

**Curso: Medicina**

**Equipe:**

Professor Coordenador/Orientador: ANA JANAINA JEANINE M. DE LEMOS

Professor Pesquisador: Sandra Rejane Cabral Batista

**Alunos:** Ana Carolina Barreto Alves  
Francisco Lucas de Sousa  
Hildegard Naara Alves Furtado da Costa  
Pollyana Alves Rocha  
Tainara Sampaio Reis  
Waldilene Rodrigues Ferreira

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM JOELHOS  
OSTEOARTRÓSICOS DE RATOS WISTAR TRATADOS COM MELATONINA E  
RANELATO DE ESTRÔNCIO**

**Relatório de Pesquisa**

**Campina Grande  
2014**

**ANA JANAINA JEANINE MARTINS DE LEMOS**

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM JOELHOS OSTEOARTRÓSICOS DE  
RATOS WISTAR TRATADOS COM MELATONINA E RANELATO DE ESTRÔNCIO**

Relatório de pesquisa apresentado ao Núcleo de Pesquisa e de Extensão (Nupex) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (Cesed) de acordo com o que preconiza o regulamento.

**Campina Grande**

**2014**

## **AGRADECIMENTOS**

São sinceros meus agradecimentos, inicialmente a Faculdade Ciências Médicas pelo apoio estrutural, organizacional e financeiro o qual possibilitou a utilização de animais experimentais e realização do trabalho planejado de forma satisfatória e gratificante.

Agradeço também ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, na pessoa de Anne Gabrielle Oliveira; à Universidade Federal Rural de Pernambuco, na pessoa de Hilda Michelle Paiva dos Santos e à Universidade Federal de Campina Grande e ao Biotério da Faculdade de Ciências Médicas, na pessoa de Tharcia Kiara Beserra de Oliveira, sem a cooperação destas pesquisadoras e seus colaboradores e técnicos, nenhum destes protocolos metodológicos seriam realizados.

Desta maneira, e ciente de toda sua importância, agradeço à todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização desta excelente pesquisa.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	5
FUNDAMENRAÇÃO TEÓRICA.....	8
METODOLOGIA.....	13
APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	17
CONCLUSÕES.....	22
REFERÊNCIAS.....	25

## RESUMO

A osteoartrose (OA) é uma das principais causas de dor e incapacidade funcional gerando enorme carga econômica para a comunidade, devido ao alto número de dispensas no trabalho. Atualmente novos fármacos tem sido analisados para possibilidade de intensificação da reabilitação a curto prazo e benefícios sem efeitos colaterais, porém algumas destas drogas, como a melatonina e o ranelato de estrôncio são pouco estudados, e não foram encontrados relatos da associação farmacológica destas drogas para o tratamento da osteoartrose, desta forma, levantou-se a hipótese de que a administração terapêutica conjugada poderia prevenir o avanço da doença e proteger possíveis avanços da patologia. Para tanto foram utilizados 30 ratos machos induzidos à osteoartrose através da transecção do ligamento cruzado anterior, e posteriormente os animais foram tratados pelos fármacos supracitados para acompanhamento comparativo, e análise morfológica, histopatológica, histoquímica e morfométrica da estrutura articular destes animais. Observaram-se nos parâmetros estudados que houve o início da implantação de osteoartrose nos ratos, porém de forma leve, e que a associação dos fármacos possui farmacocinética condroprotetora, inclusive não acarretando efeitos colaterais dos níveis bioquímicos plasmáticos. Conseqüentemente há fortes indícios de que a associação da melatonina com o ranelato de estrôncio é uma grande conquista que deve ser melhor explorada para alcançarem-se melhores padrões analíticos. Contudo, pôde-se concluir que a administração dos fármacos melatonina e ranelato de estrôncio em associação ou não, apresentaram efeito condroprotetor e preveniram o agravamento dos danos articulares. Porém tais danos foram muito sutis, não padronizando de maneira fundamentada os benefícios da interação medicamentosa.

## INTRODUÇÃO

A osteoartrose (osteoartrite, artrite ou artrose, OA) do joelho é uma doença de caráter inflamatório e degenerativo que provoca a destruição da cartilagem articular e leva a uma deformidade da articulação. A etiologia do processo degenerativo é complexa e inicia-se geralmente com o envelhecimento (REZENDE et al., 2000). Apresenta-se como resultado da interação de várias causas e modelos clínicos e não como entidade nosológica isolada (VAD et al., 2002). A OA é uma das principais causas de dor e incapacidade funcional gerando enorme carga econômica para a comunidade, tanto em gastos médicos como sociais, sendo grande causa de afastamento do trabalho (NOVAES, 2000). Além da dor, há diminuição importante da amplitude de movimento (ADM) e da força muscular, que acarreta limitação funcional interferindo nas atividades de vida diária (AVD's) (MARQUES et al., 1998). Uma vez lesionada, a cartilagem articular tem uma habilidade limitada para o reparo e este é o maior fator limitante no sucesso da reabilitação depois de uma injúria articular (LITTLE et al., 1997).

O tratamento clínico da OA está sempre indicado e baseia-se no autocuidado feito pelo paciente e orientado pelo médico. O uso de medicamentos é complementar às medidas de emagrecimento, ganho de força, de propriocepção, de flexibilidade e de amplitude de movimento. Entre os medicamentos disponíveis para seu tratamento, há os que são essencialmente analgésicos e que não interferem no curso da doença; bem como os anti-inflamatórios, controversos por seus efeitos colaterais e pelo seu papel na doença, porém, com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias indiscutíveis; e, por fim, as drogas modificadoras de estrutura, que retardam a evolução da patologia. As medicações ainda podem ser de uso tópico, intra-articular, oral e injetável (sistêmico). As várias apresentações de ácido hialurônico (AH) mostram o poder analgésico da droga e há indícios de poder modificador de estrutura da cartilagem pela medicação. Há nível de evidência IA, para diacereína e para a glucosamina, de que retardam a evolução da OA (REZENDE, 2009). Recentes artigos têm abordado o ranelato de estrôncio como

excelente opção para este tratamento. O ranelato de estrôncio é atualmente indicado para controle da osteoporose pós-menopausa, no entanto estudos recentes implicam sua ação na cartilagem articular e no osso subcondral, com provável utilidade no tratamento da OA. A utilização desta droga reduziu a quantidade de biomarcadores de colágeno tipo II (CTX II) identificado pela diminuição na urina, o que significa que diminui a degeneração, além de ser conhecida por reduzir a reabsorção óssea, ao mesmo tempo que o aumenta a formação óssea, melhorando assim a arquitetura deste sistema. Este efeito ocorre devido à diminuição da diferenciação bem como o aumento da apoptose pelos osteoclastos. Este modo de ação foi demonstrado em estudos experimentais sobre as células ósseas e estudos farmacológicos em animais e em estudos clínicos (ALEXANDERSEN, et al, 2011; BONNELYE et al., 2008; MENTAVERRI et al. 2004; TAKAHASHI et al., 2003).

Outra droga que vem sendo utilizada e tem mostrado bons resultados no tratamento da osteoartrose é a melatonina. Segundo Armijo et al. (2013), níveis baixos da melatonina na menopausa poderiam ser um importante fator no desenvolvimento e na manutenção da osteoporose, visto que em ratas a sua reposição leva a um aumento da densidade mineral óssea e da espessura da cartilagem articular, relacionado ao aumento da incidência de osteoartrite. A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal, o qual possui seu pico de liberação a noite pelos mamíferos. Seus efeitos antioxidantes podem ser analisados em vertentes diversas, como a redução das reações específicas de oxigênio e nitrogênio, efeitos antiexcitatórios e anti-inflamatórios, além do estímulo a atividade de enzimas antioxidantes e redução da ação de enzimas pró-oxidantes (JIMÉNEZ-ORTEGA et al., 2009). Este fármaco tem sido muito utilizado na sua forma isolada ou associado a outras drogas, inclusive para tratamento de tumores, cânceres mamários e de pele, e vem apresentando resultados promissores (ANISIMOV et al., 2010; MAN'CHEVA et al. 2011), porém não foram encontrados relatos na literatura que mencionem a administração associada de tais fármacos para o tratamento da osteoartrite, sendo necessário maior atenção a essa possibilidade inovadora.

## **JUSTIFICATIVA**

A OA é uma das principais causas de dor e incapacidade funcional gerando enorme carga econômica para a comunidade, tanto em gastos médicos como sociais, principalmente por comprometer a mobilidade dos indivíduos com tal moléstia. Recentemente artigos trazem importantes descobertas quanto aos efeitos do ranelato de estrôncio e da melatonina na reconstituição óssea e na regeneração das articulações, porém não existem relatos da associação destas drogas, as quais podem ser produzidas em larga escala, garantindo a redução de custos e conseqüentemente possibilitando o acesso da população para o tratamento de doenças. Desta forma é fundamental que pesquisas sejam aplicadas para esclarecer sobre os efeitos destes fármacos quando aplicados associadamente e seus benefícios na redução da dor, e recuperação articular.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Analisar comparativamente a ação condroprotetora dos fármacos ranelato de estrôncio e melatonina em joelhos de ratos wistar com osteoartrose induzida.

### **Objetivos específicos**

- Analisar morfológica e histopatologicamente o tecido articular de ratos após o tratamento com ranelato de estrôncio, melatonina e compará-los ao efeito obtido pela associação das drogas;
- Identificar os possíveis efeitos benéficos preventivos contra evolução patológica da osteoartrose pela associação dos fármacos;
- Estudar morfometricamente a variação microscópica da farmacocinética medicamentosa associada;
- Observar histoquimicamente as características de impregnação pelo cálcio.

## FUNDAMENRAÇÃO TEÓRICA

### OSTEOARTRITE

A osteoartrite (doença articular degenerativa, artrose ou osteoartrose, OA) é a doença reumática mais prevalente entre indivíduos com mais de 65 anos de idade. Estudos americanos apontam que mais de 50 milhões de pessoas apresentam hoje esta enfermidade (COIMBRA, 2004). Esta doença afeta 5,2% da população brasileira, o que corresponde a 9,9 milhões de brasileiros, costumando aparecer em pacientes acima dos 40 anos de idade, mais frequentemente na população acima dos 60 anos (COIMBRA, 2012).

É uma das causas mais freqüentes de dor do sistema músculo-esquelético e de incapacidade para o trabalho. Acomete as articulações por insuficiência de restauração e renovação da cartilagem, ocasionada por um desequilíbrio entre a formação e a destruição dos seus principais elementos, associada a uma variedade de condições como: sobrecarga mecânica, alterações bioquímicas da cartilagem e membrana sinovial e fatores genéticos. É uma doença crônica, multifatorial, que leva a uma incapacidade funcional progressiva. O tratamento deve ser também multidisciplinar, e buscar a melhora funcional, mecânica e clínica (COIMBRA, 2004).

Estudos de mediadores pró-inflamatórios encontrados na articulação osteoartrósica apoiam o paradigma de que, embora a OA possa ser em grande parte uma doença biomecânica, suas manifestações ao nível dos tecidos são mediadas pela atividade de fatores inflamatórios. Além disso, a OA pós-traumática é um exemplo de uma forma da patologia onde tanto a inflamação aguda induzida por lesão articular e biomecânica anormal resultante de instabilidade articular parecem trabalhar em conjunto para promover a destruição comum do tecido. Lesão do menisco, por si só, ou em combinação com ruptura do ligamento cruzado anterior (LCA), é um importante fator de risco para OA do joelho. Um estudo de tecido meniscal removido durante meniscectomia parcial em pacientes com lesão do menisco, com ou sem um ruptura concomitante do LCA, forneceu evidências de que o menisco lesionado pode ser uma fonte de mediadores inflamatórios na articulação (BROPHY, 2012). Numerosas citocinas, quimiocinas, e proteinases degradantes de

matriz foram consideradas expressas em amostras de menisco, incluindo IL-1 $\alpha$  e  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL3, CXCL1, CXCL3, ADAMTS-4 e -5, MMP-1, MMP-9 e MMP-13 (LOESER, 2013).

Atualmente, não há consenso a respeito do tratamento ideal da osteoartrose. Vários métodos de tratamento têm sido usados visando à melhoria da dor e do padrão funcional dos pacientes. Dentre esses métodos destacam-se os farmacológicos, os não farmacológicos (fisioterapia, terapia ocupacional, perda ponderal e exercícios), os agentes físicos, os de terapia alternativa (homeopatia, acupuntura e medicamentos fitoterápicos) e os cirúrgicos (LOPES JUNIOR, 2013; BIJLSMA, 2011; ZHANG, 2010).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são considerados por muitos autores os medicamentos de primeira escolha para o tratamento medicamentoso da OA. (TOWHEED, 2002; TOWHEED, 1997) O uso dos AINES tem se mostrado eficaz no alívio da dor e na melhora da função em pacientes com osteoartrose. Entretanto, devemos considerar que os AINES são medicações sintomáticas que não estão associadas com a modificação da história natural da OA. Ainda, a principal limitação do uso crônico dos AINES é decorrente dos potenciais efeitos adversos ao sistema gastrointestinal e cardiovascular encontrados principalmente em pacientes idosos (GARNER, 2002).

Outros fármacos utilizados incluem analgésicos, corticosteroides intra-articulares ou ácido hialurônico, sulfato de glicosamina, sulfato de condroitina ou alguns tratamentos experimentais, nenhum dos quais registrado como modificador da estrutura (REGINSTER, 2013).

## **MELATONINA**

A melatonina, N-acetil-5-hidroxitriptamina, um hormônio produzido pela glândula pineal, tem seu pico no sangue durante a fase escura, e tem como principais funções fisiológicas informar sobre os ciclos circadianos organismo, além de controlar a função reprodutiva em mamíferos com ciclos reprodutivos sazonais e não sazonais (ANISIMOV, 2003; BERGER, 2008; TEIXEIRA, et al., 2004).

Além dessas funções já bem estabelecidas, alguns autores têm relacionado a melatonina a propriedades antioxidantes, ao crescimento fisiológico e ao processo inflamatório, assim como à maturação e remodelação dos tecidos de sustentação, uma vez que há um aumento da expressão nos níveis de mRNA de vários genes expressos nos osteoblastos, que incluem a fosfatase alcalina, a osteopontina e a osteocalcina (ROTH, 1999; CUTANDO, 2011).

A melatonina é derivada do aminoácido triptofano. Sua síntese decorre da transformação do triptofano em serotonina, por intermédio da hidroxilação, pela enzima triptofano hidroxilase (TH), e da descarboxilação, pela 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5HTDP). Em seguida, a serotonina é convertida em N-acetilserotonina, pela N-acetiltransferase (NAT), a qual cataliza a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA. A serotonina é convertida em melatonina pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT). O fator limitante na pineal é a enzima TH. A enzima HIOMT é o fator limitante na produção de melatonina (MACCHI, 2004; TAMURA, 2009).

Sabe-se que o estresse oxidativo pode levar a uma alteração fenotípica do condrócito, o que faz com que esse perca a sua capacidade de resposta efetora. Sabe-se, também, que produtos dessa peroxidação, com os resíduos de tirosina, são observados no tecido cartilaginoso em doenças relacionadas à degradação articular (SCOTT, 2010). Os condrócitos expressam NADPH oxidase e óxido nítrico (NO), cujos produtos são espécies reativas de oxigênio (ROS) e ânions superóxido ( $O_2^{-2}$ ) (SCOTT, 2010). As espécies reativas de oxigênio regulam a atividade dos condrócitos, sua ativação celular e a proliferação e remodelação da matriz (GRISHKO, 2009).

As superoxidodismutases (SOD) têm como papel principal a regulação das funções do ROS. Tem três isoformas: SOD1 ou Cu/Zn-SOD presente no citosol; SOD2 ou Mn-SOD presente na mitocôndria; e SOD3 presente na superfície celular (SCOTT, 2010). Durante o processo de degradação cartilaginosa, a SOD2 é down-regulada e a SOD3 diminui seus níveis séricos. A depleção da SOD2 nos condrócitos pode levar ao aumento de  $H_2O_2$ , o que resulta na instabilidade telomérica e na down-regulação da função dos condrócitos, assim como no dano de macromoléculas, tais como o ácido hialurônico e o colágeno (SCOTT, 2010). A

melatonina surge como um mediador fundamental, uma vez que provoca up-regulação dos genes da SOD1, SOD2, catalase e da glutathione peroxidase (GPx). Aumenta ainda a expressão de marcadores condrogênicos, como o do colágeno II, do Sox 9 e do agregam. Assim, leva à diminuição da expressão do colágeno X, o que mostra que a melatonina aumenta a diferenciação condrogênica, embora retarde a osteogênica. Do que foi exposto sugere-se que a melatonina aumenta a síntese de matriz cartilaginosa (PEI, 2009; FISCHER, 2008).

Estudo realizado na Coreia mostrou resultados condroprotetores da melatonina usando modelo animal de OA em coelhos, no qual um dos grupos recebeu 20 mg/kg da droga (LIM, 2012), cujas concentrações para o tratamento foram baseadas em estudos prévios de modelos animais (JUNG, 2004; GERBER, 2005; LIU, 2008). Injeções semanais começaram no dia da operação de indução da OA e continuaram até totalizarem o número de quatro. Foi demonstrado que a administração intra-articular de melatonina reduziu a entensão e severidade da degradação da cartilagem na OA experimentalmente induzida (LIM, 2012).

## **RANELATO DE ESTRÔNCIO**

O ranelato de estrôncio (RE) é um elemento com afinidade por cálcio. Parece ter efeito duplo no metabolismo ósseo, aumentando a formação e reduzindo a reabsorção. É composto por 2 átomos de estrôncio estável e uma molécula de ácido ranélico (NICE, 2011). O FDA refere aprovação em alguns países da Europa, com redução do risco de fraturas vertebrais e não vertebrais, porém com mecanismo de ação ainda obscuro, possivelmente com incorporação do estrôncio na estrutura cristalina, substituindo o cálcio, como parte de seu mecanismo de ação (FOUNDATION, 2010).

A ANVISA prevê seu uso para o tratamento da osteoporose da pós-menopausa para reduzir o risco de fratura vertebral e de quadril, com dose de 2g por dia através de via oral (VO), com duração total de 5 anos de terapia (SAÚDE, 2013).

Estudos pré-clínicos in vitro indicam que o mesmo inibe a reabsorção de osso subcondral (TAT, 2011) e estimula a formação de matriz cartilaginosa nos condrocitos normais e osteoatrósicos (HENROTIN, 2001; GULHAN, 2008). Análises

exploratórias sugerem que tratamento de 3 anos com ranelato de estrôncio atenua a progressão radiológica da osteoartrite espinhal e melhora a dor nas costas (BRUYERE, 2008).

Nesse sentido, um ensaio clínico duplo-cego randomizado e placebo-controlado com essa duração foi realizado com 1371 pacientes, resultando em menor degradação do espaço articular e progressão radiológica, redução no escore Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC), subscore de dor, função fisiológica e dor no joelho, concluindo que o tratamento com o RE de 1 g/dia e 2 g/dia estavam associados com um efeito significativo na estrutura dos joelhos osteoartrósicos dos pacientes. Adicionalmente a essa atividade de modificação da estrutura, houve melhora dos sintomas com a dose de 2 g/dia (REGINSTER, 2013).

Em modelo animal de OA, cachorros foram submetidos à secção do ligamento cruzado anterior e, quatro semanas depois da cirurgia, iniciou-se tratamento oral com RE de 25, 50 ou 75 mg/kg por dia, ou placebo, por 12 semanas. Houve redução significativa das lesões da OA sobre a cartilagem para todas as doses testadas, bem como significativa melhor preservação da rede de colágeno para aqueles tratados com 50 e 75 mg/kg por dia e redução do espessamento do osso subcondral visto nos placebos para a dose de 50 mg/kg por dia. Além disso, houve redução significativa dos níveis de expressão dos genes MMP-1, MMP-13 e Catepsina K para a dose de 75 mg/kg por dia, como de IL-1 $\beta$  na sinóvia para 50 e 70 mg/kg por dia e MMP-3 para todas as doses testadas. O nível de CTX-II também estava reduzido em 16 semanas de tratamento para os cachorros que utilizavam 50 e 70 mg/kg por dia (PELLETIER, 2013).

## **METODOLOGIA**

### **Descrição**

Trata-se de uma pesquisa experimental do tipo caso-controle, a qual foi submetida ao Comitê de ética e utilização de animais (CEUA) desta instituição. Após permissão pela CEUA/FCM os animais foram analisados histopatologicamente, histoquimicamente e morfometricamente para análise da eficiência de fármacos associados no tratamento da osteoartrose. Os procedimentos experimentais para indução à osteoartrose, tratamentos farmacológicos e eutanásia foram realizados nas estruturas físicas da Faculdade de Ciências Médicas-FCM/CESED. Os demais procedimentos para análise histológica, histoquímica, morfométrica e análise de dados foram realizados na Universidade Federal Rural de Pernambuco em parceria com o Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. As análises plasmáticas foram quantificadas em laboratório de análises veterinárias específicas para o fim de hemograma e identificações bioquímicas.

### **Animais e grupos experimentais**

Os ratos wistar foram obtidos do biotério do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED), mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) ligada à instituição de ensino. Foram utilizados ratos machos adultos, com idade variando entre 09 e 12 semanas de idade, com peso entre 250 a 320g, os quais foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* e temperatura regulada a  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os animais foram acompanhados durante todo o experimento para identificação de alterações tissulares ou presença de edemas nas articulações, e foram pesados diariamente. Foram utilizados 30 animais divididos aleatoriamente em cinco grupos com seis animais cada, sendo 3 machos por gaiola, dispostos da seguinte forma:

Grupo I – controle- sem indução à osteoartrose;

Grupo II – placebo- com indução à osteoartrose e sem tratamentos farmacológicos;

Grupo III – animais tratados com Ranelato de estrôncio após a indução à osteoartrose;

Grupo IV – animais tratados com melatonina após a indução à osteoartrose;

Grupo V – animais tratados com associação de ranelato de estrôncio e melatonina após a indução à osteoartrose.

### **Instrumentos e fontes escolhidas para coleta de dados**

#### *Indução à osteoartrose*

Obteve-se a indução à Osteoartrose mediante transecção do ligamento cruzado anterior de acordo com a metodologia modificada de Silva Júnior, (2007) e Stoop, et al., (2001). Da seguinte maneira: Os animais foram anestesiados com Hidrocloridrato de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (20 mg/kg), por via intramuscular. Após depilação e anti-sepsia da região, foi realizada uma incisão longitudinal na pele sobre o joelho direito. Foi feita então uma incisão parapatelar lateral, e o tendão patelar foi rebatido medialmente, dando acesso à cavidade articular. Uma vez visualizado o ligamento cruzado anterior, o mesmo foi cuidadosamente seccionado com uma tesoura microcirúrgica, evitando-se ao máximo lesionar outras estruturas articulares. O livre movimento do fêmur em relação à tíbia no sentido pósterio-anterior (“sinal da gaveta”) confirma a secção do ligamento. O tendão patelar foi reposicionado, e a incisão suturada com fio absorvível (Vyctf 5/0). A pele foi suturada com Nylon® 4/0. Nos animais, as feridas cirúrgicas não apresentaram deiscência ou sinal de infecção.

### *Tratamento com ranelato de estrôncio*

O ranelato de estrôncio foi administrado seguindo-se a metodologia adaptada de Palletier et al. (2013), na dosagem de 50mg/Kg, via oral, durante 10 dias. O início do tratamento foi realizado após sete dias de indução à osteoartrose de acordo com o peso aferido diariamente.

### *Tratamento com melatonina*

A melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi administrada após a indução à SOP, na dose de 200 µg/100g de peso corporal do animal, por meio de injeções subcutâneas no início da noite (18:00). A melatonina foi dissolvida em um volume de etanol (0,02mL) e diluída em 0,2mL de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl) nos ratos do grupo III e do grupo V, de acordo com a metodologia proposta por Prata-Lima et al. (2004).

## **Estabelecer os procedimentos e instrumentos de análise e interpretação de Dados.**

*Coleta de sangue para análise plasmática de fosfatase alcalina, cálcio e carboidratos totais.*

Em cada grupo foi realizado uma coleta de sangue antes da eutanásia. Sendo esta executada após contenção mecânica em tubo de pvc, e em cada animal foi retirado 1 mL de sangue por meio da punção na veia caudal lateral com uso de cateter (24G). O sangue obtido foi acondicionado em microtubos com anticoagulante (heparina sódica - 20 µL), homogeneizado com delicadeza e mantido à temperatura ambiente. Para subsequente obtenção do plasma as amostras foram submetidas à centrifugação a uma temperatura de -4°C com a velocidade de 3.000rpm durante 10 minutos. O plasma obtido foi acondicionado à temperatura de -20°C, para posterior dosagem de cálcio e fosfatase alcalina.

*Análise morfológica das articulações, histopatológica, histoquímica e morfométrica do tecido cartilaginoso e ósseo*

Ao décimo dia de tratamento farmacológico, no dia seguinte os animais de todos os grupos experimentais foram eutanasiados e as articulações foram observadas macroscopicamente. Para isso, os ratos foram anestesiados com Hidrocloridrato de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (20 mg/kg), por via intramuscular. A seguir, foi realizada a dissecação e coleta do fêmur de cada animal, os quais foram fixados em formol tamponado a 10%, durante 48 horas. Após a fixação o osso foi processado de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em parafina, e corados pela hematoxilina - eosina (H. E.), Von Kossa (detecção de Cálcio) e analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50. Os dados foram analisados a partir de observação direta das lâminas à microscopia óptica, comparando-se a morfologia óssea e através da análise de imagens capturadas por meio da câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50. Para quantificação das alterações em pixels do material corado pelo Von Kossa, foi utilizado o Gimp2.6 software (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms) e os resultados contabilizados foram submetidos ao teste estatístico e produção de um gráfico comparativo entre os grupos. Para as medidas do espaço entre as articulações, espaço da cartilagem articular e estruturas associadas entre os grupos, foi aplicado o mesmo programa supracitado e utilizado a ferramenta de medidas convertidas em  $\mu\text{m}$ , e os dados mensurados também foram submetidos ao mesmo teste estatístico.

*Análises estatísticas*

A análise estatística das variáveis deu-se através da aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95 % de significância.

## APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

A indução a osteoartrose foi confirmada pelo livre movimento do fêmur em relação à tíbia no sentido pósterio-anterior pela secção do ligamento. Ao decorrer do procedimento experimental, não foi percebido formação de edema, ou infecção ou mesmo debilitação pelos animais, a não ser pela pouca mobilidade do membro, devido a incisão cirúrgica, que foi objetivo da metodologia deste projeto.

Os aspectos clínicos e comportamentais dos animais não foram alterados após a indução a osteoartrose, ou durante o tratamento preventivo. Os ratos mantiveram-se saudáveis e alimentando-se normalmente, apesar da mudança de motilidade do membro posterior. Tais evidências podem ser observadas na tabela 1 deste trabalho, quando é observado que não houve variação de peso dos animais e assim, a medida não representou diferenças estatisticamente significativas. Na mesma tabela é possível identificar os dados de referência de cada grupo experimental, quantificados pela análise plasmática, os seguintes parâmetros: Ácido úrico, Colesterol total (Colesterol), Creatinina (Creat), Glicose (Glic), Transaminase glutâmica oxalacética (TGO), Transaminase glutâmica pirúvica (TGP), Triglicerídeos, Uréia, Lipoproteína de alta densidade (HDL); Lipoproteína de baixa densidade (LDL); Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e peso médio (Peso M) dos ratos dos grupos experimentais após o tratamento. Ao serem observados tais parâmetros, não se vê diferença significativa entre si, quando comparadas pelo teste estatístico (Tabela 1).

Níveis da Tabela1 :Níveis plasmáticos de Ácido úrico, Colesterol total (Colesterol), Creatinina (Creat), Glicose (Glic), Transaminase glutâmica oxalacética (TGO), Transaminase glutâmica pirúvica (TGP), Triglicerídeos, Uréia, Lipoproteína de alta densidade (HDL); Lipoproteína de baixa densidade (LDL); Lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e peso médio (PesoM) dos ratos dos grupos experimentais após o tratamento.

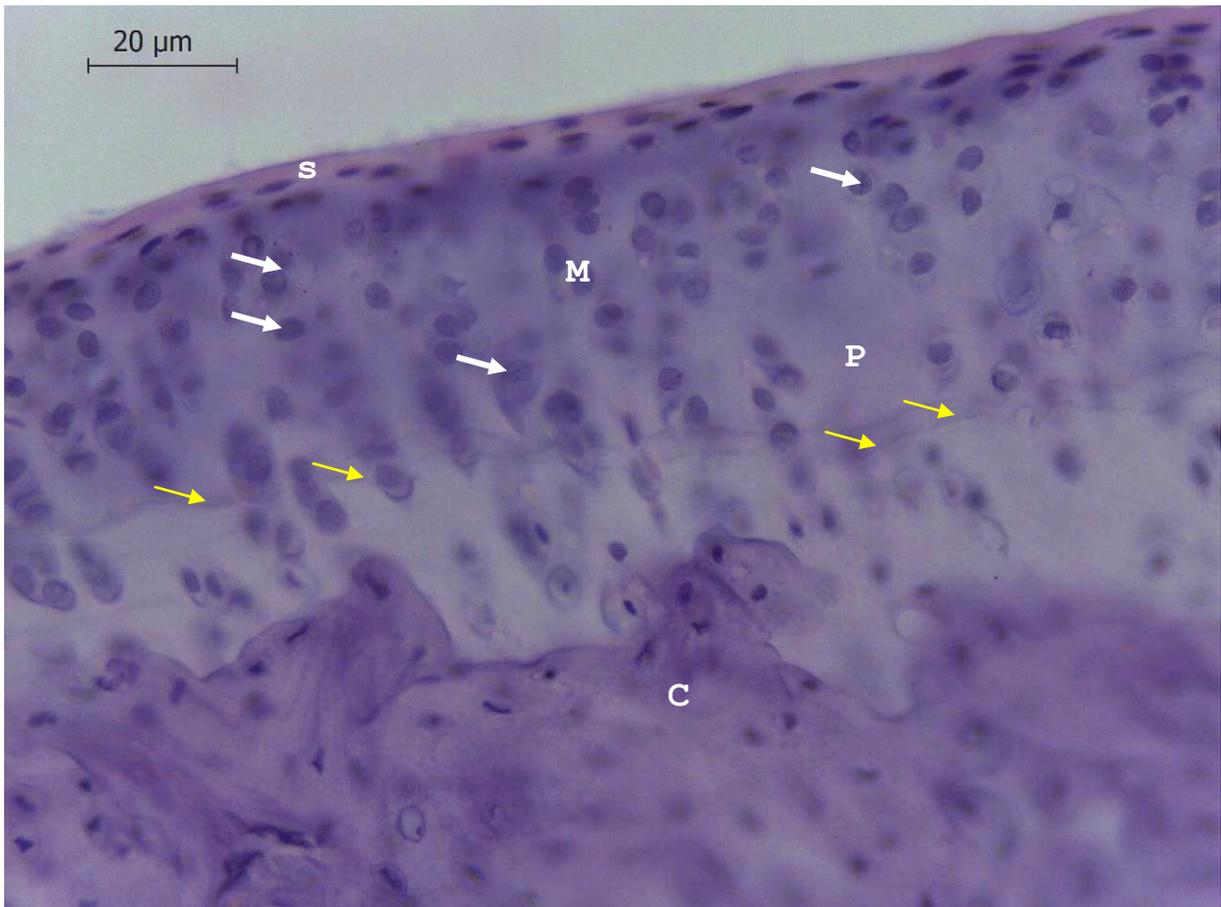
**Tabela 1** Dados das análises plasmáticas dos grupos experimentais

	<b>G I</b>	<b>G II</b>	<b>G III</b>	<b>G IV</b>	<b>G V</b>	<b>FP</b>
<b>Ác.U (mg/dL)</b>	1,08±0,1a	1,09±0,1a	1,36±0,4a	0,91±0,1a	1,17±0,2a	1,2797 <sup>0,3111</sup>
<b>CT (mg/dL)</b>	36±1,2a	33,8±1,5a	34±3,6a	38,6±2,4a	37,4±1,9a	2,1178 <sup>0,1163</sup>
<b>Creat (mg/dL)</b>	0,68±0,01a	0,71±0,08a	0,63±0,03a	0,56±0,1a	0,62±0,5a	1,9107 <sup>0,148</sup>
<b>Glic (mg/dL)</b>	123,2±3,9a	117,8±4,7a	120,4±12,2a	112,0±5,2a	111,8±13,7a	0,8155 <sup>0,5302</sup>
<b>TGO U/L</b>	97,4±23,8a	111,8±24,6a	127,6±29,2a	90,4±26,6a	121±28,8a	0,8358 <sup>0,5184</sup>
<b>TGP U/L</b>	62,6±4,5a	61,6±2,1a	67,8±6,2a	63,2±4,3a	64,0±6,8a	0,6929 <sup>0,656</sup>
<b>Trigl (mg/dL)</b>	52,6±2,5a	31,2±11,5a	48,6±15,6a	58,4±16,4a	43,8±16,6a	1,5719 <sup>0,2204</sup>
<b>Ureia (mg/dL)</b>	33,4±0,4a	31,6±3,0a	28,6±5,4a	36,2±10,3a	42,4±5,5a	1,8664 <sup>0,1559</sup>
<b>HDL (mg/dL)</b>	30,6±1,5a	30,2±3,0a	29,6±1,7a	33,4±2,5a	32,6±2,2a	1,4243 <sup>0,2624</sup>
<b>VLDL (mg/dL)</b>	10,52±0,5a	6,24±2,3a	9,72±3,1a	11,68±3,2a	8,76±3,3a	1,5719 <sup>0,2204</sup>
<b>LDL (mg/dL)</b>	15,3±2,1a	12,44±2,8a	14,92±4,0a	17,28±3,1a	14,76±2,9a	0,8199 <sup>0,5276</sup>
<b>Peso M (g)</b>	278.8±22a	290.76±17a	289.80±17a	226.86 12a	234.44 25a	0.4075 <sup>0.8011</sup>

*Médias seguidas pela mesma letra nos parâmetros analisados não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P>0,05)*

Morfologicamente o tecido ósseo, cartilagem articular e as células constituintes tissulares apresentaram-se bem preservados em todos os grupos experimentais. Microscopicamente foi observado preservação das camadas superficial, média, profunda e calcificada, constituintes da cartilagem articular e manutenção da basofilia da matriz cartilaginosa do fêmur dos ratos, identificados pela boa infiltração pelos corantes (Figura1, na página seguinte). Além disso, não foram observadas infiltrações linfocitárias, picnose, necrose, ou fibrilação em nenhuma das áreas do tecido estudado.

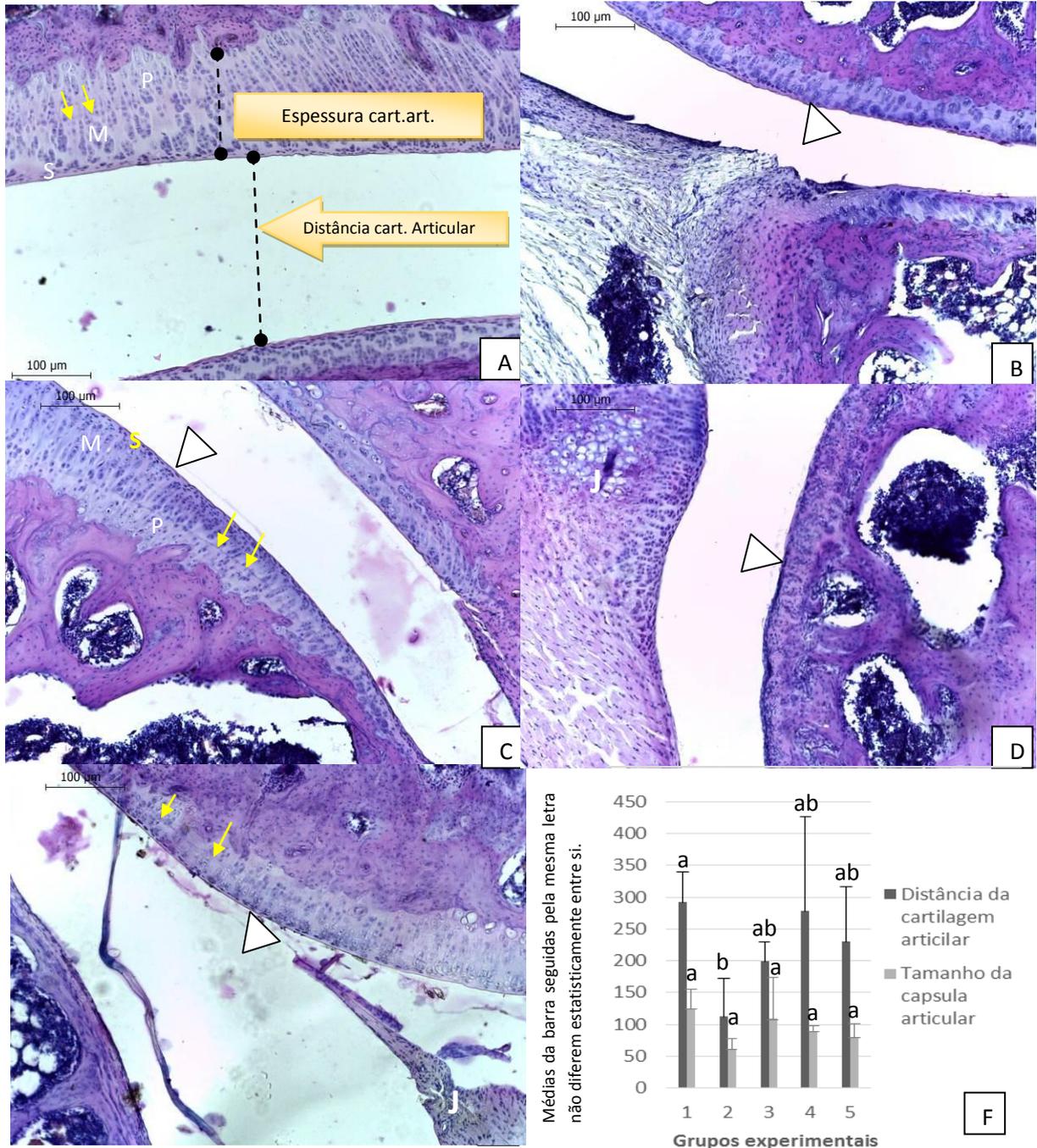
A análise morfométrica do tecido ósseo foi submetido a padronização e mensuração via software das imagens quanto as dimensões das cartilagens articulares permitiu identificar medidas semelhantes, não havendo estatisticamente nenhuma divergência entre os grupos. Já quando foram analisados os espaços entre as cartilagens articulares do fêmur à patela, foi possível identificar redução do espaço articular apenas no grupo induzido a osteoartrose, sem tratamento farmacológico, Grupo II, que recebeu apenas placebo, em comparação ao Grupo I – controle, não induzido a osteoartrose.



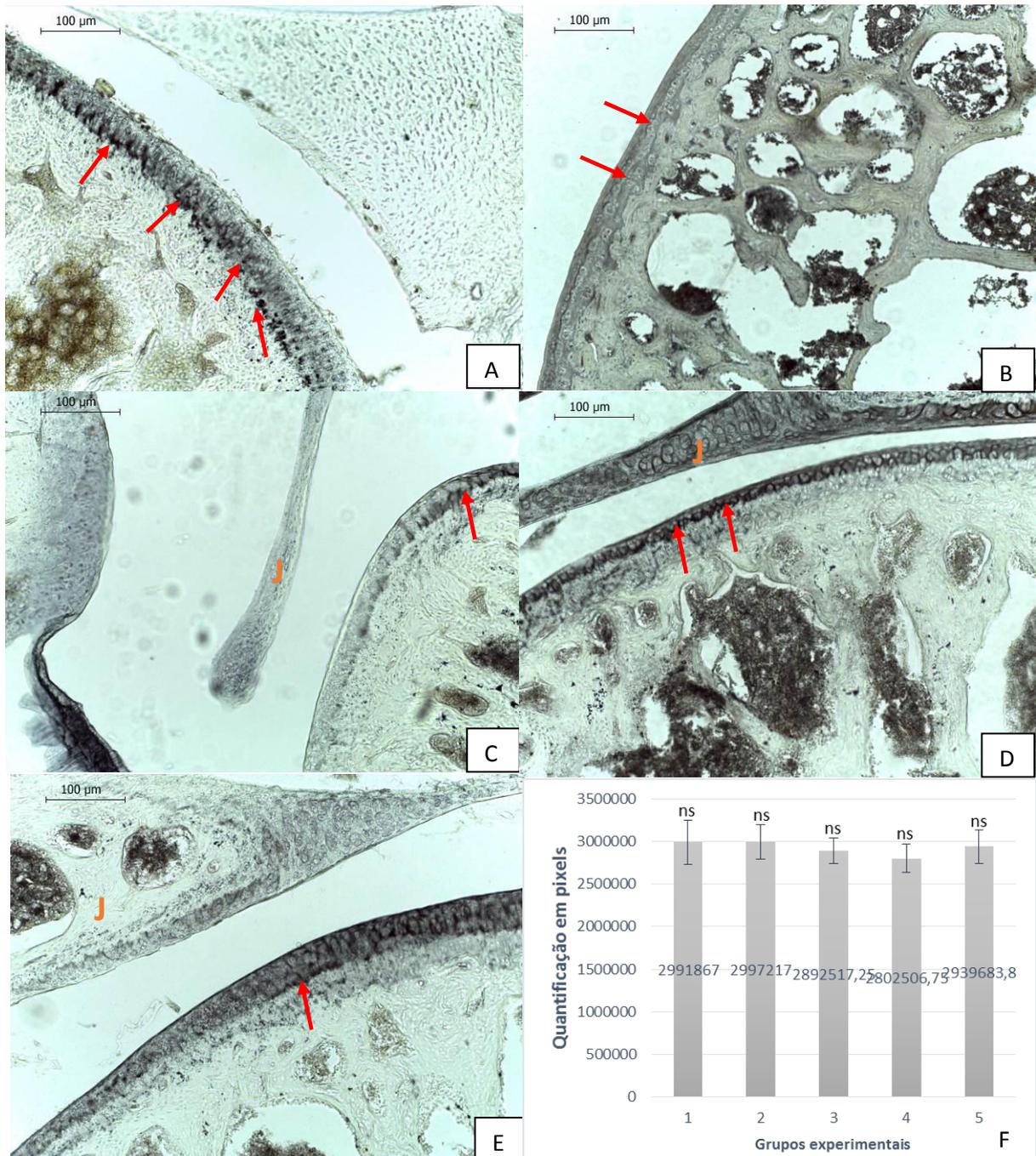
**Figura 1:** Imagem da cartilagem articular de rato do grupo 5. Induzido a osteoartrose e tratado com a associação dos fármacos melatonina e ranelato de estrôncio. Observar preservação do tecido, condrócitos (seta preta) em suas lacunas; zonas: superficial (S), média(M) e profunda(P) da cartilagem articular e zona calcificada(C); Depósito de fibras colágenas “TideMarck” (seta amarela). Coloração HE.

Os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si quando comparadas as médias de suas medidas em  $\mu\text{m}$ , quantificadas via software (Figura 2).

Histoquimicamente a coloração para detecção de depósito de íons cálcio apresentaram marcação positiva para todos os grupos experimentais. O material histológico processado foi submetido a análise e quantificado em pixels via software; Os valores identificados foram comparados pelo teste estatístico mostrando resultado não significativo para os valores mensurados, o que pode ser identificado na figura 3, apresentada adiante.



**Figura 2:** Espessura da cartilagem articular e distância entre a articulação e a cabeça do fêmur de ratos induzidos a osteoartrose. Coloração de rotina, (H.E.). A) Roto do grupo I, controle, B) Grupo II Induzido a osteoartrose e sem tratamentos farmacológicos, C) Grupo III Induzido a osteoartrose e tratado com melatonina, D) Induzido a osteoartrose e tratado com ranelato de estrôncio, E) Induzido a osteoartrose e tratado com associação dos fármacos. F) Gráfico com média e desvio padrão apresentando semelhança entre os dados estatisticamente. Ponta de seta(Δ) cabeça do fêmur- capsula articular.



**Figura 3** Imagens das estruturas ósseas da cabeça do fêmur e joelho de ratos de todos os grupos experimentais induzidos a osteoartrose. Histoquímica para Cálcio(Vancossa). A) Rato do grupo I, controle, B) Grupo II Induzido a osteoartrose e sem tratamentos farmacológicos, C) Grupo III Induzido a osteoartrose e tratado com melatonina, D) Induzido a osteoartrose e tratado com ranelato de estrôncio, E) Induzido a osteoartrose e tratado com associação dos fármacos. F) Gráfico com média e desvio padrão apresentando semelhança entre os dados estatisticamente. Coloração Van Kossa. Depósitos de cálcio na cartilagem articular (seta amarela). Osso patelar (J).

## CONCLUSÃO

O acompanhamento diário para identificação de inflamação, acompanhamento do ganho de peso e avaliação das análises morfológicas, demonstraram que a indução a osteoartrose obteve sucesso e não levou a danos inflamatórios, já que histopatologicamente, o tecido apresentou-se bem preservado. Estas evidências devem-se ao provável método aplicado a indução da osteoartrose, pois a ruptura do ligamento cruzado é conhecida por ser mais específica que outras metodologias. Esta hipótese pode ser evidenciada em comparação a outros artigos que induzem a osteoartrose por outros meios. Tais artigos demonstraram graves danos à cartilagem articular e perda de osso subcondral quando utilizaram meniscectomia (MNC) ou infiltração de monoiodoacetato de sódio (MIA) ou período superior de dano após transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). (BATISTE et al., 2004; WOO et al., 2011; SHAO et al., 2013; NAVEEN et al., 2014). Porém neste trabalho, um dos objetivos é avaliar o efeito condroprotetor e preventivo, assim, a metodologia aplicada foi a mais adequada para o fim a ser alcançado.

Morfometricamente o benefício da associação dos fármacos foi comprovada quando percebeu-se que o espaço articular dos grupos que receberam os fármacos foram semelhantes ao grupo controle, diferindo apenas dos animais que não receberam nenhum tratamento (grupo II). Isso deve-se ao efeito preventivo e protetor hipotetizado à osteoartrose para associação dos fármacos deve-se ao fato do benefício de ambos os fármacos, pois sabe-se que isoladamente tanto a melatonina quanto o ranelato de estrôncio são conhecidos por seus efeitos positivos para o tratamento desta patologia, porém pela primeira vez observou-se que tal benefício é intensificado quando estas drogas são associadas.

Os benefícios do ranelato de estrôncio foram evidenciados anteriormente por Pelletier et al., (2013) que administrou o fármaco nas dosagens de 25, 50 ou 75 mg/kg por dia em cães, levando a via oral, levando à redução significativa das lesões da OA sobre a cartilagem para todas as doses testadas. Já a melatonina também é conhecida por seu efeito reconstrutor da cartilagem, pois tal droga é mencionada por ser ativadora de células cartilaginosas e altamente indutora de

fatores de expressão condrogênica, para ativação de genes como SOX9, e TGF- $\beta$  (PEI et al., 2009). Além disso, segundo Armijo et al., (2013) sugerem que a melatonina aumenta a síntese de matriz cartilaginosa. Esses fatos indicam que a melatonina pode ser benéfica para o tecido cartilaginoso, uma vez que há uma redução da secreção do hormônio da melatonina, com o avançar da idade, o qual está relacionado ao aumento da incidência de osteoartrite. Assim, a administração de melatonina pode prevenir tais propensões à enfermidade com o adiantar da idade.

Sabe-se que as ações antioxidantes da melatonina, tanto na formação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio anti-excitatórios e inflamatórios, como devido à capacidade a eliminação de radicais livres e enzima antioxidante e inibição de enzimas pró-oxidantes e citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-alfa e interleucina IL-1 e as enzimas inflamatórias iNOS e COX-2. Assim, a melatonina funciona como um antioxidante de largo espectro na eliminação de radicais livres (KORKMAZ et al, 2009; JIMÉNEZ-ORTEGA et al, 2009; REITER et al, 2010; CHAHBOUNI et al, 2010).

Os resultados desta pesquisa demonstraram coerência entre os dados analisados, visto que as evidências morfológicas condizem com as dosagens plasmáticas das análises bioquímicas e quantificação de cálcio aferido histoquimicamente. Ambos parâmetros analisados apresentaram semelhança entre os grupos experimentais em comparação ao grupo controle, que não foi induzido a osteoartrose. Estes dados corroboram com os apresentados por Servier et al., (2014), o qual analisou o efeito do ranelato de estrôncio em pacientes com osteoartrose e identificou os mesmos resultados plasmáticos, exceto a incidência de hipercolesterolemia numa frequência entre 1/100 e 1/10 indivíduos acometidos. Em relação aos efeitos da melatonina, outros estudos a mostraram eficaz na manutenção de níveis reduzidos de LDL, CT, triglicerídeos, ácido úrico e marcadores inflamatórios, bem como no aumento de HDL, quando havia uma doença de base que interferisse em sua homeostasia (BARQUILLA, 2014). Isto, porém, não ocorre com a OA, que se caracteriza por etiologia prioritariamente mecânica e minimamente inflamatória, corroborando com os achados neste experimento.

A administração dos fármacos melatonina e ranelato de estrôncio em associação ou não, apresentaram efeito condroprotetor e preveniram o agravamento dos danos articulares como hipotetizado. Porém tais danos foram muito sutis, não padronizando de maneira fundamentada os benefícios da interação medicamentosa. Desta maneira, sugere-se que maiores pesquisas sejam desenvolvidas afim de padronizar os benefícios propostos pela associação farmacológica sugerida neste trabalho.

Ou seja, a partir do conteúdo analisado, os objetivos foram alcançados. O que forneceu satisfação pela realização do trabalho o qual, de maneira árdua, proporcionou novos conhecimentos, inéditos e de grande perspectiva para inovações tecnológicas farmacológicas conjugadas. Foi percebido grande crescimento e desenvoltura satisfatória por parte dos alunos vinculados ao projeto, de maneira que os mesmos mantiveram-se empenhados e interessados pelo assunto, e muitos destes alunos paralelamente ampliaram seus conhecimentos a respeito da osteoartrose e ortopedia, possibilitando mais amplos conhecimentos científicos para escolha da linha de atuação médica e área a ser escolhida à concorrer para a residência médica.

Este trabalho pode servir de base para novas pesquisas e estudos. E futuramente poderá vir a ser implantado à aplicabilidade humana, inferindo-se a possibilidade da interação farmacológica para a associação dos fármacos melatonina e ranelato de estrôncio para tratamento de osteoartrose. Porém para isso, novas metodologias e procedimentos analíticos devem ser aplicadas.

Tal possibilidade deve ser levada em consideração pois a osteoartrose é uma patologia muito comum, e que acomete grande parte da população, sendo uma das principais causas de dor e incapacidade funcional do trabalhador. Gera enorme carga econômica para a comunidade e prejuízos ao empregador.

## REFERÊNCIAS

AFARA, I. O.; PRASADAM, I.; CRAWFORD, R.; XIAO, Y.; OLOYEDE, A. Near infrared (NIR) absorption spectra correlates with subchondral bone micro-CT parameters in osteoarthritic rat models. **Bone**, v.53, p. 350–357, 2013.

ALEXANDERSEN, P.; KARSDAL, M. A.; BYRJALSEN, I.; CHRISTIANSEN, C. Strontium ranelate effect in postmenopausal women with different clinical levels of osteoarthritis. **Journal of Climacteric**, v. 14, p.236–343, 2011.

ANISIMOV, V. N. Effects of exogenous melatonin- A Review. **Toxicologic pathology**, v. 31, p. 589-603, 2003.

ANISIMOV, V. N.; EGORMIN, P. A.; PISKUNOVA, T. S.; POPOVICH, I. G.; TYNDYK, M. L.; YUROVA, M. N.; ZABEZHINSKI, M. A.; ANIKIN, I. V.; KARKACH, A. S.; ROMANYUKHA, A. A. Metformin extends life span of HER-2/neu transgenic mice and in combination with melatonin inhibits growth of transplantable tumors in vivo. **Cell Cycle** v. 9, n.1, p. 188-197, 2010.

ARMIJO, P. R.; REGINATO, R. D.; MAGANHINA, C. C.; FUCHS, L. F. P.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES-JÚNIOR, J. M. Ação da melatonina no tecido cartilaginoso **Revista Reprodução e Climatério**. v. 28, n. 1, p.24-29, 2013.

ARMIJO, P.R.; REGINATO, R.D.; MAGANHINA,C.C.; L. F. P.; SIMÕES, R. S.; BARACAT, E. C.; SOARES-JUNIOR, E.C. Ação da melatonina no tecido cartilaginoso. **Reprodução & Climatério**, v. 8, n.1, p. 24-29, 2013.

BARQUILLA, P. C. Pagano, E.S.; Jiménez-Ortega, V.; Fernández-Mateos, P.; Esquifino, A. I.; Cardinal, D.P. Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 3, p. 280-90, 2014.

BATISTE, D. L.; KIRKLEY, A.; LAVERTY, S.; LISA M. F. THAIN, A. R.; HOLDSWORTH, D.W. Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 12, p. 986-996, 2004.

BERGER, J. A two-clock model of circadian timing in the immune system of mammals. **Pathologie Biologie**, v. 56, p. 286-291, 2008.

BIJLSMA, J.W.; BERENBAUM, F.; LAFEBER, F.P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. **Lancet**, v. 377, p. 2115-2126, 2011.

BONNELYE, E.; CHABADEL, A.; SALTEL, F.; JURDIC, P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, v.42, p.129-138, 2008.

BOVE, S. E. *et al.* Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 11, p. 821–830, 2003.

BROPHY, R.H.; RAI, M.F.; ZHANG, Z.; TORGOMYAN, A.; SANDELL, L.J. Molecular analysis of age and sex-related gene expression in meniscal tears with and without a concomitant anterior cruciate ligament tear. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 94, p. 385-393, 2012.

BRUYERE, O.; DELFERRIERE, D.; ROUX, C.; *et al.* Effects of strontium ranelate on spinal osteoarthritis progression. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, p. 335-339, 2008.

CHAHBOUNI, M.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; SEVILLA, B.; GARCÍA, J. A.; LÓPEZ, L. C.; MUÑOZ-HOYOS, A.; MOLINA-CARBALLO, A.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. **Journal Pineal Research** v. 48, n. 3, p. 282-289, 2010.

COIMBRA, I.B. *et al.* Osteoartrite (artrose): tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 44, n. 6, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0482-50042004000600009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042004000600009&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 27 nov 2013.

COIMBRA, I.B.; REZENDE, M. U; PLAPLER, P. G. Osteoartrite (artrose) – cenário atual e tendências no Brasil, Jan, ed. 1, **LIMAY EDITORA**, v. 01, pp. 84, 2012.

COMBE, R.; BRAMWELL, S.; FIELD, M. J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? **Neuroscience Letters**, v. 370, n. 2–3, p. 236–240, 2004.

CUTANDO, A.; ANEIROS-FERNÁNDEZ, J.; ANEIROS-CACHAZA, J.; ARIAS-SANTIAGO, S. Melatonin and cancer: current knowledge and its application to oral cavity tumours. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 8, p. 593-597, 2011.

DUNHAM, J.; HOEDT-SCHMIDT, S.; KALBHEN, D.A. Prolonged effect of iodoacetate on articular cartilage and its modification by an anti-rheumatic drug. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 74, n. 3, p. 283-290, 1993.

FISCHER, T.W.; SLOMINSKI, A.; ZMIJEWSKI, M.A.; REITER, R.J.; PAUS, R. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 9, p. 713-730, 2008.

FOUNDATION, National Osteoporosis. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. Washington, DC: **National Osteoporosis Foundation**; 2010. Disponível em: <<http://nof.org/files/nof/public/content/file/344/upload/159.pdf>>. Acesso em: 27 nov 2013.

GARNER, S.; FIDAN, D.; FRANKLIN, R.; JUDD, M.; SHEAD, B.; TOWHEED, T. *et al.* Celecoxib for rheumatoid arthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, (4):CD003831, 2002.

GERBER, J.; LOTZ, M.; EBERT, S. *et al.* Melatonin is neuroprotective in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, p. 783-790, 2005.

GOMES, J. F.; ADÃES, S.; SOUSA, R. M.; MENDONÇA, M.; CASTRO-LOPES, J. M. Dose-dependent expression of neuronal injury markers during experimental osteoarthritis induced by monoiodoacetate in the rat. **Molecular Pain**, v. 8, n 50, 2012.

GRISHKO, V.I.; HO, R.; WILSON, G.L.; PEARSALL, 4th A.W. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 17, n. 1, p. 107-113, 2009.

GUINGAMP, C. *et al.* Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis. A dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. **Arthritis & Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1670–1679, 1997.

GULHAN, I.; BILGILI, S.; GUNAYDIN, R.; *et al.* The effect of strontium ranelate on serum insulin like growth factor-1 and leptin levels in osteoporotic post-menopausal women: a prospective study. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 278, p. 437-441, 2008.

HENROTIN, Y.; LABASSE, A.; ZHENG, S.X.; *et al.* Strontium ranelate increases cartilage matrix formation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, p. 299–308, 2001.

JIMÉNEZ-ORTEGA, V.; CANO, P.; CARDINALI, D. P.; ESQUIFINO, A. I. 24-Hour variation in gene expression of redox pathway enzymes in rat hypothalamus: Effect of melatonin treatment. **Redox Report** v. 14, n. 3, p.132-138, 2009.

JUNG, F.J.; YANG, L.; HARTEK, L. *et al.* Melatonin in vivo prolongs cardiac allograft survival in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 37, p. 36-41, 2004.

KALBHEN, D.A. Chemical model of osteoarthritis: a pharmacological evaluation. **Journal of Rheumatology**, v. 14, n. 130-131, 1987.

KORKMAZ, A.; TOPAL, T.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev. Endocrinal Metabolic Disorder*. v.10, n. 4, p.261-70, 2009.

LIM, H.-D. *et al.* Cytoprotective and anti-inflammatory effects of melatonin in hydrogen peroxide-stimulated CHON-001 human chondrocyte cell line and rabbit model of osteoarthritis via the SIRT1 pathway. *Journal of Pineal Research*, v. 53, n. 3, p. 225–237, 2012.

LITTLE C. B.; GHOSH P.; ROSE R. The effect of strenuous versus moderate exercise on the metabolism of proteoglycans in articular cartilage from different weightbearing regions of the equine third carpal bone. *Osteoarthritis and Cartilage* v. 5, p.161-172, 1997.

LIU, F.C.; DAY, Y.J.; LIOU, J.T.; LAU, Y.T.; YU, H.P. Sirtinol attenuates hepatic injury and pro-inflammatory cytokine production following trauma-hemorrhage in male Sprague-Dawley rats. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, v. 52, p. 635-640, 2008.

LOESER, R. F. Osteoarthritis year in review 2013: biology. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 21, n. 10, p. 1436–1442, 2013.

LOPES JUNIOR, Osmar Valadao; INACIO, Andre Manoel. Uso de glucosamina e condroitina no tratamento da osteoartrose: uma revisao da literatura. *Revista Brasileira de Ortopedia*, São Paulo , v. 48, n. 4, Aug. 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-36162013000400300&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-36162013000400300&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 27 nov 2013.

MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 25, n. 3-4, p. 177-195, 2004.

MAN'CHEVA, T. A.; DEMIDOV, D. V.; PLOTNIKOVA, N. A.; KHARITONOVA, T. V.; PASHKEVICH, I. V.; ANISIMOV, V. N. Melatonin and metformin inhibit skin carcinogenesis and lipid peroxidation induced by benz(a)pyrene in female mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 151, n. 3, p. 363-365, 2011.

MARQUES, A. P.; KONDO, A. A. Fisioterapia na osteoartrite: Uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia** v.38, p.83-90,1998.

MENTAVERRI, R.; HURTEL, A. S.; KAMEL, S.; ROBIN, B.; BRAZIER, M. Strontium ranelate directly stimulates osteoclast apoptosis. **Osteoporosis international journal**, v.15, S.1, p. 345, 2004.

MESSNER, K.; GILLQUIST, J.; BJORNSSON, S.; LOHMANDER, L. S. Proteoglycan 14. fragments in rabbit joint fluid correlated to arthrosis stage. **Acta Orthopaedica Scandinavica**. v.64, p.312-316, 1993.

NICE. Alendronate, etidronate, risedronate, raloxifene and strontium ranelate for the primary prevention of osteoporotic fragility fractures in postmenopausal women. 2011. **NICE technology appraisal guidance 160**. Disponível em: <<http://www.nice.org.uk/guidance/TA160>>. Acesso em: 27 nov 2013.

NOVAES A.C. O Livro do Reumatologista. [S.l. : s.n.]. 2000.

PEI, M.; HE, F.; WEI, L.; RAWSON, A. Melatonin enhances cartilage matrix synthesis by porcine articular chondrocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 46, n. 2, p. 181-187, 2009.

PELLETIER, J-P.; KAPOOR, M.; FAHMI, H.; LAJEUNESSE, D.; BLESIIUS, A.; MAILLET, J.; MARTEL-PELLETIER, J. Strontium ranelate reduces the progression of experimental dog osteoarthritis by inhibiting the expression of key proteases in cartilage and of IL-1 $\beta$  in the synovium **Annals of the Rheumatic Diseases** v.72, p.250-257, 2013.

PRATA-LIMA, M.F.; BARACAT, E. C.; Simões, M. J. Effects of melatonin on the ovarian response to pinealectomy or continuous light in female rats: Similarity with polycystic ovary syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 37, p.987-995, 2004.

REGINSTER, J.-Y. *et al.* Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of knee osteoarthritis: results of a double-blind, randomised placebo-controlled trial. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 2, p. 179–186, 2013.

REITER, R.J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: A multitasking molecule. **Prog. Brain Research** v. 181, p. 127-51, 2010.

REZENDE, M. U.; HERNANDEZ, A. J.; CAMANHO, G. L.; AMATUZZI, M. M. Cartilagem articular e osteoartrose. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 8, n. 2, 2000.

REZENDE, M.; U.; GOBBI, R. G. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. **Revista brasileira de ortopedia**, v.44, n.1, 2009.

ROTH, J.A.; KIM, B.G.; LIN, W.L.; CHO, M.I. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 31, p. 22041-22047, 1999.

SAÚDE, Ministério da; ESTRATÉGICOS, Secretaria de Ciência Tecnologia e Insumos; SAÚDE, Departamento de Gestão e Incorporação de Tecnologias em. Ranelato de estrôncio no tratamento da osteoporose pós-menopausa. **Ministério da Saúde**, 2013. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Relatorio\\_Ranelato\\_Estroncio\\_CP21.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Relatorio_Ranelato_Estroncio_CP21.pdf)>. Acesso em: 27 nov 2013.

SCOTT, J.L.; GABRIELIDES, C.; DAVIDSON, R.K.; SWINGLER, T.E.; CLARK, I.M.; WALLIS, G.A. *et al.* Superoxide dismutase downregulation in osteoarthritis progression and end-stage disease. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 8, p. 1502-1510, 2010.

SERVIER. **Summary of Product Characteristics**. Servier, 2014. Disponível em: <<http://www.servier.com/sites/default/files/SmPCProtelos062014.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2015.

SHAO, H.; Shao, H.; Han, G.; Ling, P.; Zhu, X.; Wang, F.; Zhao, L.; Liu, F.; Liu, X.; Wang, G.; Ying, Y.; Yong, T. Zhanga Intra-articular injection of xanthan gum reduces pain and cartilage damage in a rat osteoarthritis model. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1850-1857, 15 2013

SILVA JUNIOR, F. S. **Osteoartrite experimental em ratos: efeito do sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina sobre a incapacitação articular e a lesão da cartilagem articular**. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007. Disponível em: <[www.teses.usp.br/.../FranciscoSaraivaSilvaJuniorTeseDoutorado.pdf](http://www.teses.usp.br/.../FranciscoSaraivaSilvaJuniorTeseDoutorado.pdf)>. Acesso em: 20 de fev 2015.

TAKAHASHI, N.; SASAKI, T.; TSOUDEROS, Y.; SUDA, T. S 12911–2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.18, p.1082-1087, 2003.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L.C.; TAN, D.X.; SUGINO, N. *et al.* Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 1, p. 328-343, 2009.

TAT, S.K.; PELLETIER, J.-P.; MINEAU, F.; *et al.* Strontium ranelate inhibits key factors affecting bone remodelling in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. **Bone**, v. 49, p. 559-567, 2011.

TEIXEIRA, A.A.C.; SIMÕES, M.J.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; SOARES JUNIOR, J. M. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. **International Journal of Morphology**, v. 22, n. 3, p. 189-194, 2004.

TOWHEED, T.E. Published meta-analyses of pharmacological therapies for osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 11, p. 836-837, 2002.

TOWHEED, T.E.; HOCHBERGER, M.C. A systematic review of randomized controlled trial of pharmacological therapy in osteoarthritis of the knee, with an emphasis on trial methodology. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 26, n. 5, p. 755-770, 1997.

VAD, V.; HONG, H; ZAZZALI, M.; AGI, N.; BASRAI, D. Exercise recommendations in osteoarthritis of the knee. **Sports Medicine** v.32, p.729-739, 2002.

WOO, Y. J. JOO, Y. B.; JUNG, Y. O.; JU, J.H.; CHO, M.L.; OH, H.J.; JHUN, J.Y.; PARK, M.K.; PARK, J.S.; KANG, C.M.; SUNG, M.S.; PARK, S.H.; KIM, H.Y.; MIN, J.K. Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 43 , n. 10, p. 561–570, 2009.

ZHANG, W.; NUKI, G.; MOSKOWITZ, R.W.; *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 Cartilage**, v. 18, p. 476-499, 2010.





CENTRO DE ENSINO SUPERIOR E DESENVOLVIMENTO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICA DE CAMPINA GRANDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CESED

**PARECER**  
CEUA N°: 11  
CIAEP/CONCEA N°: 01.0001.2012  
PROTOCOLO N°:0037/22052014  
APROVADO EM 22/05/2014

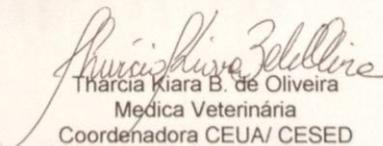
1. Pesquisador Responsável: Dra. Ana Janaina Jeanine M de Melo

**Título do Projeto: Análise de Alterações histológicas em joelhos osteoartrosicos de ratos wistar tratados com melatonina e ranelato de estrôncio.**

2. Objetivo: Analisar comparativamente a ação condroprotetora dos fármacos ranelato de estrôncio e melatonina em joelhos de ratos wistar com osteoartrose induzida.

3. Considerações: O protocolo de pesquisa está devidamente preenchido, com todos os itens solicitados entregue a CEUA/CESED. Com considerações acatadas pelo colegiado o projeto ficou em situação aprovado.

4. Parecer Final: **APROVADO**

  
 Thárcia Kiara B. de Oliveira  
 Médica Veterinária  
 Coordenadora CEUA/ CESED



Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901 - Itararé  
 CEP 58411-020 | Campina Grande - PB | (83) 2101.8800  
[www.cesed.br](http://www.cesed.br) | [facisa@cesed.br](mailto:facisa@cesed.br) | [fcu@cesed.br](mailto:fcu@cesed.br) | [esac@cesed.br](mailto:esac@cesed.br)