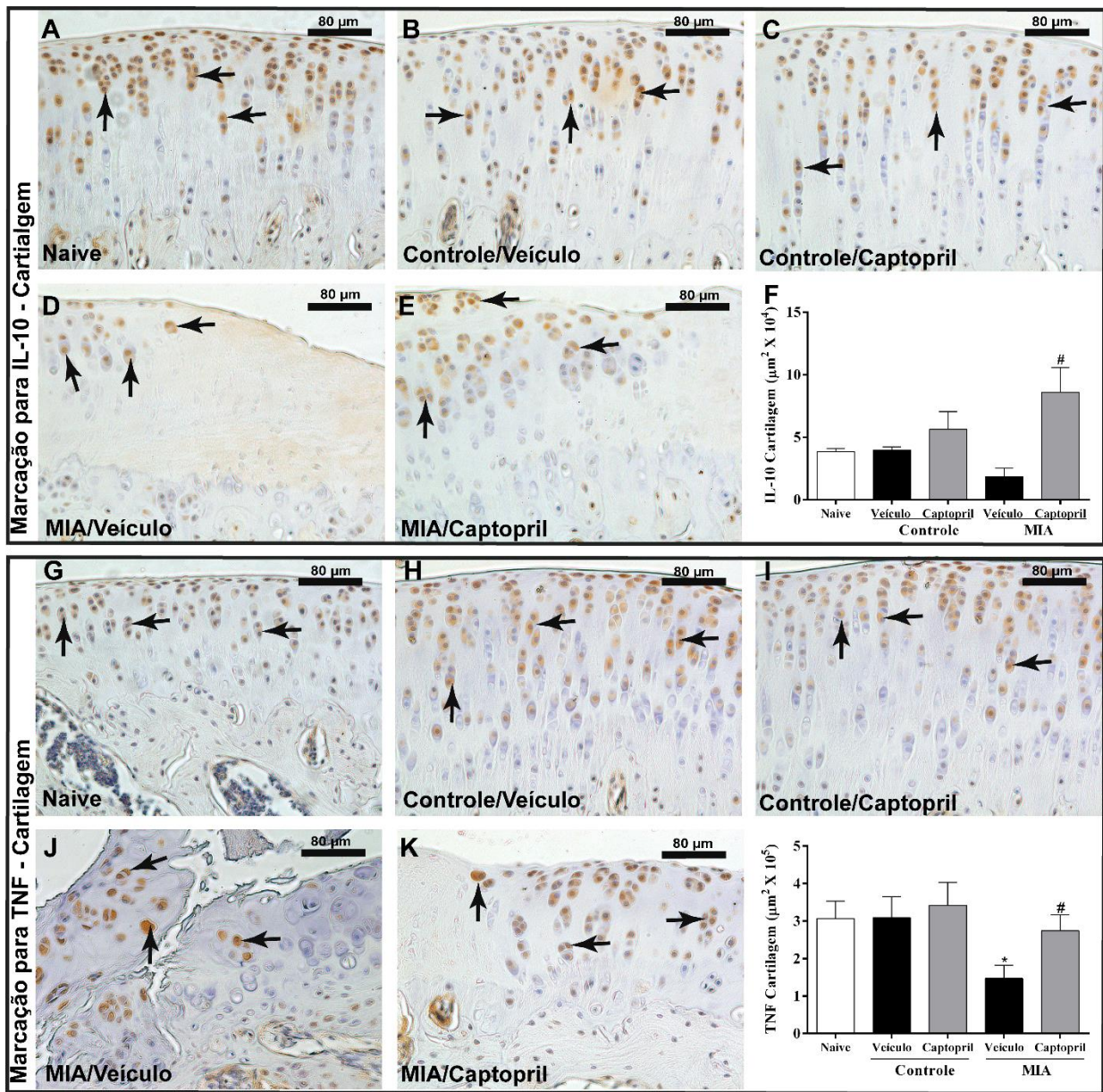
	Naive	Controle/Veícul o	Controle/Captopril	MIA/Veículo	MIA/Captopril
<b>Nº de Condrócitos (Células)</b>	1421 ± 142,3	1046 ± 88,9	1185 ± 76,5	227 ± 87,5 <sup>+</sup> *	933 ± 232,5 <sup>#</sup>
<b>Área de cartilagem (µm<sup>2</sup> x 10<sup>5</sup>)</b>	6,60 ± 0,73	6,36 ± 0,63	6,78 ± 0,51	4,97 ± 1,16	8,64 ± 0,55 <sup>#</sup>
<b>Densidade Celular da cartilagem (Células/µm<sup>2</sup> x 10<sup>5</sup>)</b>	20,81 ± 0,91	16,58 ± 0,61	17,79 ± 0,91	3,64 ± 1,33 <sup>+</sup> *	10,16 ± 2,31 <sup>+</sup> #
<b>Nº de fibrócitos e fibrocondrócitos (Células)</b>	0,0 ± 0,0	139,3 ± 93,6	59,2 ± 39,2	2155 ± 460,8 <sup>+</sup> *	816,9 ± 265,2 <sup>+</sup> #
<b>Área de tecido de reparação (µm<sup>2</sup> x 10<sup>4</sup>)</b>	0,0 ± 0,0	2,36 ± 1,53	0,52 ± 0,52	68,63 ± 13,41 <sup>+</sup> *	34,76 ± 14,30 <sup>#</sup>
<b>Densidade de tecido de reparação (Células/µm<sup>2</sup> x 10<sup>4</sup>)</b>	0,0 ± 0,0	19,63 ± 12,46	11,67 ± 7,86	61,55 ± 15,62 <sup>+</sup>	41,32 ± 8,72 <sup>+</sup>

\*p<0.05 MIA/veículo ou MIA/captopril vs. seus respectivos controles; +p<0.05 vs. naive; #p<0.05 vs. MIA/veículo. Os dados estão expressos como média ± E.P.M.; n=6-8 por grupo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).



**Figura 15:** Evidências morfológicas de apoptose nos condrócitos. (A) controle; (B), (C) e (D) MIA. Cabeça de seta branca: condrócitos com coloração e forma normais; Seta preta: cariólise; Seta branca: ausência de condrócito no condron; Cabeça de seta preta: picnose.





**Figura 16:** Expressão de IL-10 e TNF na cartilagem hialina. (A) naive; (B) controle/veículo; (C) controle/captopril; (D) MIA/veículo; (E) MIA/captopril; (F) quantificação da área de marcação para IL-10; (G) naive; (H) controle/veículo; (I) controle/captopril; (J) MIA/veículo; (K) MIA/captopril; (L) quantificação da área de marcação para TNF. Setas pretas: marcação de IL-10 ou TNF em condrócitos. \* $p < 0.05$  vs. controle/veículo; # $p < 0.05$  vs. MIA/veículo. 200x, Barra 80  $\mu\text{m}$ . Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n = 4-8$  por grupo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

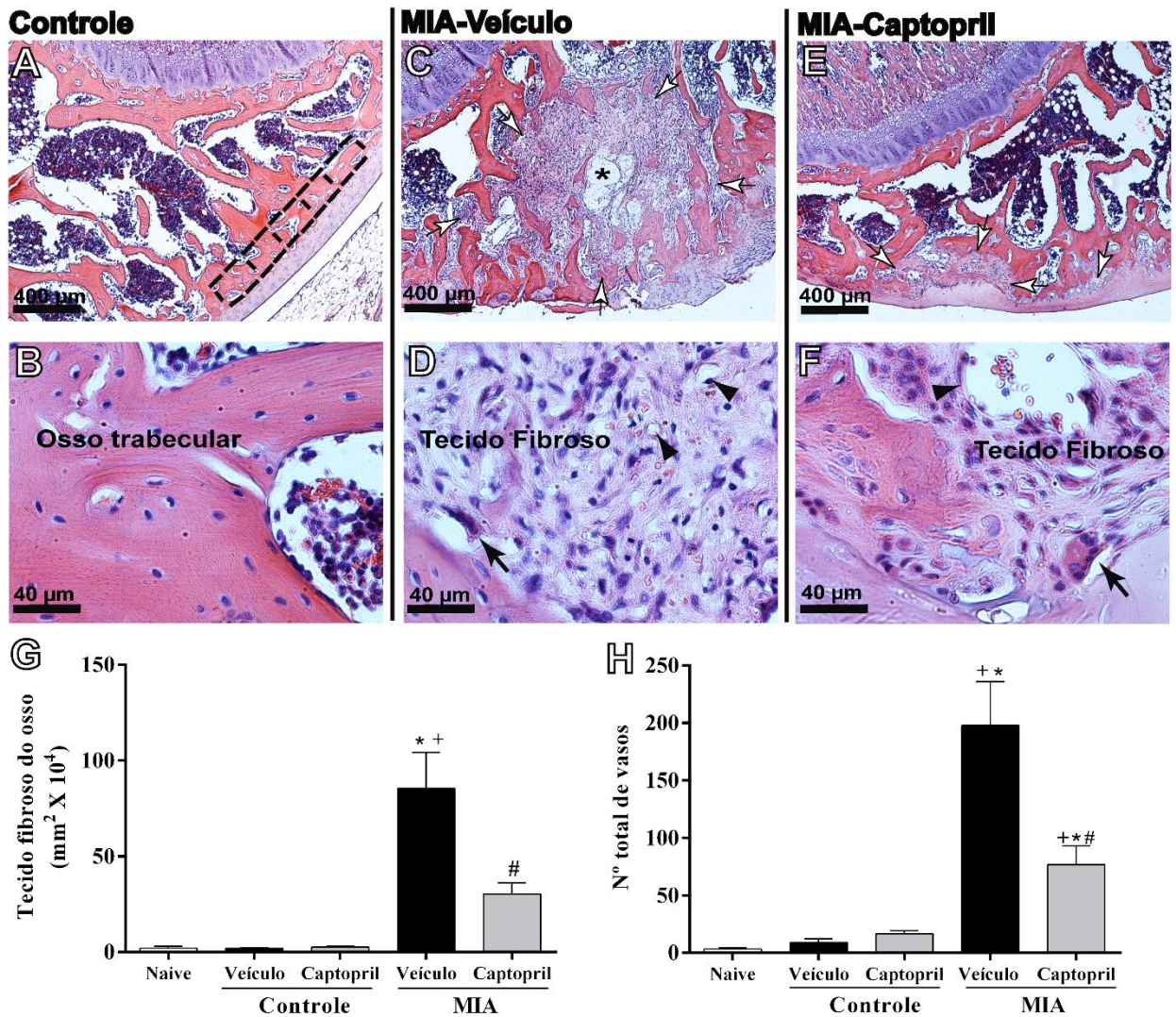
## 5.7 Efeito do captopril (80 mg/kg) nas alterações ósseas induzidas pelo MIA

A injeção do MIA induziu a deposição de uma quantidade significativa de tecido fibroso no osso subcondral, estendendo até próximo do disco epifisário (Figuras 17C e 17E). Mesmo com a avaliação restrita à área subcondral subjacente à cartilagem (Figura 17A), a quantidade de tecido fibroso foi expressivamente menor nos animais tratados com captopril (Figura 17G). Além disso, o número de vasos sanguíneos neste tecido foi menor no grupo MIA/captopril na comparação com o MIA/veículo (Figura 17H). Entretanto, o aumento da expressão do VEGF no tecido fibroso do osso subcondral do grupo MIA/veículo é relativo (Figuras 17I-17L), porque não foi observado diferença no cálculo da porcentagem de área marcada MIA/veículo:  $51,91 \pm 4,95\%$  vs. MIA/Captopril:  $30,18 \pm 7,70\%$ , ( $p > 0,05$ ). A deposição do tecido fibroso é secundária ao colapso e fragmentação do osso trabecular subcondral, proveniente da intensa atividade dos osteoclastos, observados próximos as áreas de reabsorção óssea (Figuras 17D e 17F).

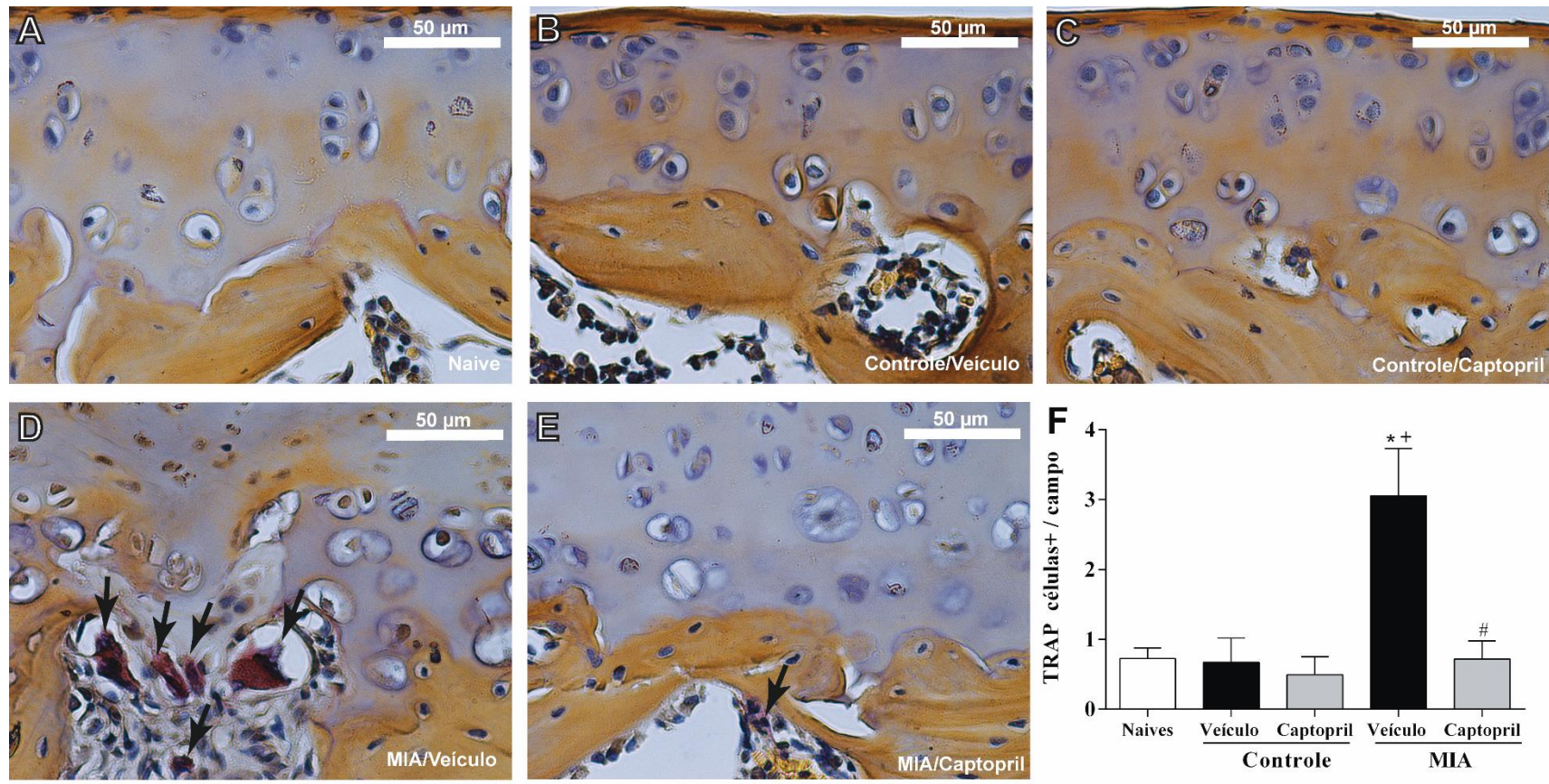
As células positivas para TRAP significativamente aumentadas no grupo MIA/veículo confirmam a relação dos osteoclastos com as alterações ósseas induzidas pelo MIA. O tratamento com captopril foi capaz de normalizar o aumento de osteoclastos (Figura 18).

A maior área de expressão do TNF no grupo MIA/veículo (Figura 19E) é atribuída à maior área de tecido nesse grupo, uma vez que não foi detectado diferenças significativas na análise da porcentagem de área marcada MIA/veículo:  $48,68 \pm 2,88\%$  vs. MIA/Captopril:  $46,16 \pm 3,60\%$ , ( $p > 0,05$ ). A expressão de IL-10 na fibrose do osso subcondral, por sua vez, foi influenciada pelo tratamento com captopril (Figura 19A) apesar da área de tecido analisada ter sido maior no grupo MIA/veículo em relação ao MIA/captopril, não houve diferença na área de expressão para IL-10 entre os grupos. Além disso, a análise da porcentagem entre os grupos MIA foi diferente, MIA/veículo:  $37,26 \pm 1,69\%$  vs. MIA/Captopril:  $45,52 \pm 2,1\%$ , ( $p < 0,05$ ). O conjunto de dados acima permite concluir que o captopril atenua as alterações ósseas induzidas pelo MIA.



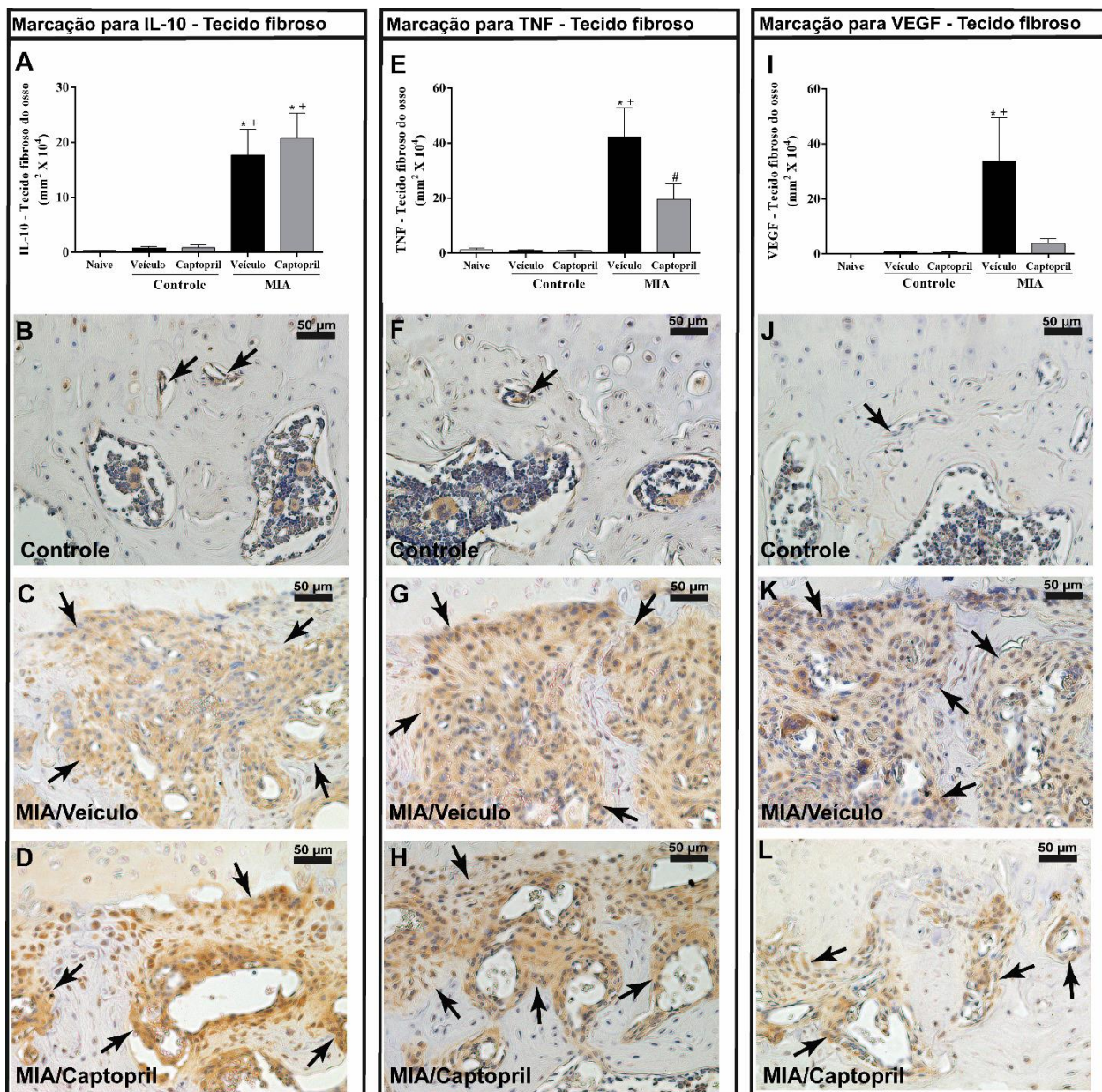


**Figura 17:** Histopatologia do osso subcondral. (A) e (B): controle; (C) e (D): MIA/veículo; (E) e (F): MIA/Captopril. Tracejado: Presença de osso trabecular íntegro, área de avaliação morfométrica; Setas brancas: tecido fibroso em área de colapso e fragmentação do osso trabecular subcondral; Asterisco: cisto no interior do tecido fibroso; Cabeças de seta: vasos sanguíneos; Setas pretas: osteoclastos. HE, 40x e 400x, Barras 400 µm e 40 µm. (G) quantificação da área de tecido fibroso subcondral; (H) número total de vasos no osso subcondral. \*p<0.05 MIA/veículo ou MIA/captopril vs. seus respectivos controles; +p<0.05 vs. naive; #p<0.05 vs. MIA/veículo. Os dados estão apresentados como média ± E.P.M.; n=6-8 por grupo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).



**Figura 18:** Marcação para TRAP em osteoclastos subcondrais da tíbia e do fêmur. (A) naive; (B) controle/veículo; (C) controle/captopril; (D) MIA/veículo; (E) MIA/captopril; (F) quantificação das células positivas para TRAP. Setas brancas: osteoclastos marcados para TRAP. 400x, Barra 50  $\mu$ m \* $p$ <0.05 vs. controle; + $p$ <0.05 vs. naive; # $p$ <0.05 vs. MIA/veículo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M.;  $n$ =4-6 por grupo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).





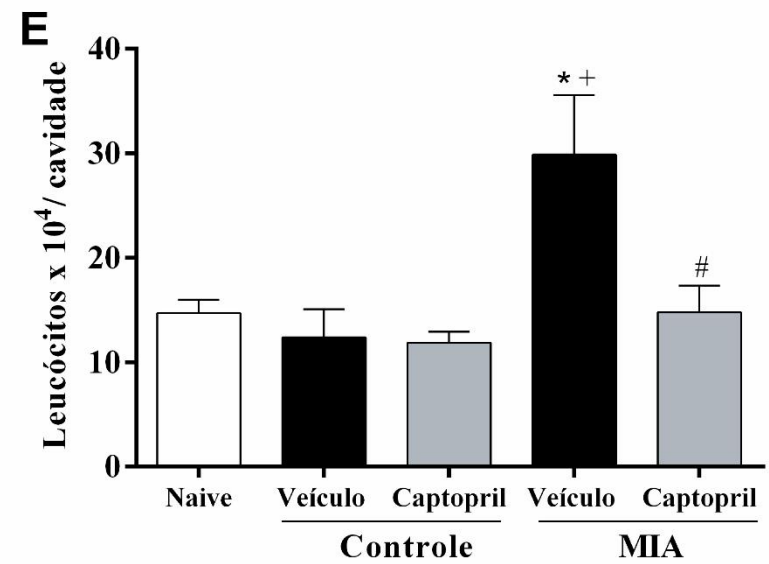
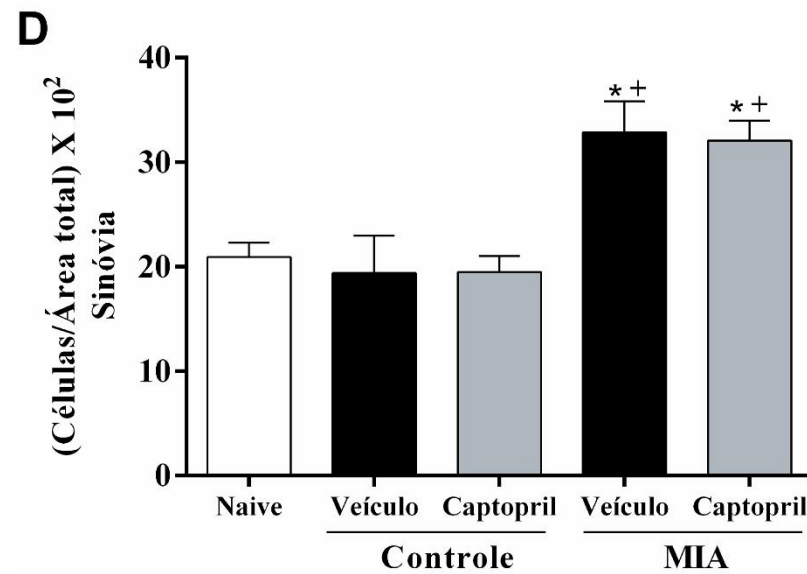
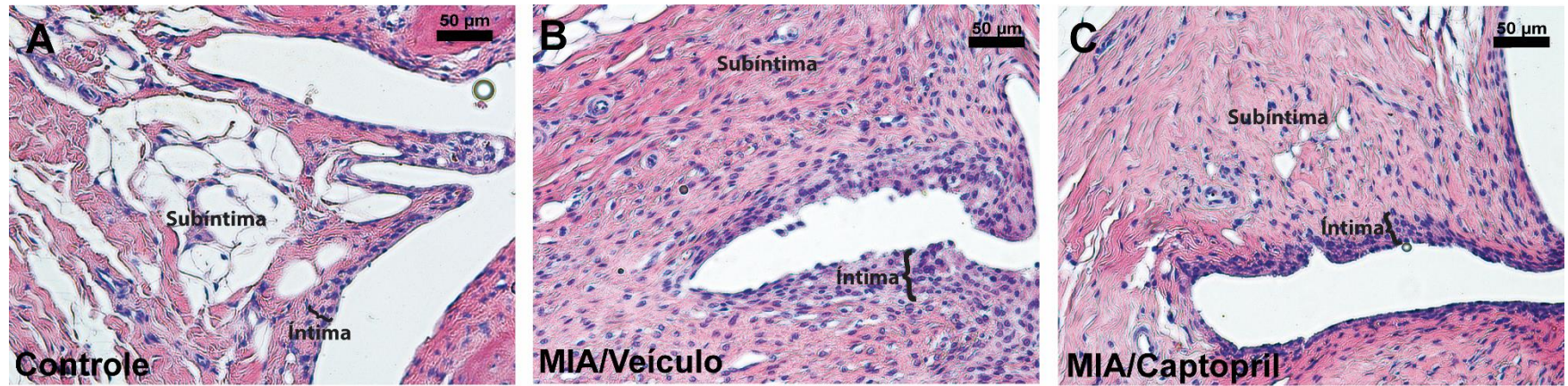
**Figura 19:** Expressão de IL-10, TNF e VEGF no tecido fibroso do osso subcondral. (A) quantificação da área de marcação para IL-10; (B) Controle; (C) MIA/veículo; (D) MIA/captopril; TNF; (E) quantificação da área de marcação para TNF; (F) Controle; (G) MIA/veículo; (H) MIA/captopril; (I) quantificação da área de marcação para VEGF; (J) Controle; (K) MIA/veículo; (L) MIA/captopril. Setas pretas: marcação para IL-10, TNF e VEGF no tecido fibroso (grupos MIA) ou elementos da medula óssea (controle). \* $p < 0.05$  MIA/veículo ou MIA/captopril vs. seus respectivos controles; + $p < 0.05$  vs. naive; # $p < 0.05$  vs. MIA/veículo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M.;  $n = 6-8$  por grupo (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls).

### **5.8 Efeitos do captopril (80 mg/kg) na sinóvia, leucócitos totais, mediadores inflamatórios e fatores de crescimento**

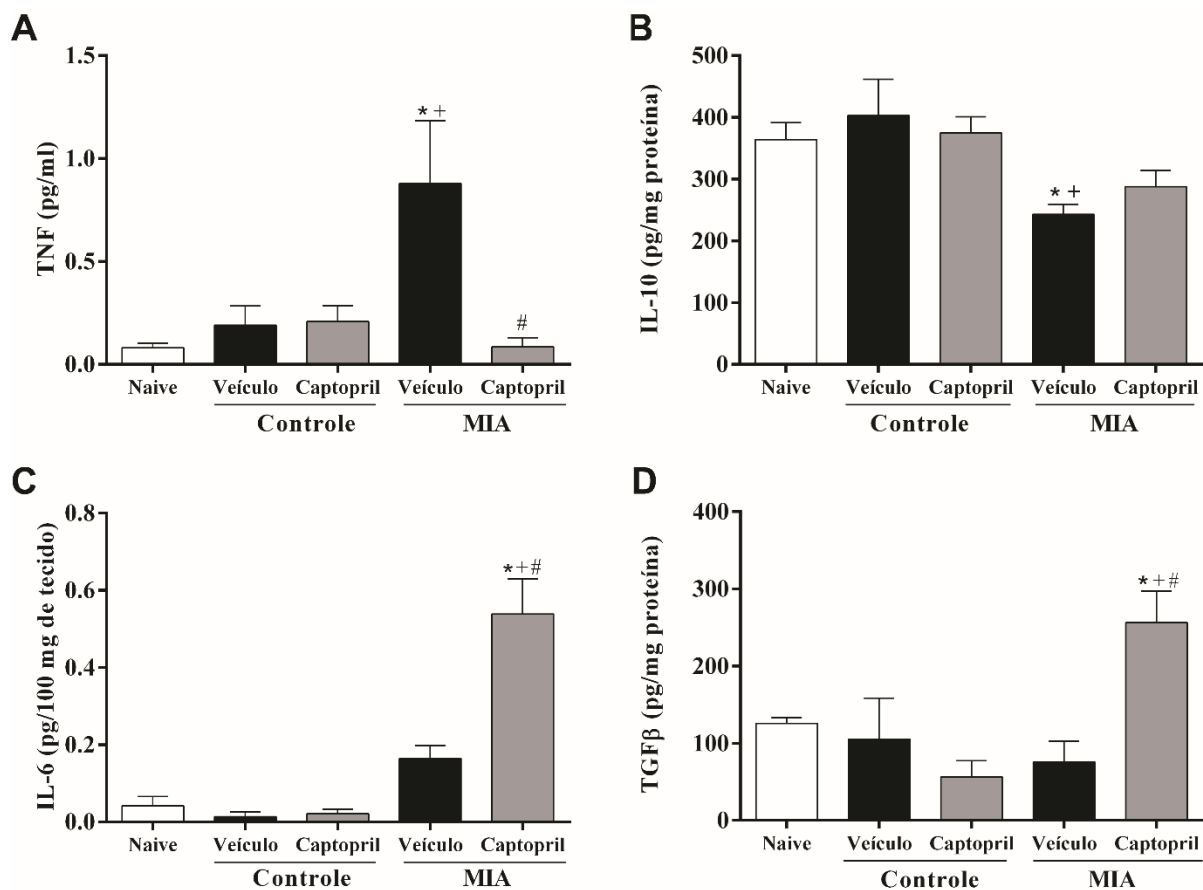
A indução da OA com MIA promoveu hiperplasia da sinóvia, com espessamento da camada íntima e maior deposição de fibras colágenas na subíntima (Figuras 20B e 20C). O tratamento com captopril não influenciou a densidade celular da sinóvia (Figura 20D). Contudo, o recrutamento de leucócitos a partir da sinóvia para a cavidade articular induzido pelo MIA foi normalizado com o tratamento com captopril (Figura 20E). O tratamento não alterou expressão tecidual das citocinas IL-10 e TNF e do VEGF na sinóvia (dados não mostrados).

A dosagem das citocinas ou fatores de crescimento/vascular a partir do lavado articular ou tecidos articulares mostrou aumento da expressão de TNF no grupo MIA/veículo em relação ao naive, respectivo controle e MIA/Captopril (Figura 21A). O oposto ocorreu com a IL-10, ou seja, os seus níveis foram reduzidos no grupo MIA/veículo em relação ao naive e respectivo controle. A tratamento com captopril não interferiu nesse efeito (Figura 21B). Tanto os níveis de IL-6 quanto de TGF- $\beta$  aumentaram no grupo MIA/Captopril em relação ao naive, respectivo controle e MIA/veículo (Figura 21C e 21D), indicando a participação de ambos fatores na resposta dos tecidos articulares ao captopril. A dosagem do TGF- $\beta$  a partir dos tecidos articulares, por sua vez apresentou uma tendência de redução no grupo MIA/Captopril:  $692 \pm 138,6$  pg/100 mg de tecido em relação ao MIA/veículo:  $1038 \pm 127,5$  pg/100 de tecido, mas sem diferença ( $p > 0,05$ ).





**Figura 20:** Morfometria da sinóvia e contagem de leucócitos. (A) Controle; (B) MIA/veículo; (C) MIA/captopril; (D) densidade celular da sinóvia; (E) contagem de leucócitos articulares. Os dados são expressos como média ± E.P.M.; n=6 por grupo. \*p<0.05 vs. controle; +p<0.05 vs. Naive; #p<0.05 vs. MIA/Veículo. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls.



**Figura 21:** Concentração de TNF, IL-10, IL-6 e TGF- $\beta$  no joelho de ratos. Medido a partir do lavado articular: TNF, IL-10 e TGF- $\beta$ . Medido a partir dos tecidos articulares: IL-6. Os ensaios de IL-10 e TGF- $\beta$  foram normalizados pelo nível de proteína total. Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n=4-6 por grupo. \*p<0.05 MIA/veículo ou MIA/captopril vs. seus respectivos controles; +p<0.05 vs. Naive; #p<0.05 vs. MIA/Veículo. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman Keuls.

## 5.9 Efeitos da Ang II nos tecidos articulares

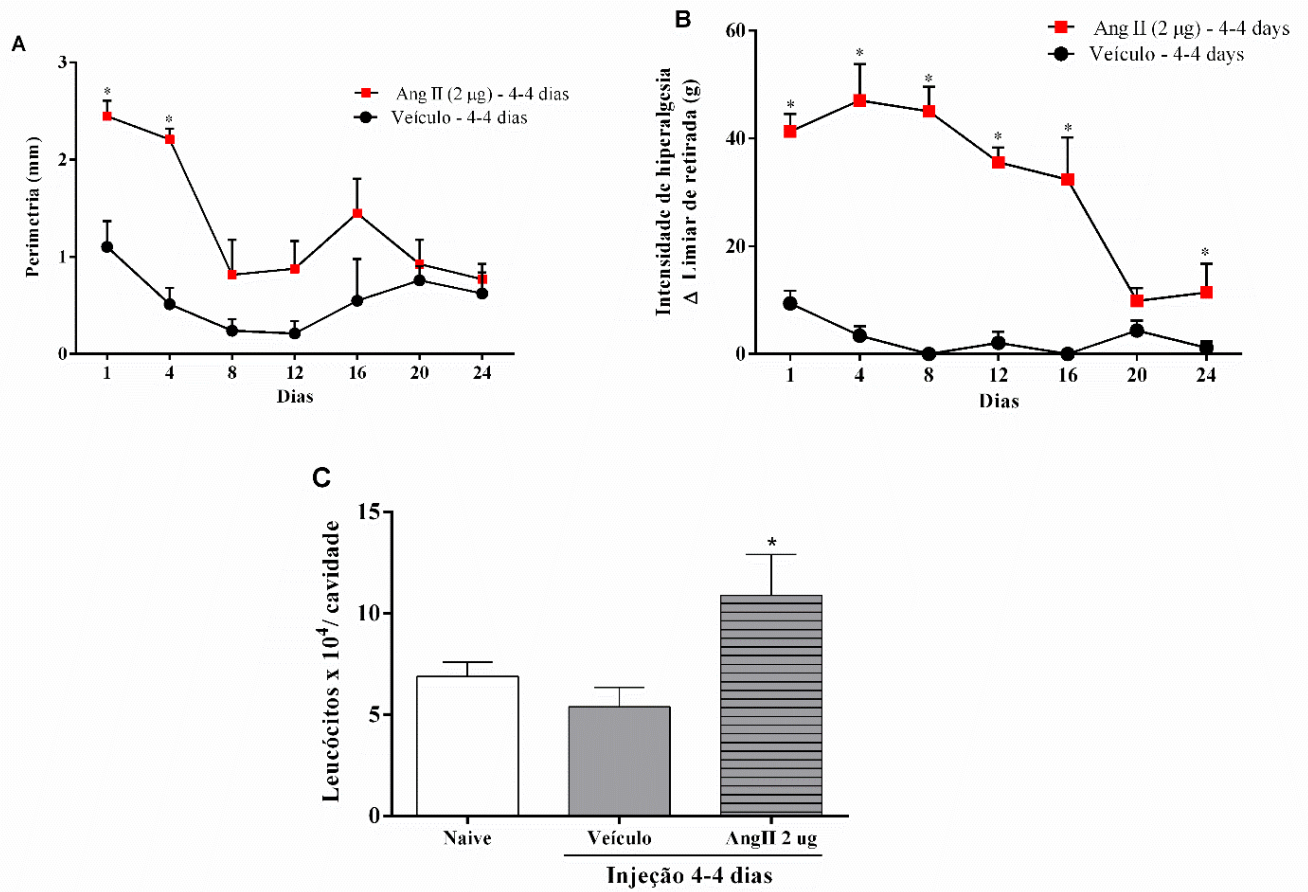
Para avaliar se a injeção de Ang II reproduziria as alterações osteoartríticas induzidas pelo MIA, investigou-se o efeito direto da Ang II no joelho. A administração local de Ang II (2  $\mu$ g) de 4 em 4 dias gerou edema no joelho dos animais nos dias 1 e 4, não sendo observado nas medidas dos dias posteriores (Figura 22A). A injeção de Ang II (2  $\mu$ g) de 4 em 4 dias também promoveu hiperalgesia nos animais, sendo observada em todos os tempos avaliados, com exceção do dia 20 (Figura 22B). Além disso, Ang II (2  $\mu$ g) estimulou o recrutamento de leucócitos para a cavidade articular (Figura 18C). Quanto ao protocolo de injeção diária de Ang II (2  $\mu$ g ou 4  $\mu$ g) é possível notar que a injeção do peptídeo estimulou a formação de edema e gerou hiperalgesia (Figuras 23A-



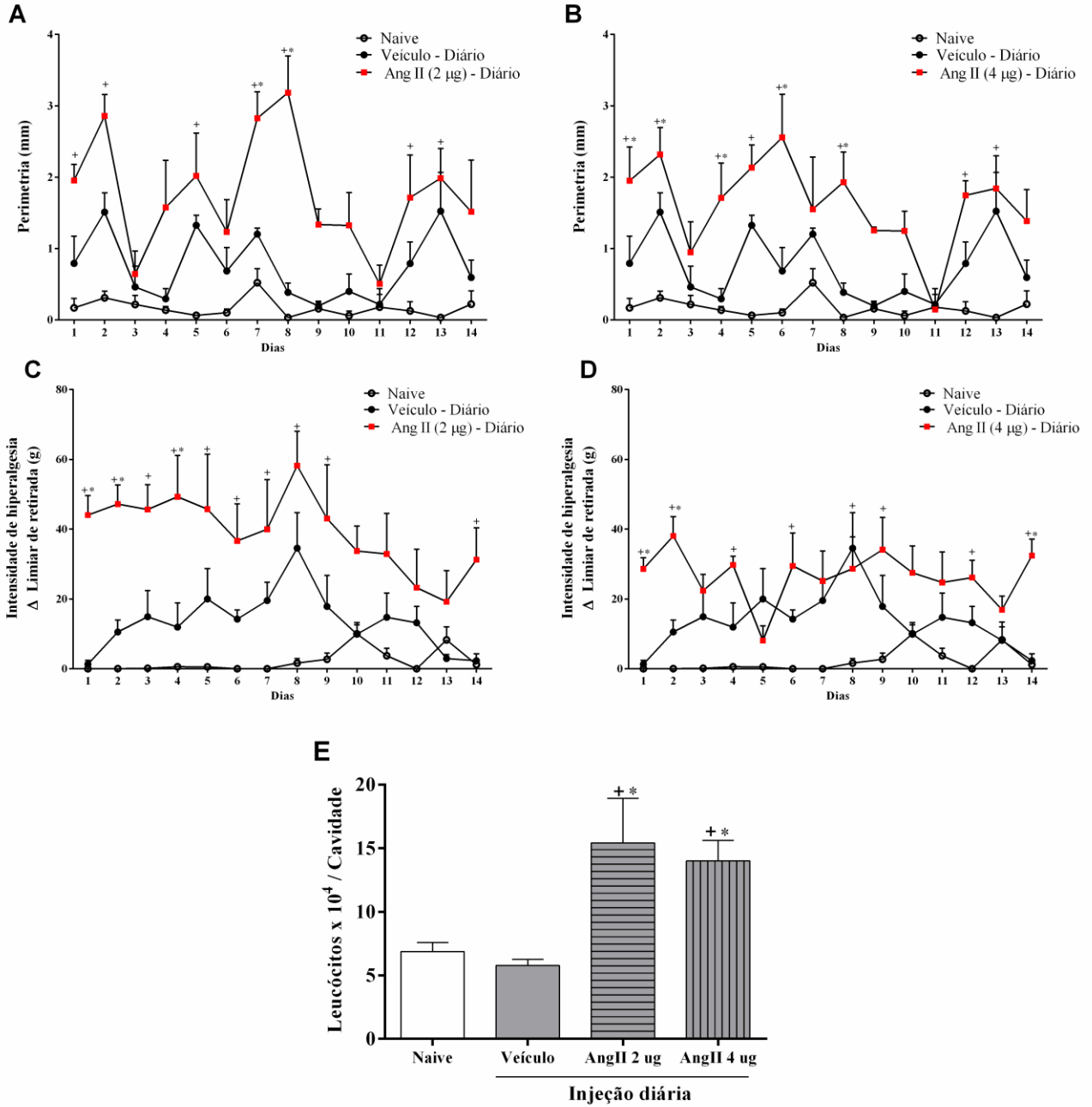
23D). Contudo, as diferenças foram, principalmente, na comparação com o naive, pois a injeção diária com veículo a partir da terceira aplicação também estimulou o edema e a hiperalgesia. Apesar do viés gerado pela penetração na agulha na cavidade articular diariamente nas medidas de edema e hiperalgesia, o recrutamento de leucócitos para a cavidade articular não foi influenciado (Figura 23E). A injeção diária em ambas doses da Ang II induziu a migração de leucócitos para a cavidade articular do joelho, de forma similar. Considerando a mesma dose, 2 µg, para comparar a migração de leucócitos entre os protocolos, tem-se Ang II 4-4 dias:  $10,88 \pm 2,02$  leucócitos  $\times 10^4$ /cavidade e Ang II diária:  $15,42 \pm 3,51$  leucócitos  $\times 10^4$ /cavidade, ( $p > 0,05$ ).

Na análise histológica, pelo *score* OARSI, não foram observadas alterações importantes nos animais do protocolo de injeção de 4-4 dias, Ang II 2 µg:  $2,08 \pm 0,48$  vs. veículo:  $2,63 \pm 0,45$  ou vs. naive:  $2,00 \pm 0,26$ . Já no protocolo de injeção diária na dose de 4 µg foi observado depleção catiônica, desorganização dos condrócitos na MEC e morte de condrócitos (Figura 24D), entretanto não houve diferença em relação ao naive ou ao veículo, por conta da grande variabilidade nas alterações observadas (Figura 24E). As diferenças entre os protocolos 4-4 dias ou de injeção diária foram sutis, porém os efeitos da Ang II foram observados com maior evidência no protocolo de injeção diária, na dose de 4 µg. Assim, apesar da administração local de Ang II produzir alterações mais leves do que a injeção do MIA, ela foi capaz de reproduzir efeitos principalmente inflamatórios que ocorrem pós injeção do MIA, reforçando a relação da Ang II com a OA.

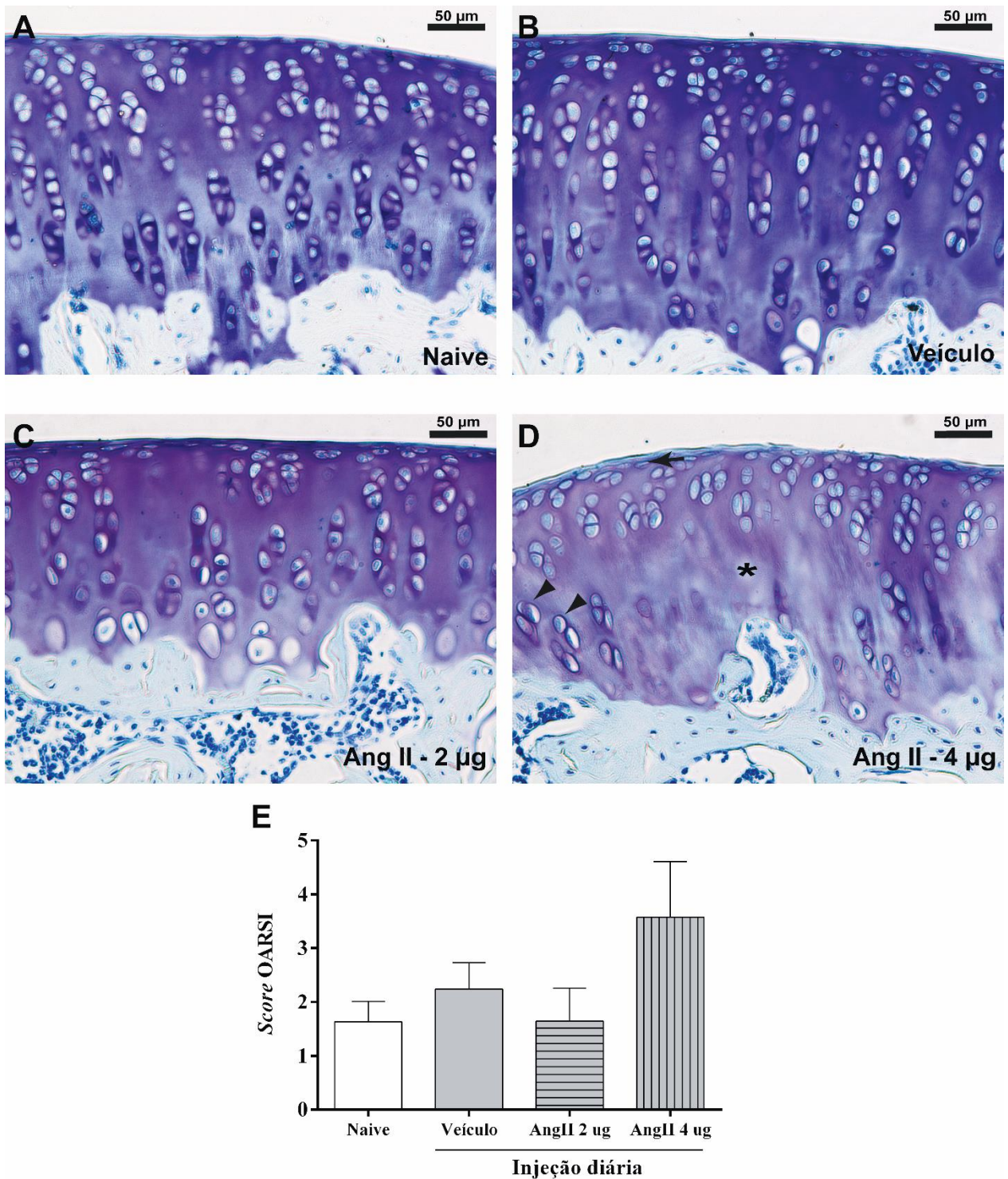
Não foi observado efeito sistêmico da injeção intra-articular de Ang II no joelho, visto que não foi verificadas alterações histológicas nos rins dos animais injetados.



**Figura 22:** Efeitos da injeção de Ang II (2 µg) de 4-4 dias no edema articular (A); hiperalgesia (B); e no recrutamento de leucócitos para a cavidade articular (C). Os dados estão apresentados como média ± E.P.M.; n=5 por grupo. \*p<0.05 vs. Veículo. (A e B) Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni e (C) One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.



**Figura 23:** Efeitos da injeção de Ang II (2 µg ou 4 µg) diária no edema articular (A e B); hiperalgesia (C e D); e no recrutamento de leucócitos para a cavidade articular (E). Os dados estão apresentados como média ± E.P.M.; n=5 por grupo. +p<0.05 vs. Naive; \*p<0.05 vs. veículo. (A, B, C e D) Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni e (E) One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.



**Figura 24:** Alterações histológicas induzidas pela injeção de Ang II (diária). (A) naive; (B) veículo; (C) Ang II 2 µg; (D) Ang II 4 µg; (E) *score* OARSI. Asterisco: depleção catiônica; Cabeças de seta: desorganização dos condrócitos na MEC; Seta preta: morte de condrócitos. Os dados estão apresentados como média ± E.P.M.; n=5 por grupo, One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

## 5.10 Efeitos do captopril e da Ang II em cultura primária de condrócitos

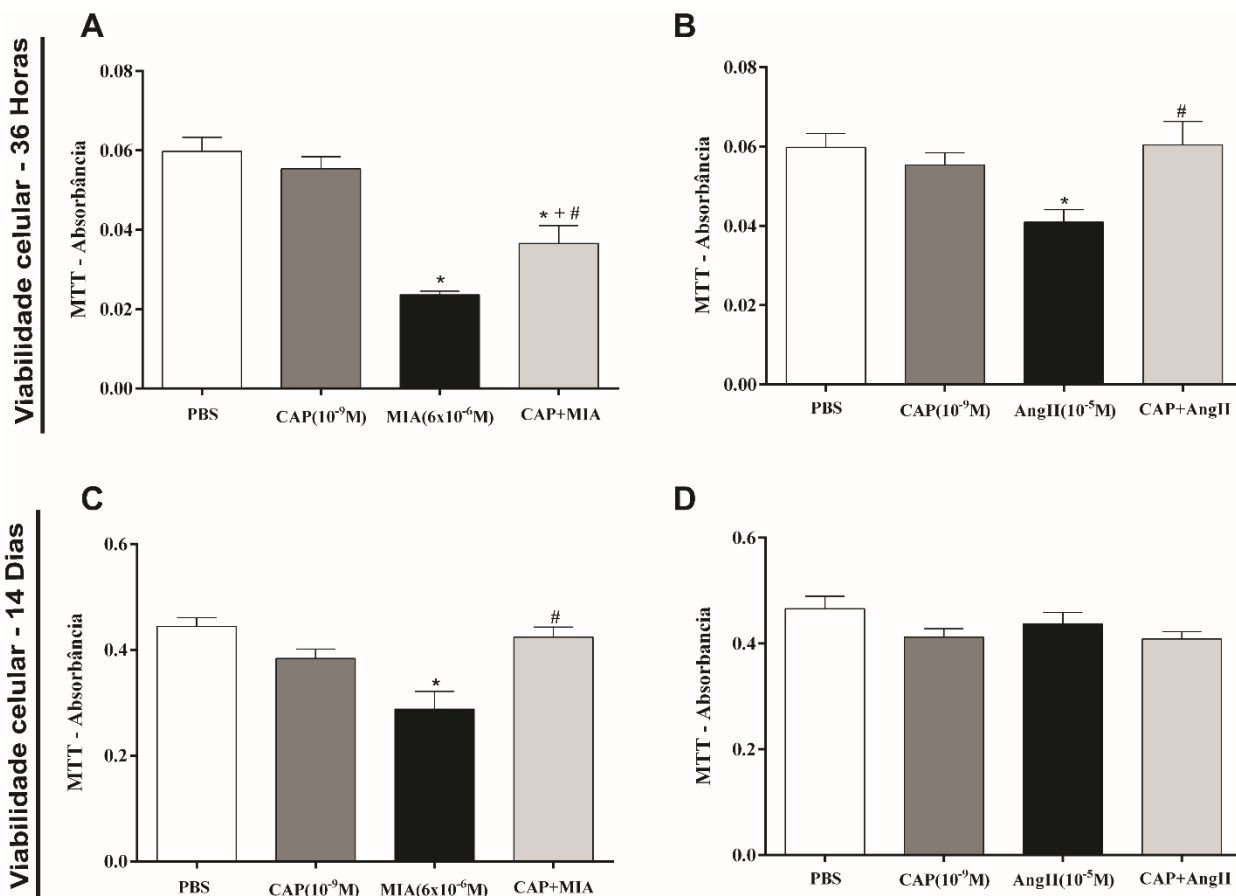
A fim de confirmar se o efeito condroprotetor do captopril é relacionado à inibição da ECA e consequente redução de Ang II foi realizada cultura primária de condrócitos. A exposição dos condrócitos ao MIA ( $6 \times 10^{-6}$  M) ou à Ang II ( $10^{-5}$  M) após 36 horas levou à redução da viabilidade celular, indicando que ambas drogas são capazes de alterar a proliferação dos condrócitos. O tratamento com captopril ( $10^{-9}$  M) aumentou, de forma significativa, a viabilidade dos condrócitos tanto em relação ao MIA quanto a Ang II (Figuras 25A e 25B). Após 14 dias dos estímulos, houve maior proliferação dos condrócitos com tendência a normalizar a viabilidade celular dos grupos. Entretanto, o grupo MIA ainda apresentou uma redução da viabilidade e reversão com o tratamento com o captopril (Figura 25C). Nos grupos da Ang II não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular ( $p > 0,05$ ) (Figura 25D).

A porcentagem de área marcada para proteoglicanos foi reduzida após 14 dias do estímulo com MIA ou com Ang II e restaurada com o tratamento com captopril (Figuras 26A e 26B). Assim, apesar de não haver diferenças na viabilidade celular após 14 dias de estímulo com Ang II, foi observado redução na porcentagem de área marcada para proteoglicanos (Figura 26B). Em conjunto, esses resultados reforçam a hipótese de que os efeitos do captopril serem relacionados à inibição da ECA e a redução na produção de Ang II.

Os experimentos *in vitro* também foram conduzidos para verificar se os efeitos do captopril foram causados pela sua ação direta na inibição da ECA ou devido a influência do grupo tiol presente na sua fórmula. Para tal outro inibidor de ECA, enalapril, sem o grupo tiol em sua fórmula foi testado. O ensaio de viabilidade conduzido com o enalapril mostrou que, assim como o captopril, a redução de viabilidade causada pelo estímulo com MIA ou com Ang II após 36 horas é revertida, MIA:  $0,0236 \pm 0,0001$  unidade relativa vs. MIA+enalapril:  $0,0393 \pm 0,004$  unidade relativa, ( $p < 0,05$ ); Ang II:  $0,041 \pm 0,003$  unidade relativa vs. Ang II+enalapril:  $0,070 \pm 0,006$  unidade relativa, ( $p < 0,05$ ).

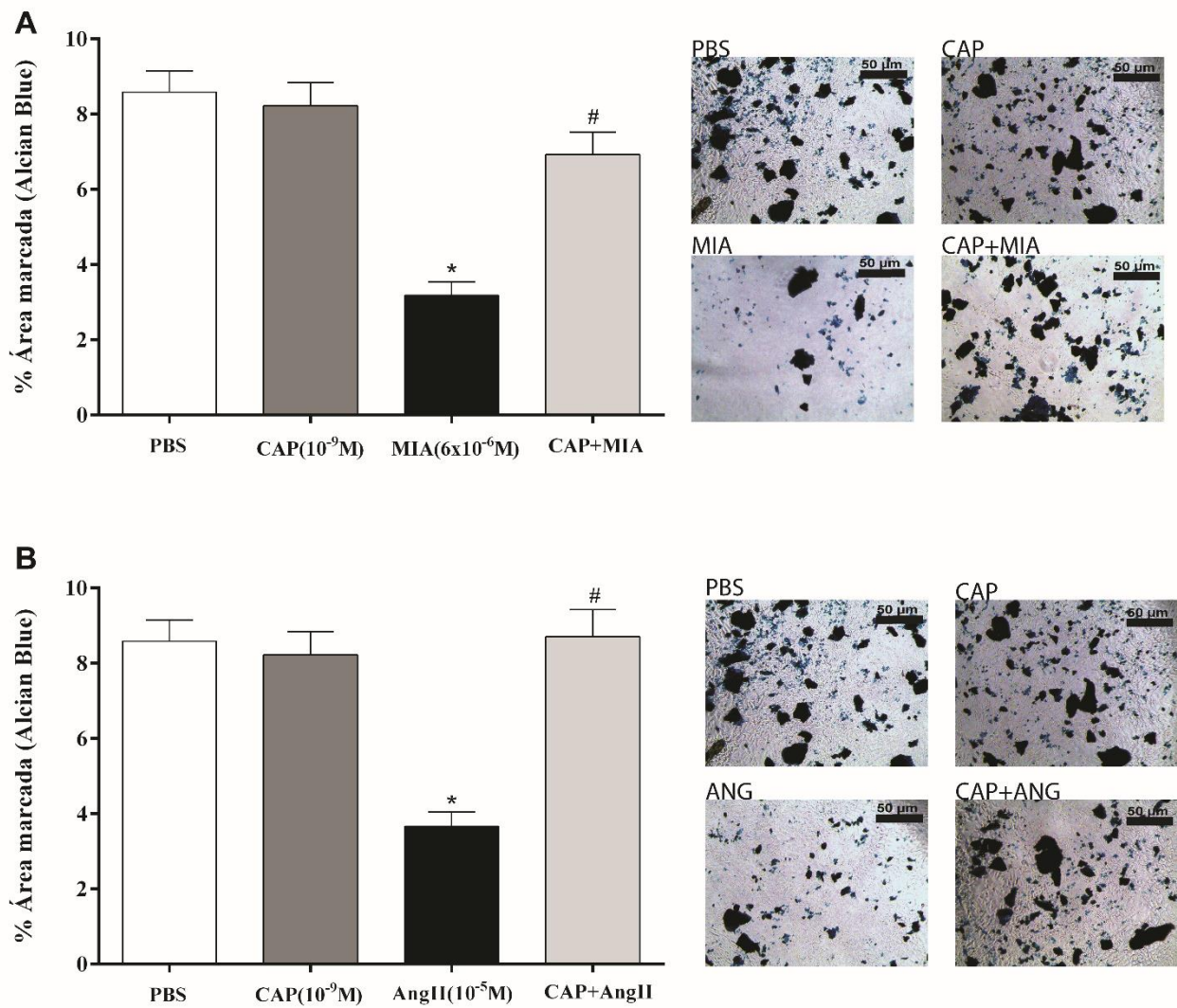
Os níveis de expressão de mRNA para componentes do SRA (ECA, ECA2, MasR, AT1R e AT2R), além de Agrecan, Col2a1, Mmp13 e TGF- $\beta$  foram investigados para relacionar sua modulação com os efeitos condroprotetores do captopril. Quando associado o MIA com o captopril houve maior expressão da ECA nos condrócitos (Figuras 27A). O captopril normalizou a expressão do AT2R reduzida pelo MIA (Figura 27C). Em contrapartida, o tratamento com captopril levou a

regulação negativa do MasR (Figura 27D). O efeito condroprotetor do captopril observado *in vitro* parece estar relacionado com a maior expressão do TGF- $\beta$  (Figura 28A) e colágeno tipo II (Figura 28C). A MMP-13 degrada principalmente o colágeno tipo II e o captopril sozinho levou a redução da expressão da MMP-13 vs. PBS ou MIA (Figura 28D), porém o tratamento com captopril não alterou o perfil de expressão em relação ao MIA. Não foram observadas diferenças significativas na expressão do AT1R (Figura 27B) e do Agrecan (Figura 28B). Na presença do estímulo da Ang II, a inibição da ECA levou a maior produção de mRNA da ECA, Ang II+captopril:  $5,12 \pm 0,53$  UA vs. PBS:  $1,0 \pm 0,0$  UA ou vs. captopril:  $0,79 \pm 0,23$  UA ou vs. Ang II:  $0,73 \pm 0,21$  UA, ( $p < 0,05$ ). O mesmo ocorreu para o TFG- $\beta$ , Ang II+captopril:  $4,40 \pm 1,12$  UA vs. PBS:  $1,0 \pm 0,0$  UA ou vs. captopril:  $0,83 \pm 0,23$  UA ou vs. Ang II:  $0,61 \pm 0,20$  UA, ( $p < 0,05$ ). Os demais genes não apresentaram diferença significativa de expressão para o estímulo da Ang II ( $p > 0,05$ ).



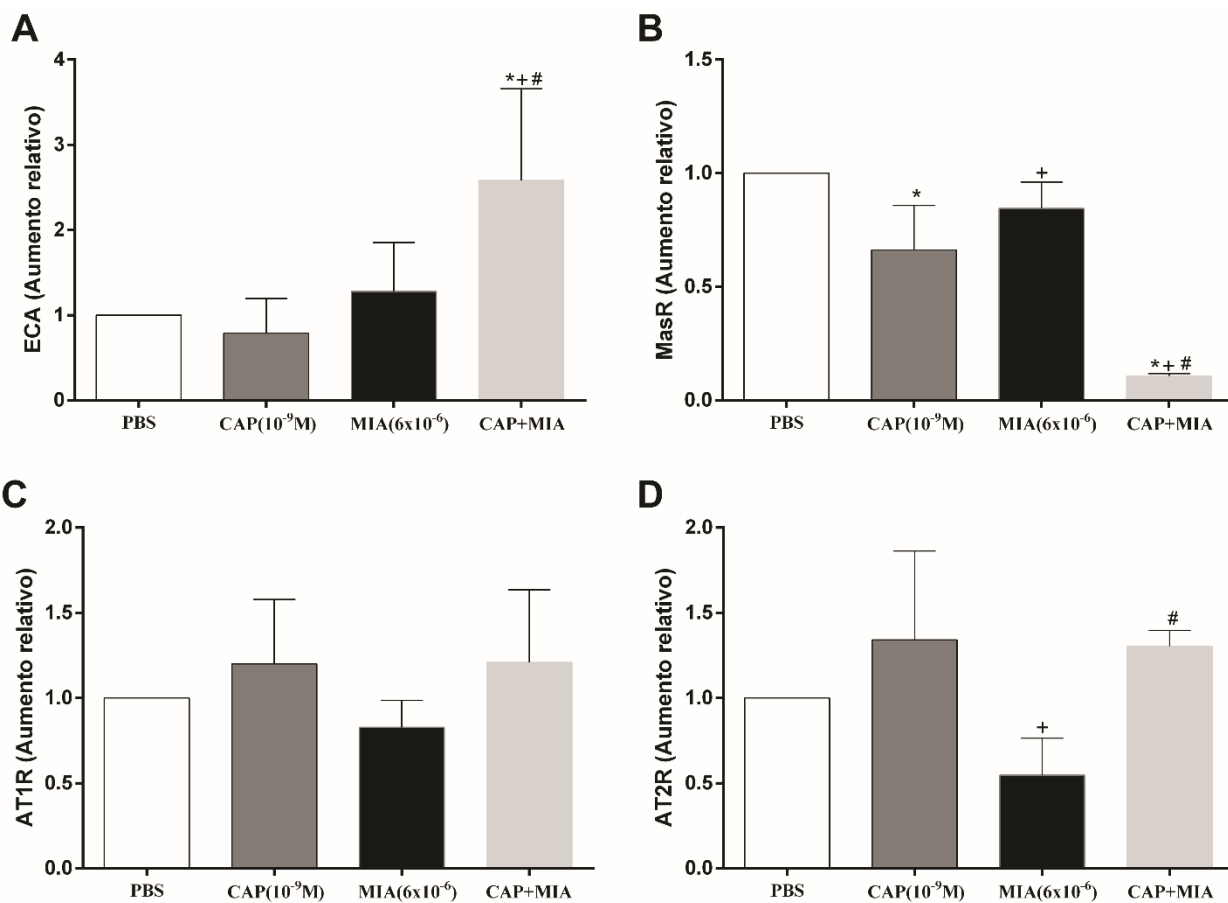
**Figura 25:** Ensaio de MTT em cultura de condrocitos. (A) Viabilidade celular após 36 horas – estímulo MIA; (B) Viabilidade celular após 36 horas – estímulo Ang II; (C) Viabilidade celular após 14 dias – estímulo MIA; (D) Viabilidade celular após 14 dias – estímulo Ang II. Os dados estão apresentados como média ± E.P.M., \*p<0.05 vs. PBS; +p<0.05 vs. CAP; #p<0.05 vs. MIA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.



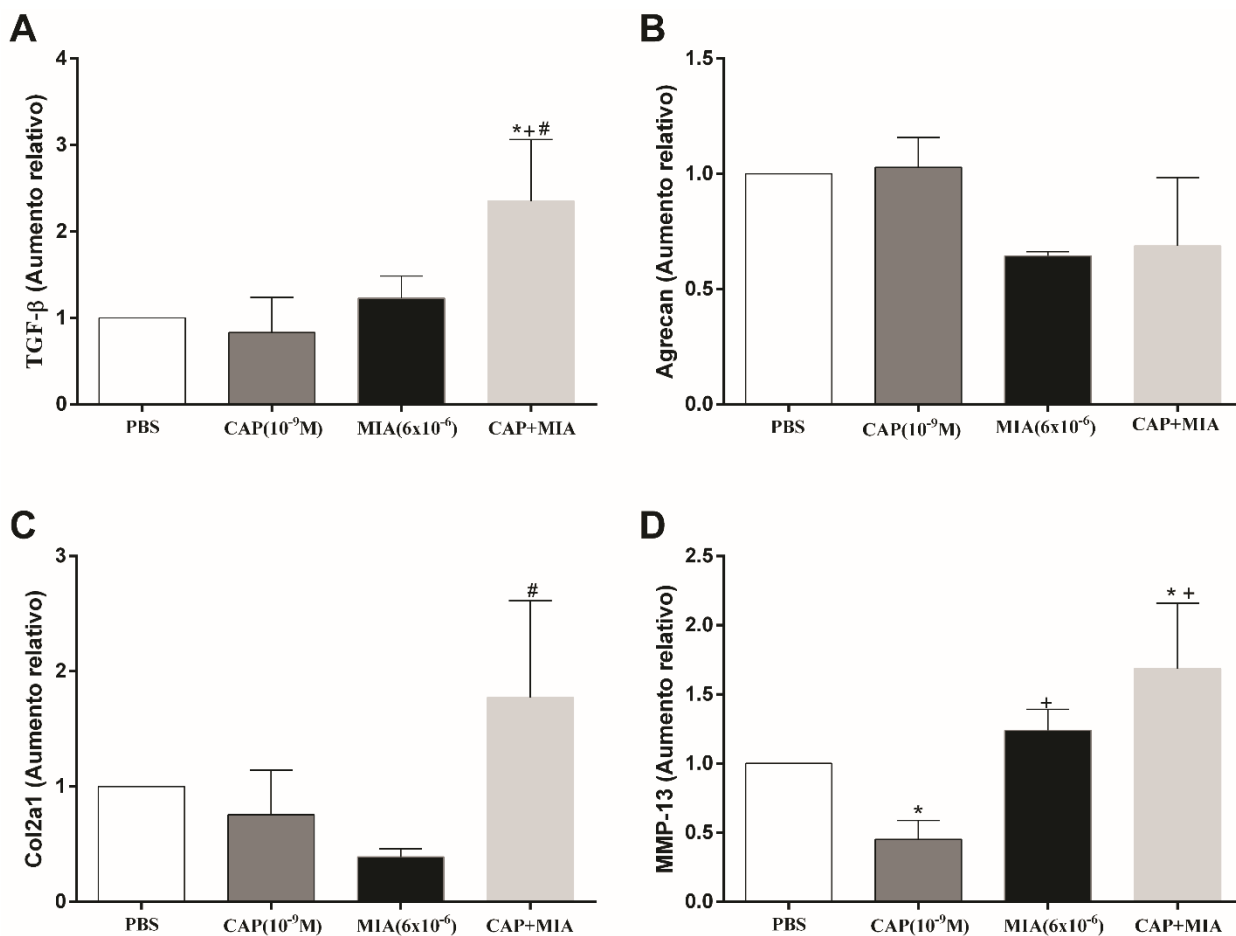


**Figura 26:** Análise do conteúdo de proteoglicanos em cultura de condrócitos por *Alcian Blue*. (A) Porcentagem de área marcada para *Alcian Blue* após 14 dias – estímulo MIA; (B) Porcentagem de área marcada para *Alcian Blue* após 14 dias – estímulo Ang II. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M., \* $p < 0.05$  vs. PBS; # $p < 0.05$  vs. MIA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.





**Figura 27:** Ensaio de PCR em tempo real após 36 horas – componentes do SRA. (A) Expressão ECA (B) Expressão AT1R; (C) Expressão AT2R; (D) Expressão MasR. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M., \* $p < 0.05$  vs. PBS; + $p < 0.05$  vs. CAP; # $p < 0.05$  vs. MIA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.



**Figura 28:** Ensaio de PCR em tempo real após 36 horas – elementos da MEC. (A) Expressão TGF-β; (B) Expressão Agrecan; (C) Expressão Col2a1; (D) Expressão MMP-13. Os dados estão apresentados como média ± E.P.M., \*p<0.05 vs. PBS; +p<0.05 vs. CAP; #p<0.05 vs. MIA. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls.

## 6 DISCUSSÃO

O SRA é um sistema complexo e versátil e diversos inibidores ou estimuladores desse sistema tem sido intensamente estudado. A inibição da ECA, por exemplo, tem sido testada como estratégia terapêutica em vários contextos biológicos, além do sistema cardiovascular (Cruz et al, 2000; Agha e Mansour, 2000; Uesugi et al, 2004; KMA et al, 2012). A identificação do SRA em vários órgãos e tecidos é um dos principais embasamentos para pesquisas de sua modulação farmacológica, além da regulação pressórica (Cat e Touyz, 2011; Abadir et al, 2012). Vários componentes do SRA foram identificados na cartilagem hialina do joelho, dentre eles podem ser citados a ECA, Ang II, AT1R e AT2R (Tang et al, 2015), além do AT1 na sinóvia (Pattacine et al, 2007). Tsukamoto et al (2014) observaram componentes do SRA na cartilagem hialina apenas na condição de hipertrofia da cartilagem. Corroborando com estes dados, observamos a expressão da ECA mais intensamente na cartilagem de ratos injetados com MIA, mas também na sinóvia, osso subcondral e tecido de reparação, assim como nos tecidos articulares de ratos controle. Na AR já foi estabelecida a relação da ECA com a destruição articular (Martin et al, 1984, Çobankara et al, 2005; Flammer et al, 2008; Chang e Wei, 2014). Contudo, na OA o papel do SRA precisa ser melhor compreendido. Há evidências de um SRA local no joelho e que a sua modulação pelo captopril pode proteger a cartilagem articular das lesões induzidas experimentalmente (Tsukamoto et al, 2014; Tang et al, 2015; Yamagishi et al, 2018). Porém, mais estudos são necessários para investigar o potencial terapêutico do captopril como uma DMOAD e o papel da Ang II na fisiopatologia da OA. Também é necessário realizar uma avaliação mais ampla, que envolva não apenas a cartilagem, mas também a sinóvia e o osso subcondral, pois todos estão intimamente envolvidos nas alterações osteoartríticas. Assim, no presente estudo, investigamos a modulação da Ang II via inibição da ECA com captopril nos tecidos articulares de ratos com OA.

A injeção diária de captopril no joelho de ratos não resultou em efeitos consistentes. Entretanto, já foi reportado que uma preparação de gel contendo captopril a 5% quando colocada no joelho após cirurgia de meniscectomia parcial levou a minimização das alterações osteoartríticas (Weinstein et al, 2014). Talvez a metodologia por nós adotada, injeção diária por 14 dias, possa ter contribuído para esse resultado divergente. O tratamento preventivo ou terapêutico oral com captopril (30 mg/kg) também não causaram efeitos. Entretanto, quando foi testada a dose de 80 mg/kg de captopril foi observado menor perda de cartilagem e redução do *score* OARSI, levando

à definição desse protocolo terapêutico para os experimentos seguintes. O captopril e outros inibidores de ECA possuem um efeito dose-dependente, provável justificativa para nossos achados (Agha e Mansour, 2000; Herman-Edelstein et al, 2016). Outros fatores também podem ter interferido, como, por exemplo, o modelo de OA experimental usado. Apesar do modelo de MIA não ter grandes diferenças histopatológicas quando comparado ao modelo lesão mecânica cirúrgica (Naveen et al, 2013), o MIA produz alterações hipernociceptivas mais intensas (Fernihough et al, 2004) e o de lesão mecânica cirúrgica exibe inflamação mais intensa (Mapp et al, 2013), não sendo, assim, similares em todos os aspectos.

A injeção intra-articular do MIA leva a alteração do metabolismo energético dos condrócitos, por inibir enzimas glicolíticas e oxidativas, após algumas semanas a morte dos condrócitos é observada (Dunhan et al, 1993; Guingamp et al, 1997; Guzman et al, 2003). A condroproteção observada com a dose de 80 mg/kg do captopril foi devido, principalmente, a redução da morte celular dos condrócitos. Porisso, é questionável se a inibição da ECA possui efeitos sobre o metabolismo energético dos condrócitos. Entretanto, Tang et al (2015) usaram um modelo de indução mecânica da OA (transecção do ligamento cruzado anterior com ressecção do menisco medial) e também observaram condroproteção com o tratamento com captopril. Isso, reforça a hipótese de que os efeitos do captopril sobre a cartilagem articular são relacionados à menor produção de Ang II.

A observação morfológica realizada mostrou indícios de apoptose nos condrócitos dos animais injetados com MIA. Fatores como, estresse oxidativo, ON, citocinas pró-inflamatórias e estresse mecânico podem desencadear a apoptose nos condrócitos (Hwang e Kim, 2015). A ativação da apoptose pode ser iniciada por duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (Grivicich et al, 2007). O MIA induz a apoptose em condrócitos de rato através da via mitocrodrial, envolvendo a produção de espécies reativas de oxigênio e ativação de caspase 3 (Jiang et al, 2013). Condrócitos humanos primários estimulados com MIA também apresentam aumento de apoptose, com ativação da caspase 3, assim como em camundongos injetados com MIA (Chang et al, 2018). Nossos dados indicam que a prevenção da morte celular pelo captopril é associada a menor produção de Ang II. Os condrócitos são responsáveis por manter a estabilidade da MEC, por isso a preservação dos condrócitos é associada a menor perda de cartilagem observada (Garnero et al, 2002; Horton et al, 2006; Ströbel et al, 2010). Neste contexto, a inibição da ECA nos condrócitos pode ter influenciado na

recuperação do balanço normal entre as vias anabólicas e catabólicas da cartilagem. Os mecanismos pelos quais a redução dos níveis de Ang II influenciou na progressão das lesões osteoartríticas foram relacionados com a modulação da produção de TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF. Observamos em nosso estudo aumento do TGF- $\beta$  após tratamento com captopril no contexto do MIA no lavado articular e no PCR a partir da cultura de cartilagem. Sabe-se que o TGF- $\beta$  é o principal fator de crescimento relacionado à produção da MEC nas fases iniciais da OA, por influenciar a síntese de proteoglicanos e de colágeno tipo II, além de regular negativamente enzimas de degradação da cartilagem (Blaney Davidson et al, 2006; Baugé et al 2014). O papel da citocina IL-6 no metabolismo da cartilagem é muito debatido, porque ela pode estimular tanto vias catabólicas quanto anabólicas (Tsuchida et al, 2012). Assim, sabe-se que a IL-6 pode estimular a expressão do TGF- $\beta$  (Villiger et al, 1993). Tsuchida et al (2012) demonstraram que a IL-6 estimula a produção de MEC em um modelo de regeneração *in vitro*. Os nossos dados estão de acordo com essa evidência, pois observamos níveis de IL-6 em tecidos articulares aumentados no grupo MIA tratado com captopril. Também é importante destacar o papel da IL-10, reconhecida como uma citocina anti-inflamatória que pode influenciar na progressão da OA, por desempenhar um papel protetor na cartilagem, estimulando a proliferação de condrócitos (Wojdasiewicz et al, 2014; Rojas-Ortega et al, 2015; Waly et al, 2017). A administração de IL-10 foi capaz de reduzir a morte celular em condrócitos relacionada à lesão mecânica única em experimento de cultura celular (Behrendt et al, 2016). Apesar de tais evidências nós observamos um efeito sutil do tratamento com captopril sobre a produção de IL-10, pois o líquido sinovial dos animais tratados apresentou mais IL-10 do que dos animais não tratados, houve aumento relativo da expressão de IL-10 nos tecidos de reparação, maior área de cartilagem expressando IL-10, mas sem diferença na porcentagem de área. O desequilíbrio entre os mediadores pró- e anti-inflamatórios pode causar a degeneração da cartilagem e mudanças articulares associadas (Berenbaum, 2013; Katz et al, 2010; Ruiz-Romero et al, 2008). Neste contexto, assim como a redução de IL-10 é crítica para a cartilagem, o aumento do TNF também, pois é uma das principais citocinas responsável por estimular o catabolismo e a degeneração da cartilagem (Haseeb e Haqqi, 2013; Wojdasiewicz et al, 2014). Além disso, o TNF e a Ang II possuem sinergismo na sinalização fibroinflamatória da Ang II (Mayr et al, 2016). Observamos aumento significativo de TNF no lavado articular dos ratos injetados com MIA, não observado nos animais MIA tratados com captopril. Apesar disso, a análise de expressão do TNF nos tecidos articulares, quando normalizada pela porcentagem, não apresentou diferenças

significativas entre os grupos MIA. Os níveis elevados de VEGF contribuem para a patogênese da OA (Yuan et al, 2014) e eles apresentam-se mais alterados na OA primária (Savitskaya et al, 2012), talvez por isso não tenha sido detectada diferença significativa na sua expressão na cartilagem em nosso estudo.

A perda de agregcan é característica dos estágios iniciais da degeneração da cartilagem, pois um afrouxamento da rede de colágeno leva à perda de proteoglicanos que por sua vez leva a uma sobrecarga mecânica (Aigner et al, 2006). Os condrócitos dependem da estabilidade da MEC para exercer suas funções celulares. Assim, a perda de proteoglicanos e de colágeno compromete a estabilidade e a função da cartilagem (Knudson e Knudson, 2001). Os condrócitos estimulados com MIA e tratados com captopril tiveram maior expressão do mRNA do Col2a1. Além disso, o tratamento com captopril *in vivo* e *in vitro* foi capaz de aumentar a produção de proteoglicanos reduzida pelo MIA. Assim, a preservação dos condrócitos pode ter contribuído para este resultado, bem como a preservação da MEC pode ter influenciado na menor morte de condrócitos observada. A inflamação articular presente na OA repercute na atividade das MMPs, que aumentadas contribuem para o desequilíbrio da renovação da MEC (Katz et al, 2010; Hasseb, Haqqi, 2013). Porém, o captopril não alterou a expressão da MMP-13 na cultura de condrócitos.

Havia a possibilidade de os efeitos do captopril serem relacionados a seu grupo tiol, pois foi atribuído a esta estrutura da molécula efeitos anti-oxidantes e imunossupressores (Martin et al, 1984; Sládková et al, 2007). Entretanto, observamos com o uso do enalapril, iECA que não possui o grupo tiol, efeitos similares ao do captopril na cultura de condrócitos estimulados com MIA ou Ang II, indicando que as ações do captopril observadas são relacionadas a inibição da ECA. Os nossos achados estão de acordo com o trabalho de Dalbeth et al (2004), que demonstrou em um modelo de artrite que a supressão da inflamação pela inibição da ECA não depende do grupo tiol, ao utilizar o quinapril. Contudo, a não influência do grupo tiol nos efeitos do captopril na OA não exclui a possibilidade de modulação das espécies reativas de oxigênio nos efeitos observados. Pois, Mikrut et al (2016) demonstraram que os efeitos anti-oxidantes do captopril não dependiam da estrutura da molécula do fármaco (Rodrigues de Araujo, 2011) e sabe-se da contribuição do estresse oxidativo para a destruição da cartilagem (Drevet et al, 2018). Além disso, Agha e Mansour (2000) observaram redução do estresse oxidativo e da inflamação com o tratamento com captopril em um modelo de artrite. Assim, a avaliação do estresse oxidativo poderia trazer informações complementares sobre a inibição da ECA na OA induzida por MIA.

Sobre os possíveis efeitos do captopril sobre a atividade ou a eficiência do sistema imunológico (imunossupressão) nós observamos a redução de alguns parâmetros inflamatórios, mas não relacionados ao grupo tiol. A inflamação é um fator importante associado ao risco de progressão da perda de cartilagem e aos sinais e sintomas da OA, incluindo dor nas articulações, edema e rigidez, indicadores de sinovite (Goldring e Otero, 2011). A Ang II é um mediador envolvido na expansão dos sinoviócitos tipo fibroblasto por reduzir a capacidade das células de sofrer apoptose através da via AT1-NF- $\kappa$ B (Pattacine et al, 2007). O tratamento com captopril em ratos espontaneamente hipertensos reduziu a produção de mediadores inflamatórios por inativar o fator NF- $\kappa$ B (Miguel-Carrasco et al, 2010). Além disso, o agonismo de AT2R diminui eficientemente a produção de mediadores inflamatórios, a proliferação e migração de sinoviócitos tipo fibroblastos (Terenzi et al, 2017). Apesar destas evidências os efeitos do captopril sobre as alterações da sinóvia induzida pelo MIA foi parcial, não houve efeito do tratamento quanto a densidade de células da sinóvia. Entretanto, o captopril foi capaz de reduzir a migração de leucócitos a partir da sinóvia para a cavidade articular. O infiltrado das células mononucleares para a articulação contribui para a patogênese da OA ao produzir citocinas inflamatórias, como IL-1 e TNF, prostaglandinas, além de estimular a expressão de MMP-3, 9 e 13, agravando a degradação da cartilagem (Houard et al, 2013). Dessa forma, a menor migração de leucócitos para a cavidade pode ter contribuído para a preservação da cartilagem observada com o tratamento. O mecanismo pelo qual ocorreu tal redução pode ser relacionado a inibição da ECA nos mononucleares, pois também expressam componentes do SRA (Okamura et al, 1999). Assim como a inflamação pode ter influenciado na preservação da cartilagem, a menor destruição da cartilagem também pode ter influenciado no recrutamento de leucócitos, pois havendo menor produção de catabólitos o ciclo de retroalimentação de inflamação-degeneração é afetado (Berenbaum, 2013).

A respeito da hiperalgesia, era possível que estivesse aumentada com a inibição da ECA, tendo em vista que um dos efeitos do captopril é aumentar os níveis de bradicinina, um dos mediadores álgicos da OA (Meini e Maggi, 2008; Norris et al, 2010). Entretanto, não observamos a exacerbação do quadro álgico dos animais MIA tratados com captopril, ao invés disso, ao final do tratamento houve uma tendência de redução da hiperalgesia nos animais tratados. A bradicinina também tem a importante ação vasodilatadora, por estimular a produção de ON e protaciclina, repercutindo na melhora do aporte sanguíneo aos tecidos (Mikrut et al, 2016). O ON na OA não é completamente compreendido, mas ele é comumente apotado como um mediador que favorece o

catabolismo, por inibir a síntese de matriz e estimular a inflamação (Studer et al, 1999; Abramson, 2008). Apesar disso, há evidência que o uso de um doador de ON (S-nitrosocisteína éster etílico) em condrócitos bovinos protege a cartilagem (Clancy et al, 2004). O uso de bloqueadores dos receptores da bradicinina é pertinente para verificar se há alguma participação da bradicinina nos efeitos do captopril observados.

A lesão na medula óssea é um preditor da progressão de defeitos e da perda de volume da cartilagem (Dore *et al*, 2010). Além disso, a lesão da medula óssea e as alterações no osso subcondral são associadas aos sintomas de dor na OA (Muratovic et al, 2016). O aumento de carga no osso pela degeneração da cartilagem pode contribuir para as alterações do osso subcondral (Guzman et al, 2003). As lesões na medula óssea e na cartilagem estão interligadas e ambos devem ser considerados alvos de intervenção (Dore et al, 2010). O menor nível de lesão e a preservação estrutural da cartilagem observados em nosso estudo podem ter contribuído para reduzir o impacto no osso subcondral. O modelo de MIA, como mostrado por Guzman et al (2003), reproduz as alterações no osso subcondral relacionadas a OA. Igualmente, observamos o colapso e fragmentação do osso trabecular subcondral e sua substituição por tecido fibroso, formação cística e osteoclastos. Yan e Shen (2017) observaram que a OA ativa o SRA local do osso, inibe a formação e estimula a reabsorção óssea. Oportunamente, observamos que a inibição da ECA com o captopril atenua as alterações ósseas induzidas pelo MIA por modular a osteoclastogênese. Além disso, houve maior expressão de IL-10 no grupo MIA tratado com captopril. O papel da IL-10 parece ser além da modulação da inflamação, pois Kwon et al (2015) mostraram que a IL-10 desempenha um papel protetor contra o remodelamento cardíaco induzido pela Ang II. O TGF- $\beta$  também possui um reconhecido papel na formação de fibrose no osso (Zhen et al, 2013; Muratovic et al, 2016). Vários trabalhos evidenciam o efeito anti-fibrótico do captopril no pulmão, pâncreas, rins e coração (Cohen et al, 1996; Milanez et al, 1997; Uesugi et al, 2004; Cruz et al, 2000). Há evidência que o captopril reduz os níveis de TGF- $\beta$  no osso no modelo experimental ao diabetes tipo 1 (Diao et al, 2014). A dosagem do TGF- $\beta$  a partir dos tecidos articulares, apresentou tendência de redução no grupo MIA tratado com captopril, porém sem diferença estatística. A variabilidade encontrada nos valores de absorbância do TGF- $\beta$  pode ter sido devido ao fato de termos realizado um mix de tecidos articulares (sinóvia, gordura infra-patelar, fragmento de cartilagem do fêmur e osso subcondral), pois os vários tecidos usados podem ter padrão de expressão diferente para o TGF- $\beta$ . Os nossos resultados indicam que o captopril, no contexto da OA, pode ser um agente



promissor na prevenção da lesão da medula óssea e nas mudanças do tecido ósseo trabecular com redução significativa da área de fibrose, por modular a osteoclastogênese. Contudo, os mecanismos pelos quais ocorre essa modulação ainda precisam ser melhor elucidados.

O mecanismo pelo qual a inibição da ECA atenuou as lesões osteoartríticas parece ser relacionado à menor produção de Ang II e a ativação do eixo ECA/Ang II/AT2. A injeção da Ang II reproduziu, principalmente, os efeitos inflamatórios gerados MIA no joelho. Assim como o MIA, a Ang II foi capaz de reduzir a viabilidade celular dos condrócitos e o captopril reverteu tal efeito. A associação do captopril aos estímulos MIA ou Ang II resultou no aumento da expressão da ECA. Quanto ao AT2R, o captopril normalizou a sua expressão reduzida pelo MIA. Além disso, o captopril gerou regulação negativa no MasR. Tang et al (2015) observaram que a expressão de componentes do SRA (renina, ECA, Ang II, AT1R) foi suprarregulada na tíbia proximal de ratos com OA, no entanto, a expressão de AT2R foi suprimida, e que o tratamento com captopril atenuou as lesões osteoartríticas pela inibição da ativação de SRA local e aumento da expressão do AT2R. De forma similar, a modulação do SRA local pelo aliskiren (inibidor da renina) na OA também gerou condroproteção, essa foi acompanhada da redução da expressão da renina, Ang II, ECA e AT1R e aumento do AT2R (Yan e Shen, 2017). As divergências dos nossos achados com esses trabalhos quanto a modulação do SRA local pode ser em decorrência do material biológico usado para análise da expressão gênica, pois nós realizamos as avaliações a partir da cultura de condrócitos enquanto que Tang et al (2015) e Yan e Shen (2017) fizeram o processamento da tíbia proximal. Contudo, cabe ressaltar que em todos os trabalhos a condroproteção foi acompanhada pelo aumento da expressão do AT2R. Isso reforça a hipótese de que a proteção induzida pela inibição da ECA na OA envolve esse receptor. Outra ponderação a respeito da expressão gênica realizada é que nós realizamos análise apenas do mRNA, não foi realizado ensaio Western Blot para quantificação das proteínas de interesse.

O presente estudo evidenciou o efeito terapêutico da modulação da ECA na OA experimental, assim como mostrado por Tang et al (2015). A modulação da renina também demonstrou ser uma boa estratégia para regular o SRA local no joelho com OA (Yan e Shen, 2017). Contudo, há um vasto campo a ser explorado quanto a modulação dos componentes do SRA na OA. O bloqueio do AT1R em modelos de artrite inflamatória gerou efeitos anti-inflamatórios (Price et al, 2007; Silveira et al, 2013). Além disso, a ativação do eixo ECA2/Ang(1-7)/Mas também mostrou ser uma estratégia valiosa para contralar os eventos inflamatórios em modelos de artrite

experimental em camundongos (Silveira et al, 2010). Neste contexto, tanto o bloqueio do AT1R quanto a estimulação do eixo ECA2/Ang(1-7) merecem ser investigadas na OA experimental, pois são promissoras estratégias para a regulação do SRA local na OA.

Apesar de não estar claro como a HAS está associada com a fisiopatologia da OA de joelho, várias evidências epidemiológicas mostram que existe uma estreita relação entre as duas doenças (Yoshimura et al, 2012; Zhang et al, 2017; Veronese et al, 2018). Camundongos hipertensos Tsukuba (THM) expostos a sobrecarga articular por corrida produziram lesões osteoartríticas mais graves do que camundongos normotensos (C57BL/6), essas lesões foram tempo dependentes. Os níveis de expressão de AT1R, colágeno X e MMP-13 nos condrócitos foram significativamente maiores no grupo de corrida THM do que nos grupos controles. O nível de fosforilação de JNK foi aumentado tanto pela carga de compressão cíclica quanto pela adição de Ang II em cultura de condrócitos. Estes efeitos foram revertidos com o pré-tratamento com bloqueador de AT1R, olmesartan. Os dados desse estudo indicam que o SRA local está envolvido na degeneração da cartilagem articular através do AT1R (Yamagishi et al, 2018). Oportunamente, seria interessante avaliar se um roedor naturalmente hipertenso, como ratos com hipertensão espontânea, tem agravamento das lesões osteoartríticas induzidas pelo MIA e se os efeitos observados em nosso estudo com a inibição da ECA pelo captopril são reproduzidos.

## 7 CONCLUSÃO

Os trabalhos sobre a modulação do SRA local no joelho com OA foram focados nas alterações histológicas da cartilagem (Tang et al, 2015; Yan e Shen, 2017). Observamos que a inibição da ECA com o captopril no MIA atenua as lesões da cartilagem, do osso subcondral e normaliza o recrutamento de leucócitos a partir da sinóvia. O menor nível de lesões nos tecidos articulares e a redução da inflamação podem ter influenciado mutuamente a resposta uns dos outros, gerando a proteção das alterações osteoatríticas observadas. Associado à condroproteção foi observada modulação da produção de TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF, esses mediadores estão envolvidos na patogênese da OA, por isso a inibição da ECA nos condrócitos pode ter influenciado na recuperação do balanço normal entre as vias anabólicas e catabólicas da cartilagem. Além dos efeitos da inibição da ECA sobre os tecidos articulares também observamos a reprodução de alguns dos efeitos induzidos pelo MIA com a injeção articular da Ang II. Além disso, foi visto resposta similar dos condrócitos *in vitro* após estímulos MIA ou Ang II. Em conjunto esses dados indicam que a Ang II participa da fisiopatologia da OA, como um dos agentes desencadeadores da doença. Considerando que a OA é uma doença que afeta toda a articulação os efeitos do captopril sobre os vários tecidos articulares envolvidos apontam a modulação do SRA local pela inibição da ECA como uma promissora estratégia terapêutica, tanto para os pacientes com HAS quanto para os normotensos. Contudo, o captopril ainda não pode ser classificado como uma DMOAD, visto que a melhora estrutural observada ainda precisa ser avaliada no contexto da clínica ortopédica. Este trabalho possibilitou compreender melhor o papel do SRA no joelho, quanto a sua modulação pela inibição da ECA nos tecidos articulares envolvidos. Mas, também levantou perguntas importantes que podem direcionar novos estudos sobre o assunto.

## 8 REFERÊNCIAS

Abadir PM, Walston JD, Carey RM. Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. *Peptides*. 2012; 38(2):437-45.

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.

Agha AM, Mansour M. Effects of Captopril on Interleukin-6, Leukotriene B4, and Oxidative Stress Markers in Serum and Inflammatory Exudate of Arthritic Rats: Evidence of Antiinflammatory Activity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000; 168(2):123-30.

Aguiar CG. Papel das enzimas-conversoras de angiotensina na osteoartrite de joelho em ratos. [Dissertação de mestrado] *Universidade Federal de Minas Gerais*, 2014.

Aigner T, Sachse A, Gebhard PM. Osteoarthritis: Pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006; 58:128-149.

Aini H, Itaka K, Fujisawa A, *et al*. Messenger RNA delivery of a cartilage-anabolic transcription factor as a disease-modifying strategy for osteoarthritis treatment. *Sci Rep*. 2016; 5-6:18743.

Aljadhey H, Tu W, Hansen RA, *et al*. Comparative effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on blood pressure in patients with hypertension. *Cardiovascular Disorders*. 2012; 12:93.

Altman R, Asch E, Bloch D, *et al*. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum*. 1986; 29(8):1039-49.

- Bar-Yehuda S, Rath-Wolfson L, Del Valle L, *et al.* Induction of an antiinflammatory effect and prevention of cartilage damage in rat knee osteoarthritis by CF101 treatment. *Arthritis & Rheumatism*. 2009; 60(10):3061-71.
- Barley DC, Adesida AB, Bagnall KM, *et al.* Immunohistochemical characterization of reparative tissue present in human osteoarthritic tissue. *Virchows Arch*. 2010; 456:561-569
- Baugé C, Girard N, Leclercq S, *et al.* Regulatory mechanism of transforming growth factor beta receptor type II degradation by interleukin-1 in primary chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1823(5):983-6.
- Behrendt P, Preusse-Prange A, Klüter T, *et al.* IL-10 reduces apoptosis and extracellular matrix degradation after injurious compression of mature articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016; pii:S1063-4584(16)30152-2.
- Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskel Neuron Interact*. 2001; 1(4):363-76.
- Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage*. 2013; 21(1):16-21.
- Bian B, Kelton CML, Guo JJ, *et al.* ACE Inhibitor and ARB utilization and expenditures in the medicaid Fee-For-Service program from 1991 to 2008. *Journal of Managed Care Pharmacy*. 2010; 16(9):671-9.
- Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011; 377(9783):2115-26.
- Bitton R. The Economic Burden of Osteoarthritis. *Am J Manag Care*. 2009; 15:S230-S235.

Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM, *et al.* Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65(11):1414-21.

Brasil. Ministério da Fazenda. Secretaria de Previdência. Acompanhamento Mensal dos Benefícios Auxílios-Doença Previdenciários Concedidos segundo os Códigos da CID-10 - Janeiro a Dezembro de 2017 [acesso em 03 abril 2018]. Disponível em:[http://www.previdencia.gov.br/wp-content/uploads/2018/03/Auxilio-Doen%C3%A7a-Previdenciario\\_2017\\_completo\\_CID.pdf](http://www.previdencia.gov.br/wp-content/uploads/2018/03/Auxilio-Doen%C3%A7a-Previdenciario_2017_completo_CID.pdf)

Cat AD, Touyz RM. A new look at the renin–angiotensin system-Focusing on the vascular system. *Peptides.* 2011; 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 KW, Wu RWK. Symptoms, Signs and Quality of Life (QoL) in Osteoarthritis (OA). *InTech.* 2012; 25-41.

Chang Y, Wei W. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2015; 179(2):137-45.

Chang YH, Wu KC, Liu WH, *et al.* Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells reduce monosodium iodoacetate-induced apoptosis in cartilage. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi.* 2018;30(2):71-80.

Clancy RM, Gomez PF, Abramson SB. Nitric oxide sustains nuclear factor kappaB activation in cytokine-stimulated chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2004; 12(7):552-8.

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

Çobankara V, Oztürk MA, Kiraz 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; 25(4):285-91.

Cohen EP, Molteni A, Hill P, *et al.* Captopril preserves function and ultrastructure in experimental radiation nephropathy. *Lab Invest.* 1996; 75(3):349-60.

Collins DH and Mcelligott TF. Sulphate ( $^{35}\text{SO}_4$ ) uptake by chondrocytes in relation to histological changes in osteoarthritic human articular cartilage. *Ann. rheum. Dis.* 1960; 19, 318.

Costa BR, Reichenbach S, Keller N, *et al.* Effectiveness of non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of pain in knee and hip osteoarthritis: a network meta-analysis. *Lancet.* 2017; 390: e21–33.

Cruz CI, Ruiz-Torres P, del Moral RG, *et al.* Age-related progressive renal fibrosis in rats and its prevention with ACE inhibitors and taurine. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 278(1):122-129.

Cushman DW, Cheung HS, Sabo E, *et al.* Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry.* 1977; 16:5484-91.

Dalbeth N, Edwards J, Fairchild S, *et al.* The non-thiol angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril suppresses inflammatory arthritis. *Rheumatology* 2005; 44:24-31.

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

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

Di Bella C, Fosang A, Donati DM. 3D Bioprinting of Cartilage for Orthopedic Surgeons: Reading between the Lines. *Front Surg*. 2015; 13;2:39.

Diao TY, Pan H, Gu SS, *et al*. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor, captopril, on bone of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes. *J Bone Miner Metab*. 2014; 32(3):261-70.

Dijkgraaf LC, Bont LM, Boering G, *et al*. The Structure, Biochemistry, and Metabolism of Osteoarthritic Cartilage: A Review of the Literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995; 53:1182-1192.

Dore D, Martens A, Quinn S, *et al*. Bone marrow lesions predict site-specific cartilage defect development and volume loss: a prospective study in older adults. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(6):R222.

Drevet S, Gavazzi G, Grange L. Reactive oxygen species and NADPH oxidase 4 involvement in osteoarthritis. *Exp Gerontol*. 2018 Jul 16;111:107-117

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; 74(3):283-289.

Dzau VJ. Tissue Angiotensin and Pathobiology of Vascular Disease: A Unifying Hypothesis. *Hypertension*. 2001; 37:1047-1052.

Espanha MM. Cartilagem articular: estrutura e composição histoquímica. *Acta Reumatol Port*. 2010; 35:424-433.

Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, *et al*. Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors. *Annals of Internal Medicine*. 2000; 133(8):637-639.



Ferreira AJ, Shenoy V, Qi Y, *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme 2 Activation Protects Against Hypertension-Induced Cardiac Fibrosis Involving Extracellular Signal-Regulated Kinases. *Exp Physiol.* 2011; 96(3):287-294.

Ferreira AJ, Murça TM, Fraga-Silva RA, *et al.* New Cardiovascular and Pulmonary Therapeutic Strategies Based on the Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin-(1–7)/Mas Receptor Axis. *Int J Hypertens.* 2012; 2012:147825.

Fernihough J, Gentry C, Malcangio M, *et al.* Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain.* 2004; 112(1-2):83-93.

Findlay DM. Vascular pathology and osteoarthritis. *Rheumatology.* 2007; 46:1763-1768.

Flammer AJ, Sudano IS, Hermann F, *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition Improves Vascular Function in Rheumatoid Arthritis. *Circulation.* 2008; 117:2262-2269.

Garcia P, Schwenzer S, Slotta JE, *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; 159:1672-1680.

Garnero P, Ayral X, Rousseau JC, *et al.* Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2002; 46(10):2613-24.

Gaspari TA, Vinh A, Jones ES, *et al.* Ganging up on angiotensin II type 1 receptors in vascular remodeling. *Hypertension.* 2012; 60(1):17-9.

Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, *et al.* The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2010; 18:S24eS34.

Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, *et al.* Osteoarthritis. *Lancet*. 2015; 386: 376–87

Grivicich I, Regner A, Rocha A. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007; 53(3): 335-343.

Guingamp C, Gegout-Pottie P, Philippe L, *et al.* Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 1997; 40(9):1670-1679.

Goldring M, Otero M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2011; 23(5): 471–478.

Guzman RE, Evans MG, Bove S, *et al.* Mono-iodoacetate-induced histologic changes in subchondral bone and articular cartilage of rat femorotibial joints: an animal model of osteoarthritis. *Toxicol. Pathol*. 2003; 31(6):619-24.

Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clinical Immunology*. 2013; 146:185-196.

Haviv B, Bronak S, Thein R. The complexity of pain around the knee in patients with osteoarthritis. *Isr Med Assoc J*. 2013; 15(4):178-81.

Helenius A, Kuhlbrandt W, Osterhelt D, *et al.* 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.

Herman-Edelstein M, Chagnac A, Nevo Z, *et al.* Angiotensin converting-enzyme inhibition restores glomerular glycosaminoglycans in rat puromycin nephrosis. *Exp Toxicol Pathol*. 2016; pii: S0940-2993(16)30104-X.

Horton WE Jr, Bennion P, Yang L. Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006; 6(4):379-81.

Houard X, Goldring MB, Berenbaum F. Homeostatic Mechanisms in Articular Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2013; 15(11): 375.

Hunter DJ, McDougall JJ, Keefe FJ. The symptoms of OA and the genesis of pain. *Rheum Dis Clin North Am.* 2008; 34(3):623–643.

Hunter DJ. Pharmacologic therapy for osteoarthritis-the era of disease modification. *Nat Rev Rheumatol.* 2011; 7(1):13-22.

Hwang HS, Kim HA. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(11): 26035–26054.

Jiang L, Li L, Geng C, *et al.* Monosodium Iodoacetate Induces Apoptosis via the Mitochondrial Pathway Involving ROS Production and Caspase Activation in Rat Chondrocytes In Vitro. *J Orthop Res.* 2013;31(3):364-9.

Jordan KM, Arden NK, Doherty M, *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; 62:1145-1155.

Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obesity reviews.* 2012; 13(1):136-149.

Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Cell & Developmental Biology.* 2001; 12(2):69-78.

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; 22:512-519.

Kawakami Y, Matsuo K, Murata M, *et al.* Expression of Angiotensin II Receptor-1 in Human Articular Chondrocytes. *Arthritis*. 2012; 2012:648537.

Kloppenburg. Hand osteoarthritis-nonpharmacological and pharmacological treatments. *Nat Rev Rheumatol*. 2014; 10(4):242-51.

Kma L, Gao F, Fish BL, *et al.* Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors Mitigate Collagen Synthesis Induced by a Single Dose of Radiation to the Whole Thorax. *J. Radiat. Res*. 2012;53:10-17.

Krasnokutsky S, Samuels J, Abramson SB. Osteoarthritis in 2007. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. 2007; 65(3):222-8.

Kraus VB, Huebner JL, DeGroot J, *et al.* The OARSI Histopathology Initiative - Recommendations for Histological Assessments of Osteoarthritis in the Guinea Pig. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18(Suppl 3):S35-52.

Kwon WY, Cha HN, Heo JY, *et al.* Interleukin-10 deficiency aggravates angiotensin II-induced cardiac remodeling in mice. *Life Sci*. 2016; 1;146:214-21.

Lajeunesse D. The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004; 12 Suppl A:S34-8.

Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, *et al.* Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States. *Arthritis & Rheumatism*. 2008; 58(1):26-35.

Lee Y, Pai M, Brederson JD, *et al.* Monosodium iodoacetate-induced joint pain is associated with increased phosphorylation of mitogen activated protein kinases in the rat spinal cord. *Mol Pain*. 2011; 20:7:39.

Lippiello L, Hall D, Mankin HJ. Collagen Synthesis in Normal and Osteoarthritic Human Cartilage. *The Journal of Clinical Investigation*. 1977; 59:593-600.

Litwic A, Edwards MH, Dennison EM, *et al*. Epidemiology and burden of osteoarthritis. *British Medical Bulletin*. 2013; 105:185-199.

Liu P, Okun A, Ren J, *et al*. Ongoing Pain in the MIA Model of Osteoarthritis. *Neurosci Lett*. 2011; 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; 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; 17:971-979.

Losina E, Walensky RP, Kessler CL, *et al*. Cost-effectiveness of Total Knee Arthroplasty in the United States. *Arch Intern Med*. 2009; 169(12):1113-21.

Losina E, Walensky RP, Reichmann WM, *et al*. Impact of Obesity and Knee Osteoarthritis on Morbidity and Mortality in Older Americans. *Ann Intern Med*. 2011;154:217-226.

Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, *et al*. Cartilage Cell Clusters. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(8):2206-18.

Lotz M. Osteoarthritis year 2011 in review: biology. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012; 20(3):192–196.

Lundon K, Walker JM. Cartilage of Human Joint and Related Structures. In: MageeDJ, Zachazewski JE, Quillen WS. Scientific Foundations and Principles of Practice In Musculoskeletal Rehabilitation. St Louis. São Paulo: Saunders Elsevier; 2007. p. 144-173.

Mapp PI, Sagar DR, Ashraf S, *et al.* Differences in structural and pain phenotypes in the sodium monoiodoacetate and meniscal transection models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21(9):1336-45.

March LM, Bagga H. Epidemiology of osteoarthritis in Australia. *Med J Aust.* 2004; 180(5):S6-10.

Martel-Pelletier J, Wildi LM, Pelletier JP. Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone.* 2012; 51(2):297-311.

Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, *et al.* Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 13;2:16072.

Martin MFR, McKenna F, Bird HA, *et al.* Captopril: a new treatment for rheumatoid arthritis? *The Lancet.* 1984; 1(8390):1325-8.

Mayr M, Duerrschmid C, Medrano G. TNF/Ang-II synergy is obligate for fibroinflammatory pathology, but not for changes in cardiorenal function. *Physiol Rep.* 2016; 4(8).

McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, *et al.* OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2014; 22:363e388.

Meini S, Maggi CA. Knee osteoarthritis: a role for bradykinin? *Inflamm. res.* 2008; 57:351-361.

Michaud CM, McKenn MT, Begg S, *et al.* The burden of disease and injury in the United States 1996. *Popul Health Metr.* 2006; 4:11.

Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, *et al.* Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF-kB. *J Inflamm (Lond)*. 2010; 12;7:21.

Mikrut K, Kupsz J, Koźlik J, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce oxidative stress intensity in hyperglycemic conditions in rats independently from bradykinin receptor inhibitors. *Croat Med J*. 2016; 57:371-80

Milanez MC, Gomes MG, Vassallo DV, *et al.* Effects of captopril on interstitial collagen in the myocardium after infarction in rats. *J Card Fail*. 1997; 3(3):189-97.

Muratovic D, Cicuttini F, Wluka A, *et al.* Bone marrow lesions detected by specific combination of MRI sequences are associated with severity of osteochondral degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18:54.

Nakata K, Hanai T, Take Y, *et al.* Disease-modifying effects of COX-2 selective inhibitors and non-selective NSAIDs in osteoarthritis: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018; pii: S1063-4584(18)31315-3.

Naveen SV, Ahmad RE, Hui WJ, *et al.* Histology, glycosaminoglycan level and cartilage stiffness in monoiodoacetate-induced osteoarthritis: comparative analysis with anterior cruciate ligament transection in rat model and human osteoarthritis. *Int J Med Sci*. 2013; 11(1):97-105.

Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin*. 2013; 39(1):1-19.

Norris S, Weinstein J, Peterson K, *et al.* Drug Class Review: Direct Renin Inhibitors, Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors, and Angiotensin II Receptor Blockers. *Oregon Health & Science University*. 2010. [Acesso 11 mar. 2012]; Disponível em: <<http://derp.ohsu.edu/about/final-products.cfm>>

Okamura A, Rakugi H, Ohishi M, *et al.* Upregulation of renin–angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *Journal of Hypertension*. 1999; 17:537-545.

Parment S, Lynn C, Glass RM. Osteoarthritis of the Knee. *JAMA*. 2003; 289(8).

Pattacini L, Casali B, Boiardi L, *et al.* Angiotensin II protects fibroblast-like synoviocytes from apoptosis via the AT1-NF- $\kappa$ B pathway. *Rheumatology*. 2007; 46:1252-1257.

Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev*. 2006; 86(3):747-803.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis & Rheumatism*. 2001; 44(6):1237-47.

Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, *et al.* The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis and Cartilage* 2011; 19(11):1270-85.

Peters MJ, Symmons DP, McCarey D, *et al.* EULAR evidence-based recommendations for cardiovascular risk management in patients with rheumatoid arthritis and other forms of inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69(2): 325-31.

Price A, Lockhart JC, Ferrell WR, *et al.* Angiotensin II Type 1 Receptor as a Novel Therapeutic Target in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2007; 56(2):441-447

Prieto-Alhambra D, Judge A, Javaid MK, *et al.* “Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints”. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73(9): 1659-1664.

Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, *et al.* Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006; 14(1):13-29.



Puett, DW, Griffin, MR. Published trials of nonmedicinal and noninvasive therapies for hip and knee osteoarthritis. *Ann Intern Med.* 1994; 121(2):133-40.

Ramos SG, Montenegro AP, Goissis G, *et al.* Captopril reduces collagen and mast cell and eosinophil accumulation in pig serum-induced rat liver fibrosis. *Pathology International.* 1994; 44(9):655-61.

Roche. <https://www.roche.pt/corporate/index.cfm/farmaceutica/ensaios-clinicos-profissionais-de-saude/fases-dos-ensaios-clinicos/>

Rodrigues de Araujo G, Granato de Faria K, Lima WG, *et al.* Effect of captopril and the bradykinin-PKC pathway on ROS production in type 1 diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011; 89(12):923-33.

Rojas-Ortega M, Cruz R, Vega-López MA, *et al.* Exercise modulates the expression of IL-1 and IL-10 in the articular cartilage of normal and osteoarthritis-induced rats. *Pathology – Research and Practice.* 2015; 211:435-443

Ruiz-Romero C, Carreira V, Rego I, *et al.* Proteomic analysis of human osteoarthritic chondrocytes reveals protein changes in stress and glycolysis. *Proteomics.* 2008; 8(3):495-507.

Sakata K, Furumatsu T, Abe N. Histological Analysis of Failed Cartilage Repair after Marrow Stimulation for the Treatment of Large Cartilage Defect in Medial Compartmental Osteoarthritis of the Knee. *Acta Med. Okayama.* 2013; 67(1):65-74.

Savitskaya YA, Duarte C, Marín N, *et al.* Identification of Circulating Natural Antibodies against Endogenous Mediators in the Peripheral Blood Sera of Patients with Osteoarthritis of the Knee: A New Diagnostic Frontier. *J Mol Biomark Diagn.* 2012;3:6.

Scanzello CR. Pathologic and Pathogenic Processes in Osteoarthritis: The Effects of Synovitis. *HSSJ*. 2012; 8(1):20-2.

Schaible HG, von Banchet GS, Boettger MK, *et al*. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1193:60-9.

Shi S, Klotz U. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008; 64(3):233-52.

Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, *et al*. Anti-Inflammatory Effects of the Activation of the Angiotensin-(1-7) Receptor, Mas, in Experimental Models of Arthritis. *J Immunol*. 2010; 185:5569-5576.

Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, *et al*. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. *Peptides*. 2013; 46:53-63.

Singh G, Miller JD, Lee FH, *et al*. 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; 8(15):S383-S391.

Sládková M, Kojsová S, Jendeková L, *et al*. Chronic and Acute Effects of Different Antihypertensive Drugs on Femoral Artery Relaxation of L-NAME Hypertensive Rats. *Physiol Res*. 2007; 56 Suppl 2:S85-91.

Ströbel S, Loparic M, Wendt D, *et al*. Anabolic and Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12(2):R34.

Studer R, Jaffurs D, Stefanovic-Racic M, *et al*. Nitric oxide in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1999; 7, 377-379.

Tang Y, Hu X, Lu X. Captopril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, possesses chondroprotective efficacy in a rat model of osteoarthritis through suppression local renin-angiotensin system. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(8):12584-92.

Tavares MT, Primi MC, Polli MC, *et al*. Interações fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. *Quim. Nova*. 2015; 38(8):1117-1124.

Thakur M, Rahman W, Hobbs C, *et al*. Characterisation of a Peripheral Neuropathic Component of the Rat Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis. *PLoS One*. 2012; 7(3):e33730.

Tigerstedt R, Bergman PG. Niere und Kreislauf. *Scand. Arch. Physiol*. 1898; 8:223-271.

Tikiz C, Utuk O, Pirildar T, *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; 32(11):2095-101.

Tsuchida AI, Beekhuizen M, Rutgers M, *et al*. Interleukin-6 is elevated in synovial fluid of patients with focal cartilage defects and stimulates cartilage matrix production in vitro regeneration model. *Arthritis Research & Therapy*. 2012, 14:R262

Tsukamoto I, Akagi M, Inoue S, *et al*. Expressions of local renin-angiotensin system components in chondrocytes. *Eur J Histochem*. 2014; 23;58(2):2387.

Uesugi T, Froh M, Gäbele E, *et al*. Contribution of angiotensin II to alcohol-induced pancreatic fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 311(3):921-8.

Veronese N, Stubbs B, Solmi M. Knee Osteoarthritis and Risk of Hypertension: A Longitudinal Cohort Study. *Rejuvenation Res*. 2018; 21(1):15-21

Villiger PM, Lotz M. Expression of prepro-enkephalin in human articular chondrocytes is linked to cell proliferation. *The EMBO Journal*. 1992; 11(1):135-143.

Waly N, Refaiy A, Aborehab NM. IL-10 and TGF- $\beta$ : Roles in chondroprotective effects of Glucosamine in experimental Osteoarthritis? *Pathophysiology*. 2017; 24:45-49.

Weinstein T, Tel-Aviv; Gafer U, *et al.* Inhibition of the renin-angiotensin system for the treatment of renal, vascular and cartilage pathology. Patent N $^{\circ}$ : US 8,765,678 B2. Jul. 1, 2014.

Whelton A, Fort JG, Puma JA, *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; 8(2):85-95.

White WB. Defining the Problem of Treating the Patient with Hypertension and Arthritis Pain. *The American Journal of Medicine*. 2009; 122(5 Suppl):S3-9.

Wilson W, Burken CV, Donkelaar CV, *et al.* Causes of Mechanically Induced Collagen Damage in Articular Cartilage. *J Orthop Res*. 2006; 24(2):220-8.

Wojdasiewicz P, Poniatowski LA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014:561459.

Wolf G. Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney. *Miner Electrolyte Metab*. 1998; 24(2-3):174-80.

World Health Organization (WHO). Chronic rheumatic conditions: Osteoarthritis. [Acesso 06 ago. 2013]; Disponível em: <<http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>>.

Yamagishi K, Tsukamoto I, Nakamura F, *et al.* Activation of the renin-angiotensin system in mice aggravates mechanical loading-induced knee osteoarthritis. *Eur J Histochem*. 2018; 62(3):2930.

Yan K, Shen Y. Aliskiren has chondroprotective efficacy in a rat model of osteoarthritis through suppression of the local renin-angiotensin system. *Molecular medicine reports*. 2017; 16:3965-3973.

Yoshimura N, Muraki S, Oka H, *et al*. Accumulation of metabolic risk factors such as overweight, hypertension, dyslipidaemia, and impaired glucose tolerance raises the risk of occurrence and progression of knee osteoarthritis: a 3-year follow-up of the ROAD study. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2012; 20:1217-1226.

Yu SP, Hunter DJ. Managing osteoarthritis. *Aust Prescr*. 2015; 38(4):115-9.

Yuan Q, Sun L, Li JJ, *et al*. Elevated VEGF levels contribute to the pathogenesis of osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2014; 17:15:437.

Zhang W, Jones A, Doherty M. Does paracetamol (acetaminophen) reduce the pain of osteoarthritis? A meta-analysis of randomised controlled trials. *Ann. Rheum. Dis*. 2004; 63, 901-907.

Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, *et al*. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis Part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2010; 18:476-499.

Zhang W, Ouyang H, Dass CR, *et al*. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. *Bone Research*. 2016; 4:15040.

Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of Osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. 2010; 26(3):355-69.

Zhang Y, Wang J, Liu X. Association between hypertension and risk of knee osteoarthritis: A meta-analysis of observational studies. *Medicine (Baltimore)*. 2017; 96(32):e7584.

Zhen G, Wen C, Jia X, *et al.* Inhibition of TGF- $\beta$  signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nature Medicine*. 2013; 19:704-712.

Zhuo JL, Li XC. New Insights and Perspectives on Intrarenal Renin-Angiotensin System: Focus on Intracrine/Intracellular Angiotensin II. *Peptides*. 2011; 32(7):1551-65.

Zhuo Q, Yang W, Chen J, *et al.* Metabolic syndrome meets osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012; 8(12):729-37.

## 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](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)



**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 92/2018

**Título do projeto:** Avaliação dos efeitos do captopril nos tecidos articulares de ratos com osteoartrite induzida por monoiodoacetato de sódio

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Anderson Jose Ferreira

**Unidade:** Instituto de Ciências Biológicas

**Departamento:** Departamento de Morfologia

**Situação atual:** **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado com recomendação na reunião do dia 07/05/2018. Validade: 07/05/2018 à 06/05/2023 Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.

Belo Horizonte, 07/05/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_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) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)