ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS – MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPÇÃO E NA LISE DA CARTILAGEM ARTICULAR

Francisco Saraiva da Silva Junior
Francisco Airton Castro da Rocha

Serviço de Reumatologia – Hospital Walter Cantídio
Universidade Federal do Ceará (HUWC – UFC)

RESUMO

Os autores relatam a experiência do grupo no estudo de mecanismos de hipernocicepção (dor) e lesão da cartilagem articular no modelo de artrite induzida por zymosan em ratos.

Palavras-Chave: Artrite; Zymosan; Óxido Nítrico; Dor; Cartilagem.

ABSTRACT

The authors present the experience of the group in the study of the mechanisms of hypernociception (pain) and articular cartilage lesion in the zymosan-induced arthritis model in rats.

Keywords: Arthritis; Zymosan; Nitric Oxide; Pain; Cartilage

ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN EM RATOS – MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPÇÃO E NA LISE DA CARTILAGEM ARTICULAR

Francisco Saraiva da Silva Junior*, Francisco Airton Castro da Rocha**

Introdução

Dentre as artropatias crônicas inflamatórias, a artrite reumatóide (AR) é a mais prevalente e a maior responsável por invalidez, quer temporária, quer permanente. Embora se tenha avançado na compreensão da etiopatogenia dessa doença, muito dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos ainda estão por ser elucidados. O fato de não existir artrite reumatóide, tal como a vemos em humanos, em outras espécies, representa uma dificuldade técnica no estudo da AR. Entretanto, vários modelos animais têm sido empregados como ferramentas úteis na compreensão dos mecanismos de lesão em artrites. De fato, mesmo a introdução dos agentes biológicos na terapêutica da AR se fundamentou nos resultados obtidos em modelos experimentais em animais, antes de serem testados em ensaios clínicos.

Nosso grupo tem trabalhado com artrite experimental, particularmente com o modelo de artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos, nos últimos 12 anos. Recentemente, também padronizamos um método para estudo da hipernocicepção em um modelo de osteoartrite em ratos. No presente artigo, discorremos brevemente sobre os modelos experimentais de artrite que mimetizam a AR e exploraremos alguns dos resultados que obtivemos ao cabo desses anos de trabalho, empregando o modelo de AZy, enfocando a hipernocicepção e a lesão da cartilagem articular.

Modelos Experimentais de Artrite

Vários modelos foram descritos no intuito de induzir artrite em animais tentando reproduzir achados da AR. A rigor, um modelo ideal de artrite deveria preencher os seguintes requisitos: ter achados clínicos, radiológicos e histopatológicos semelhantes aos observados na AR, sem sistemização; apresentar mínimas alterações de «artrite não-reumatóide»; ser de fácil indução, baixo custo, boa reprodutibilidade, utilizando animal de fácil acesso; ter confiabilidade quanto ao início, incidência e avaliação da gravidade das alterações; responder a agentes terapêuticos de forma semelhante ao observado na AR; ter parâmetros de alterações imunológicas e de atividade mensuráveis.[1] Nenhum dos modelos atualmente disponíveis satisfaz plenamente todas essas condições, embora todos se aproximem razoavelmente do objetivo pretendido.

A Artrite Induzida por Adjuvante consiste na injeção intradérmica de Adjuvante completo de Freund, em ratos susceptíveis. Entre 14 e 21 dias após a injeção do estímulo, os animais desenvolvem artrite generalizada e uma resposta sistêmica, podendo envolver inclusive a cartilagem das orelhas. O aspecto histológico lembra a sinovite reumatóide humana, encontrando-se hiperplasia sinovial, infiltrado linfomononuclear, neoformação vascular e, em fases posteriores, lise da cartilagem articular e reabsorção óssea. A invasão da cartilagem e do espaço subcondral assemelha a sinovite desse modelo ao *pannus* reumatóide. Uma desvantagem, entretanto, é a segregação em cepas de ratos e a dificuldade em se precisar o início da artrite.

A Artrite induzida por colágeno tipo II foi classicamente estabelecida utilizando camundongos, mas também pode ocorrer em ratos e primatas. Além de reproduzir achados histológicos e evolutivos da AR humana, esse modelo apresenta a vantagem de utilizar um animal que vem sendo empregado em técnicas de biologia molecular, permitindo modificações genéticas. A especificidade para o colágeno tipo II, admitindo-se ser essa proteína um auto-antígeno importante no desencadeamento do processo inflamatório crônico é, ao mesmo tempo, uma limitação, uma vez que existe segregação por cepa de camundongo, além de não se ter defi-

*Médico Reumatologista – HUWC – UFC e Pós-graduando da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – SP.
**Professor Adjunto – Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da UFC.

nido o colágeno como um auto-antígeno relevante na fisiopatologia da AR.

Outros modelos também têm sido empregados, como a artrite induzida por proteoglicanos, pristano (óleo mineral), a artrite induzida por antígeno, que consiste em uma reação intra-articular à injeção de um antígeno (p.ex.: ovalbumina metilada) ao qual o animal é previamente sensibilizado, além dos modelos empregando agentes infecciosos (p.ex.: Mycoplasma, parede de estreptococos), para citar alguns. Em comum, os modelos apresentam a similaridade histológica com a sinovite da AR humana, mecanismos imunológicos na sua fisiopatologia, além de resposta terapêutica similar à observada na AR.

Por último, vale destacar que manipulações genéticas, gerando animais transgênicos ou *knock-out,* vieram agregar uma nova ferramenta aos modelos animais, permitindo avaliar o papel de genes individuais na fisiopatologia da AR, na homeostasia normal e no desenvolvimento de auto-imunidade, bem como de citocinas envolvidas na fisiopatologia dessa doença. Como exemplo dessa estratégia, estudo recente demonstrou que uma mutação pontual em um único gene, chamado ZAP70, pode desencadear artrite crônica autoimune espontânea em uma cepa de camundongos.[2] Esses animais apresentam substituição de triptofano por cisteína no resíduo 163 (W163C) do domínio carboxi-terminal SH2 do produto do gene ZAP70. Nesses animais, linfócitos T auto-reativos que sofreriam seleção negativa no timo durante o desenvolvimento normal, passam a ser selecionados positivamente. Esse tipo de mutação pode estar presente em um pequeno subgrupo de pacientes com AR,[2] possivelmente com repercussão no desencadeamento ou na evolução da doença. Por outro lado, o ressurgir do interesse na participação de linfócitos B e autoanticorpos na fisiopatologia da AR é reforçado por outro modelo de artrite espontânea em camundongos. Animais K/BxN, apresentam produção de anticorpos anti-G6PI (glicose-6-fosfato isomerase), que seriam «artritogênicos». Tais anticorpos produzem artrite transitória, quando administrados (passivamente) a camundongos normais. O fato de que anticorpos anti-G6PI podem ser detectados no soro de até 64% de pacientes com AR estabelece um possível vínculo entre essa alteração vista em um modelo animal e a doença em humanos.[4] Ainda, a participação de citocinas pró-inflamatórias como *tumor necrosis factor (*TNF-α), cujo bloqueio é alvo da terapêutica mais efetiva atualmente em artropatias inflamatórias, pode ser ilustrada em modelos animais. Camundongos transgênicos expressando excesso de TNF-α, como a linhagem Tg197, desenvolvem artrite crônica semelhante à AR e melhoram com a administração de anticorpos monoclonais anti-TNFα.[5]

Artrite Induzida por Zymosan

O zymosan é um polissacarídeo derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae,* cuja administração em tecidos promove intensa reação inflamatória. Originalmente, a AZy foi descrita por Keystone, em 1977.[6] A injeção intra-articular de zymosan promove sinovite erosiva grave. Na fase aguda, até três dias após a indução, ocorre aumento de permeabilidade vascular e migração celular. A seguir, desenvolve-se sinovite com infiltrado mononuclear e reação fibroblástica lembrando a sinovite crônica que caracteriza o *pannus* reumatóide.

Estudando a fase crônica do modelo, nós evidenciamos, até 28 dias após a injeção do zymosan, que a sinovite persiste, havendo formação de células gigantes, ao lado de intensa proliferação linfomonocitária na sinóvia. As células gigantes podem ser observadas a partir dos 14 dias de artrite e a extensão da sinovite lembra o pannus reumatóide, levando à lise da cartilagem articular e do osso subcondral.[7]

Inicialmente, a inflamação associada à injeção do zymosan foi atribuída à ativação do complemento e liberação de enzimas lisossomiais a partir de células inflamatórias migradas para o local. Estudo recente, utilizando camundongos *knock-out* para o receptor do tipo *type II toll-like* receptors (TLR2), demonstrou que houve redução significante da sinovite, quando comparados a animais normais.[8] Esse resultado sugere um importante componente de imunidade adquirida participando na fisiopatologia da AZy.

Empregando esse modelo, padronizamos o estudo da hipernocicepção na fase aguda, além da quantificação da lesão da cartilagem articular, através da determinação da perda de glicosaminoglicanos da matriz, à medida que prossegue a artrite.

Estudo da Hipernocicepção na Artrite Induzida por Zymosan em Ratos

A limitação de movimentos representa um proble-

ma importante para pacientes portadores de artropatias inflamatórias. Embora o alívio da dor seja frequentemente o principal objetivo no tratamento agudo dessas condições, muito pouco se conhece dos mecanismos de desencadeamento da dor em artropatias.

O teste de incapacitação articular (IA) para ratos foi desenvolvido para estudar a IA, definida como a inabilidade de um animal (rato) para deambular, depois de submetido à injeção intra-articular de um agente inflamatório. Na descrição original, foi usado carragenina como estimulo inflamatório.[9] Nesse teste, a IA presume-se ser devida à alteração da nocicepção decorrente da injeção do estimulo (p.ex. carragenina, zymosan) na junta dos animais. Após a injeção de zymosan no joelho direito, os animais são postos para deambular sobre um cilindro metálico (30cm largura × 50cm diâmetro), coberto com uma malha de arame inoxidável, que gira a uma velocidade de 3rpm. Colocam-se sapatilhas metálicas em volta das patas traseiras dos animais, que são postos para deambular para se habituarem. A pata direita é conectada a um circuito simples computadorizado, para aquisição de dados. O Tempo de Suspensão da Pata (TSP) é definido como o tempo que o animal deambula sem tocar o cilindro com a pata injetada, por um período de 60 segundos, o qual é tomado como diretamente proporcional à incapacitação articular. A incapacitação articular é admitida como refletindo hipernocicepção.

Empregando esse modelo, demonstramos que a IA está associada à ativação de nociceptores localizados em estruturas periarticulares e não na sinóvia *per se*. Ainda, o desenvolvimento da IA (hipernocicepção) se associou diretamente com a migração de neutrófilos à cavidade articular, que é máximo na sexta hora após a injeção do estímulo.[7] Esse fato foi corroborado pela abolição da IA quando se bloqueou a migração de neutrófilos, quer usando agentes inibidores da quimiotaxia dessas células, como o inibidor de síntese de leucotrienos MK866,[6] quer quando se induziu neutropenia nos animais através da administração de um anticorpo anti-neutrófilos (dados não publicados). Ainda nesse modelo, demonstramos que o edema sinovial ou a presença de derrame articular *per se* não parecem ser responsáveis pela hipernocicepção.[7]

Demonstrando o caráter multifatorial da modulação da dor, demonstramos que citocinas pró-inflamatórias estão associadas à hiperalgesia, ao passo que citocinas ditas anti-inflamatórias, associadas com resposta do tipo Th2, promovem anti-nocicepção na AZy. De fato, a administração de antisoro anti-interleucina 4 (IL-4), anti-IL-10 ou anti-IL-13 a animais submetidos à AZy promoveu aumento da hipernocicepção, ao passo que a administração de IL-4, IL-10 ou IL-13 inibiu esse fenômeno.[11]

O papel do óxido nítrico (NO) no modelo de AZy tem sido extensamente investigado por nosso grupo. Demonstramos que existe liberação de NO no líquido sinovial, que é máxima 6 horas após a injeção do zymosan. É interessante salientar que essa liberação está associada ao pico de migração de neutrofilos para a cavidade articular, sugerindo que essas células estão associadas à produção de NO no ambiente articular. Ainda, demonstramos que existe aumento da expressão da enzima NO sintase indutível (NOSi) na sinóvia inflamada, particularmente nos sinoviócitos e nos neutrófilos migrados, embora outras células, como as endoteliais e condrócitos, também possam contribuir para essa liberação.[12,13]

O papel do NO nos mecanismos de dor é controverso, havendo relatos de pró e anti-nocicepção associados a esse mediador. Através de modulação farmacológica, demonstramos que inibidores da NOS promovem analgesia apenas quando administrados antes da injeção do zymosan (profilaticamente). Quando a administração desses compostos é feita após a indução da artrite (terapeuticamente), os compostos não são efetivos em inibir a hipernocicepção. Esse resultado foi obtido tanto quando se fez a administração dos compostos de forma sistêmica, quanto intra-articular. Entretanto, quando administramos doadores de NO de forma terapêutica, obtivemos inibição significante da hipernocicepção.[12] Os dados apontam para o potencial analgésico de doadores de NO em artrites. Concordando com nossos resultados, já havia sido demonstrado que doadores de NO promoveram analgesia em pacientes portadores de periartrite de ombro.[14]

Em outra linha de pesquisa, padronizamos recentemente o método de registro da incapacitação articular para avaliação da dor em um modelo de osteoartrite experimental. No modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) de ratos, padronizamos o estudo da hipernocicepção (dor) usando dados paramétricos, independentes do observador. Nossos primeiros resultados mostram que a dor no modelo de TLCA é inibida pela administração de inibidores de cicloxigenase e por

morfina. Ainda, existe uma associação do aparecimento da dor com elevação dos níveis de NO no lavado articular dos animais. Esses dados, recém-publicados, estabelecem um modelo reprodutível de estudo da dor em osteoartrite experimental, associada com a deambulação dos animais, o que em parte mimetiza a dor experimentada por humanos portadores de osteoartrite.[15]

Estudo dos Mecanismos de Lesão da Cartilagem Articular na Artrite Induzida por Zymosan

Os modelos de artrite, em geral, empregam analises histológicas para mensurar a lesão estrutural da cartilagem. Embora reflita imagens de razoável comparação, a histologia dos tecidos fornece dados não paramétricos de avaliação, passiveis de influência subjetiva pelo observador. No intuito de estabelecer um critério objetivo, reprodutível, de fácil quantificação, baseado em uma variável contínua, fornecendo dados paramétricos para avaliação, estudamos a variação da quantidade de glicosaminoglicanos (GAG) da cartilagem articular. Nossos resultados mostraram associação entre a evolução e gravidade da sinovite na AZy com a redução na quantidade de GAG na matriz da cartilagem, de tal sorte que a partir dos 7 dias de artrite essa quantidade é significantemente menor em comparação aos valores basais (controles), persistindo reduzida até os 21 dias de artrite.[13]

Após essa padronização, considerando o nosso interesse no estudo do envolvimento do NO na fisiopatologia da AZy, estudamos o efeito da administração de inibidores de NOS sobre a lesão da cartilagem articular, avaliada por esse método. Nossos resultados mostraram que, embora a administração de inibidores de NOS promovesse redução da migração celular para a cavidade articular na fase aguda e do infiltrado inflamatório na sinovite crônica da AZy, a quantidade de GAG não era alterada. Ao contrário, os animais tratados com os inibidores de NOS, quer não-seletivos, quer seletivos para a NOS indutível, apresentavam menor quantidade de GAG, em relação aos animais submetidos a AZy e tratados apenas com o diluente.[13]

Efeitos deletérios atribuíveis ao NO tem sido associados com a geração de espécies reativas de nitrogênio, formadas após a liberação do NO. Isso pode ocorrer por combinação do NO com outras substâncias, incluindo espécies reativas como o ânion superóxido. O peroxinitrito, um produto formado a partir da combinação do NO com superóxido, foi associado com efeitos lesivos decorrentes da nitrosilação de proteínas, tais como promovendo desestabilização de membranas e quebras de DNA.[16] Também se detectou a presença de 3-nitrotirosina, um marcador da formação de peroxinitrito, na placa aterosclerótica em humanos,[17] em rins provenientes de pacientes que apresentaram reação enxerto-hospedeiro,[18] bem como no líquido sinovial de artrites.[19] Em cultura de osteoblastos humanos, demonstramos que a presença de peroxinitrito inibe a proliferação e a diferenciação. Entretanto, níveis elevados de NO não eram lesivos, uma vez que a produção de peroxinitrito estivesse bloqueada. Ainda, a adição de um inibidor de NOS, reduzindo drasticamente os níveis basais de NO, impedia a proliferação celular. Em conjunto, esses dados apontaram para um papel crucial do NO, em baixos níveis, para a homeostase celular em osteoblastos humanos, ao passo que espécies reativas de nitrogênio estariam associadas com dano a funções celulares.[20]

Em consonância com esses resultados obtidos em estudos *in vitro,* pode-se admitir que *scavengers* de peroxinitrito bloqueiem a ação dessa substância. De fato, foi demonstrado que a elevação dos níveis séricos de ácido úrico, um antioxidante natural que age como *scavenger* de espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito, reduziu a lesão tecidual no modelo de encefalomielite experimental em camundongos.[21]

Em vista do exposto, administramos acido úrico aos ratos submetidos à AZy. Obtivemos redução significante do infiltrado celular na sinóvia, na fase crônica. Mais interessante, verificamos que a quantidade de GAG foi restaurada, protegendo esses animais da lesão da cartilagem que ocorre na AZy. Esses resultados foram associados com a elevação dos níveis sericos de ácido úrico nos animais e com a redução dos níveis de peroxinitrito no lavado articular na AZy.[13] Em conjunto, os dados demonstram um efeito protetor de *scavengers* de espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito, na lesão tecidual (cartilagem articular) em artrites.

É interessante destacar que a coexistência de gota e artrite reumatóide é muito abaixo do que seria esperado pela prevalência das duas doenças na população geral. Ainda, mulheres praticamente não desenvolvem gota, enquanto homens são menos acometidos de artrite reumatóide. Assim, nos-

sos resultados sugerem, de maneira inédita, que os níveis endógenos de antioxidantes (p.ex. ácido úrico) podem influenciar o desencadeamento e/ou a gravidade de artrites crônicas.

Em resumo, nossos estudos no modelo de AZy permitiram-nos demonstrar o efeito de mediadores inflamatórios tanto em uma lesão funcional (hipernocicepção) quanto em uma lesão estrutural (lise da cartilagem articular) em artrites. O baixo custo, boa reprodutibilidade e acessibilidade desse modelo constituem, no nosso entendimento, requisitos fundamentais que nos possibilitam desenvolver pesquisas relevantes e originais em reumatologia. A ampliação da divulgação dos nossos resultados aqui permitida pela Acta Reumatologica Portuguesa é uma oportunidade interessante de estabelecer parcerias com pesquisadores da comunidade reumatológica lusitana que vislumbrem objetivos comuns que possamos partilhar.

Endereço para correspondência:
Francisco Airton Castro da Rocha
Rua Dr. José Lourenço, 1930 – CEP 60115-281
Fortaleza – Ceará - Brasil
Telef: 55 85 32446215; FAX: 55 85 32446215.
E-mail: arocha@ufc.br

Referências

1. Oliver SJ, Brahn E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. J Rheumatol 1996; 23: 56-60.
2. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, et al. Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. Nature 2003; 426 (6965): 454-460.
3. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. Cell 1996; 87: 811-822.
4. Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. Nat Immunol 2001; 2: 746-753.
5. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, Kollias G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. EMBO J 1991;10:4025--4031.
6. Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C, Allison AC. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. Arthritis Rheum 1977; 20:1397-1401.
7. Rocha FAC, Aragão Jr. AGM, Oliveira RC, Pompeu MML, Vale MR, Ribeiro RA. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. Inflamm Res 1999; 48: 485-490.
8. Frasnelli ME, Tarussio D, Chobaz-Péclat V, Busso M, So A. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. Arthritis Res Ther 2005; 7:R370-R379.
9. Tonussi CR, Ferreira SH. Rat knee-joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. Pain 1992; 48:421-427.
10. Rocha FAC, Teixeira MM, Rocha JCS, Girão VCC, Bezerra MM, Ribeiro RA, Cunha FQ. Blockade of Leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. Eur J Pharmacol 2004; 497:81-86.
11. Vale ML, Benevides VM, Sachs D, Brito GA, Rocha FAC, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ, Ribeiro RA. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. Br J Pharmacol 2004; 143(7):833 - 844.
12. Bezerra MM, Brain SD, Greenacre S, Jerônimo SMB, Melo LB, Keeble J, Rocha FAC. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. Br J Pharmacol 2004;141(1): 172-182.
13. Rocha JCS, Peixoto MEB, Jancar S, Cunha FQ, Ribeiro RA, Rocha FAC. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. Br J Pharmacol 2002; 136:588-596.
14. Berrazueta JR, Losada A, Poveda J et al. Succesful treatment of shoulder pain syndrome due to supraspinatus tendinitis with transdermal nitroglycerin. A double blind study. Pain 1996; 66: 63-67.
15. Castro RR, Cunha FQ, Silva Jr FS, Rocha FAC. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis - evidence of a role for nitric oxide. Osteoarthritis and Cartilage 2006 Mar 29 [Epub ahead of print]
16. Halliwell B, Zhao K, Whiteman M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good. Free Rad Res 1999; 31:651-659.
17. Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG et al. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. Biol Chem Hoppe-Seyler 1994; 375: 81-88.
18. MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:11853-11858.
19. Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. FEBBS Lett 1994; 350:9-12.