

AVALIACÃO DO DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND EM RATOS FÊMEAS E MACHOS

Mariana Pedrozo do Nascimento (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Hugo Tokunaga Zerbinati, Silvana Martins Caparroz-Assef, Franciele Queiroz Ames, Ciomar Aparecida Bersani-Amado (Orientador), e-mail: cabamado@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde /Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Farmacologia, Farmacologia Geral.

Palavras-chave: artrite induzida por adjuvante, inflamação, modelo animal.

Resumo:

O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund (AIA), comparativamente, em ratos machos e fêmeas. Foram utilizados ratos Holtzman, divididos em grupos: Machos, 1) normal e 2) artrítico, e Fêmeas, 3) normal e 4) artrítico. Os parâmetros avaliados foram: o volume das patas injetada e contralateral não injetada (edema), a gravidade das lesões secundárias, o número de leucócitos recrutados no líquido sinovial das articulações inflamadas e o peso corporal. Os resultados mostraram evidências que as manifestações clínicas da AIA, tanto na fase inicial como na fase crônica da sua progressão não foram diferentes em ratos machos e fêmeas neste modelo experimental.

Introdução

A Artrite Reumatóide humana (AR) é uma doença inflamatória crônica e degenerativa, de natureza autoimune, que se caracteriza por um processo inflamatório nas articulações, com hiperplasia sinovial, erosão e destruição de tecido ósseo e cartilaginoso adjacentes, entre outras manifestações sistêmicas. A maior prevalência de AR é observada em pessoas de idade mais avançada e do sexo feminino, sendo influenciada por fatores genéticos, ambientais e comportamentais. A artrite induzida por adjuvante (AIA) é um dos modelos experimentais de doença inflamatória crônica, com características muito semelhantes à AR, tanto em termos clínicos como histopatológicos que pode ser utilizado para o estudo de fármacos com propriedades anti-inflamatória e imunomoduladora (VAN EDEN and WAKSMAN, 2003; STOLINA et al., 2009; XIE et al., 2013). A maioria dos estudos utilizando o modelo de AIA são realizados em ratos machos. Pelo nosso conhecimento, não tem estudo que compara o desenvolvimento da AIA em ratos machos e fêmeas. Assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o desenvolvimento da AIA comparativamente em ratos machos e fêmeas.

Materiais e métodos

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Holtzman, com idade de aproximadamente 60 dias, pesando 190-210 g e 150- 170 g, respectivamente. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/4154050618). Os animais foram divididos em quatro grupos: Machos, 1) normal e 2) artrítico, e Fêmeas, 3) normal e 4) artrítico. A artrite foi induzida por uma injeção subcutânea de 0,1 mL de uma suspensão de adjuvante completo de Freund (ACF-5%) na pata posterior esquerda dos animais. O volume das patas, injetada e contralateral não injetada, foi determinado por pletismografia digital nos dias 1, 4, 7, 11, 14, 18, 20, 25 e 28 após a indução da artrite. Os resultados foram expressos como aumento no volume das patas comparado ao volume inicial (μL). A gravidade das lesões secundárias foi avaliada por um sistema de graduação numérica, atribuindo valores para cada um dos eventos: nódulos na cauda (+1); nódulos em uma ou nas duas orelhas (+1 ou +2, respectivamente); edema em uma ou ambas as patas anteriores (+1 ou +2, respectivamente). Assim, a gravidade das lesões secundárias foi graduada de 0 a 5, com o valor zero indicando ausência de lesões. O número total de leucócitos articulares foi determinado em câmara de Neubauer e o número de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares foi avaliado em lâminas coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa. Os resultados foram analisados utilizando teste T de *Student* não pareado com nível de significância de $P < 0.05$.

Resultados e Discussão

A resposta inflamatória induzida pelo ACF já se mostrou intensa 24 h após a indução da AIA, com um aumento gradativo do volume da pata injetada até o 28º dia. A partir do 10º dia ocorreu um aumento do volume da pata contralateral não injetada, progredindo até o 28º dia (Figura 1). O desenvolvimento da resposta inflamatória nas patas (edema) foi similar nos ratos artríticos machos e fêmeas. Da mesma maneira, a gravidade das lesões secundárias, o número de leucócitos recrutados no líquido sinovial das articulações inflamadas não foram diferentes quando comparados os animais artríticos machos e fêmeas. A alteração de peso corporal, de ambos grupos de animais artríticos, machos e fêmeas, no decorrer do período experimental, foi de mesma magnitude.

A etiologia e o desenvolvimento da AIA são complexos, envolvendo diferentes tipos celulares e mediadores inflamatórios. As células articulares locais (sinoviócitos, macrófagos, fibroblastos, condrócitos) e as células de defesa recrutadas (leucócitos) produzem e liberam mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, entre outras), metabólitos do ácido araquidônico, espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio e enzimas proteolíticas, como as metaloproteínases (MMPs).

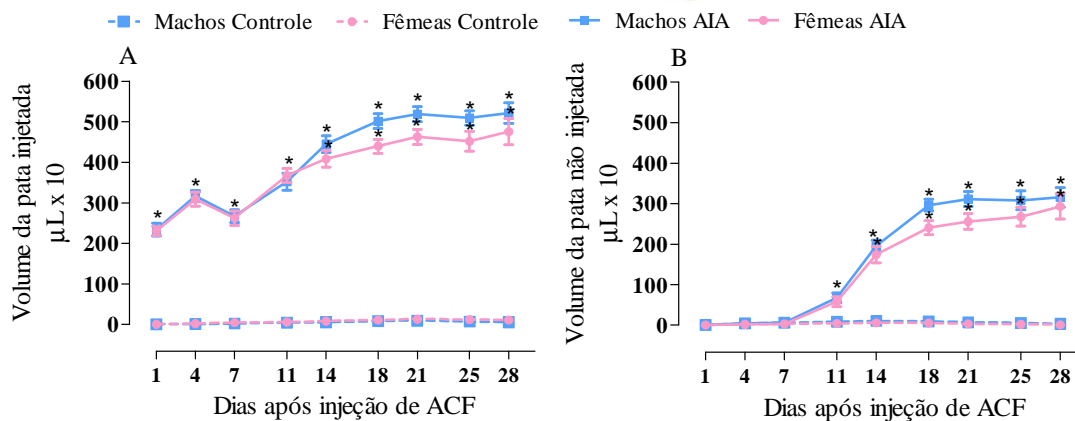


Figura 1. Desenvolvimento da resposta inflamatória na pata esquerda injetada (A) e direita não injetada (B), nos dias 1, 4, 7, 11, 18, 24 e 28, após a indução da artrite pelo ACF, em ratos machos e fêmeas. Os valores estão expressos como média \pm EPM dos animais de cada grupo experimental. * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo Controle (normal).

Todas estas enzimas e estes mediadores participam do desenvolvimento e progressão da artrite estimulando intensa migração de leucócitos para o local lesado, provocando inflamação articular, manifestações sistêmicas, e dano tecidual (VAN EDEN; WAKSMAN, 2003; STOLINA et al., 2009; XIE et al., 2013). Neste trabalho nosso objetivo foi investigar os sinais clínicos da AIA, no entanto, a avaliação histopatológica e a determinação da concentração de mediadores inflamatórios que são produzidos e liberados na AIA também são muito importantes e precisam ser avaliados em trabalhos futuros. Alguns autores relatam que pode ocorrer diferença no desenvolvimento da resposta inflamatória quando comparado ratos machos e fêmeas em outros modelos experimentais. Lazzaretti et al. (2010), utilizando um modelo de inflamação pulmonar aguda encontraram diferença no número de leucócitos no exsudato pleural quando comparados ratos machos e fêmeas. Dimitrijević et al. (2020), demonstraram diferença na susceptibilidade à artrite induzida por colágeno tipo II (CII), quando comparados ratos machos e fêmeas, observando maior predominância em fêmeas. No conjunto, nossos resultados mostraram evidências que as manifestações clínicas da AIA, tanto na fase inicial como na fase crônica da sua progressão não foi diferente quando comparamos ratos machos e fêmeas neste modelo experimental.

Conclusão

Em conclusão, este estudo demonstrou que o desenvolvimento da artrite induzida pelo adjuvante completo de Freund em ratos machos e fêmeas foi similar, sob todos os parâmetros clínicos avaliados (edema de pata, gravidade das lesões secundárias, número de leucócitos recrutados no líquido sinovial da articulação inflamada, e alteração de peso corporal).

Agradecimentos

Agradecemos os colegas e os técnicos do Laboratório de Inflamação da UEM pelo apoio, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a UEM pelo suporte financeiro.

Referências

DIMITRIJEVIĆ, M.; ARSENOVIĆ-RANIN, N.; KOSEC, D.; BUFAN, B.; NACKA-ALEKSIĆ, M.; PILIPOVIĆ, I.; LEPOSAVIĆ, G. Sex differences in Tfh cell help to B cells contribute to sexual dimorphism in severity of rat collagen-induced arthritis. **Scientific Reports**, v. 10, 1214, 2020.

LAZZARETTI, C.; ANTUNES, M. V.; SILVA, C. C.; BORSOI, M.; ARDENGHI, P. G.; SUYENAGA, E. S.; GAMARO, G. D. Comparação da Resposta Inflamatória Aguda entre Animais Machos e Fêmeas da Linhagem Wistar. **Estudos**, v. 37, p. 329-349, 2010.

STOLINA, M.; BOLON, B.; SCOT, M.; DWYER, D.; BROWN, H.; DURYEA, D.; ZHU, L.; ROHNER, A.; PRETORIUS, J.; KOSTENUK, P.; FEIGE, U.; ZACK, D. The evolving systemic and local biomarker milieu at different stages of disease progression in rat adjuvant-induced arthritis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 29, n. 2, p. 158-174, 2009.

VAN EDEN, W.; WAKSMAN B. H. Immune regulation in adjuvant-induced arthritis: Possible implications for innovative therapeutic strategies in arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 48, n. 7, p. 1788-1796, 2003.

XIE, C.; MA, L.; LIU, J.; LI, X.; PEI, H.; XIANG, M.; CHEN, L. SKLB023 blocks joint inflammation and cartilage destruction in arthritis models via suppression of nuclear factor-kappa B activation in macrophage. **PloS one**, v. 8, n. 2, e56349, 2013.