**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA Y FARMACOLOGIA

TESIS DOCTORAL

MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO

Adriana Lima de Araujo

2012

D^a Adriana LIMA DE ARAÚJO, Licenciada en Fisioterapia por la Universidade de Fortaleza (Brasil) y estudiante del Programa de Doctorado de la Universidad de Salamanca “Fisiopatología celular y Molecular y sus implicaciones farmacológicas (0409)” presento esta memoria para optar al Título de Doctor de la Universidad de Salamanca.

Fdo: Adriana LIMA DE ARAUJO

Prof^a Dr^a M^a Jesús MONTE RÍO, Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral titulada “MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO” y presentada por D^a Adriana Lima de Araújo, Licenciada en Fisioterapia por la Universidade de Fortaleza (Brasil) y estudiante del Programa de Doctorado de la Universidad de Salamanca “Fisiopatología celular y Molecular y sus implicaciones farmacológicas (0409)” durante el bienio 2006-08, ha sido realizada en este Departamento bajo la dirección de los Doctores D^a Nélida Eleno Balboa, D. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro y D^a Mariana Lima Vale, y cumple todos los requisitos para optar al Título de Doctor de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado.

Salamanca a ____ de _____ 2012

Fdo: Prof^a Dr^a M^a Jesús MONTE RÍO

Los Doctores D^a Nélida ELENO BALBOA, Prof^a Titular de la Universidad de Salamanca y D. Ronaldo de ALBURQUERQUE RIBEIRO y D^a Mariana LIMA VALE, ambos profesores de la Universidade Federal do Ceará (Brasil)

CERTIFICAN: Que el presente trabajo presentado por D^a Adriana LIMA DE ARAÚJO y titulado “MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO” para optar al Título de Doctora de la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección y, considerando que cumple las condiciones necesarias, autorizamos su presentación y defensa ante el Tribunal correspondiente.

En Salamanca a ____ de _____ 2012

D^a N. ELENO BALBOA

D. R. ALBURQUERQUE RIBEIRO

D^a M. LIMA VALE

Ao meu querido esposo Rodrigo, meu grande amigo, por todo amor, incentivo e apoio em mim depositados e essenciais na concretização deste sonho.

Aos meus pais, Edson e Iracé, exemplos de força e dedicação, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho do meu crescimento pessoal e profissional.

Às minhas irmãs, Andreza, Meire e Andréa, eternas e incondicionais amigas, pelo companheirismo de toda uma vida.

Aos meus sobrinhos, Luis Eduardo, Ana Elise, Wally Neto, Marcelo, Rafael, Gabriela, Mateus, Leticia, Larissa e Pedro, por fazerem de mim uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pelo dom da vida e por sempre me iluminar em minhas grandes decisões;

Agradeço a Professora Dra. María Ángeles Serrano García pela oportunidade e credibilidade em mim depositadas.

Agradeço imensamente a Professora Dra. Nélida Eleno Balboa pela orientação a mim dedicada e por todo o apoio e paciência, fundamentais nessa conquista;

Agradeço a Professora Dra. Mariana Lima Vale, pela orientação prestada, pela disponibilidade, paciência e pelos ensinamentos valiosos, tornando possível a realização desta pesquisa;

Meus sinceros agradecimentos ao Professor Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pela grande oportunidade oferecida ao me acolher em seu laboratório, por ter acreditado em meu potencial e pela orientação prestada;

Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade de Salamanca- ES, pela acolhida e formação;

Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pela formação e incentivo;

Às técnicas de laboratório Tiara, Carol e, em especial à Vandinha, pela presteza em sempre ajudar nos procedimentos experimentais da pesquisa;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia Armando, Haroldo, Fernando, Carlos, Alana, Ana Paula e Márcia pela organização e manutenção do departamento;

Aos amigos do LAFICA, especialmente Renata Bessa, Antoniella Gomes, Roberto César, Deysi Viviana, Rosemayre Freire, Pedro Soares, André Luiz e Jand-Venes Rolim, pela amizade e companheirismo;

Aos alunos de iniciação científica Caio e André Farias, pela participação e colaboração em várias etapas do desenvolvimento dessa pesquisa;

À grande amiga Juliana Arcanjo por todo o apoio, dedicação e carinho, e por compartilhar momentos de conquistas e angústias;

À Hosana por todo o amor e atenção a mim dedicados;

Aos meus queridos sogros Ana Maria e Pardaillan pela adorável convivência e pela compreensão nos momentos em que estive ausente;

Aos meus pais que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo;

Às minhas irmãs por todo apoio, carinho e atenção que me tem.

Ao meu esposo Rodrigo por estar ao meu lado compartilhando a vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro durante os anos de curso.

A todos, meus sinceros votos de agradecimento.

***“Os que esperam no Senhor renovarão as suas forças,
subirão com asas como águias, correrão e não se cansarão,
caminharão e não se fatigarão”*** Isaías 40:31

RESUMO

Mecanismos e mediadores envolvidos no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico. Autora: *Adriana Lima de Araújo. Doutorado em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade de Salamanca, España.*

O ácido zoledrônico é um bisfosfonato de terceira geração. Evidências clínicas apontam a eficácia do ácido zoledrônico, dentre a classe de bisfosfonatos, na diminuição da dor do câncer ósseo. Recentemente, vários autores reportaram que além do efeito benéfico sobre o câncer ósseo, há também um efeito positivo quanto à inibição da dor associada a estas metástases. Esta pesquisa objetivou avaliar o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico, assim como os possíveis mecanismos e mediadores envolvidos em tal efeito.

Para tanto, injetou-se ácido zoledrônico em doses variando de 10 a 300 µg/kg (injeção sistêmica s.c, e.v. ou i.p.) 30 min antes do Zymosan (Zy) (1 mg/animal) via i.p. para o teste de contorções abdominais em camundongos e via intra-articular para a incapacitação articular em ratos. O tecido sinovial do joelho de rato foi removido para análise imunohistoquímica e alíquotas do lavado articular foram colhidas para contagem de células e dosagem de citocinas. Foi coletado também o exsudato peritoneal de camundongos estimulados com zymosan e pré-tratados com ácido zoledrônico para isolar os macrófagos e posteriormente realizar a dosagem de citocinas produzidas *in vitro* por estas células. Os papéis do óxido nítrico e dos canais de potássio ATP dependentes foram avaliados utilizando fármacos envolvidos nessas vias. Para isso, L-NAME (40mg/kg, s.c.), aminoguanidina (10, 30 e 100 mg/kg; sc), L-Arginina (200 mg/kg; i.p.), glibenclamida (1 a 3 mg/kg) e diazóxido (10 mg/kg), foram administrados previamente ao ácido zoledrônico. No modelo de edema de pata, carragenina (300µg/pata) ou dextran (300µg/pata) foram administrados na pata traseira esquerda 1 hora após a administração de ácido zoledrônico. Após o sacrifício os tecidos das patas foram colhidos para posterior avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO). Para avaliar a permeabilidade vascular, ainda no modelo de edema de pata, 30 minutos antes do sacrifício foi injetada na veia peniana o corante Azul de Evans (25 mg/kg), os animais foram sacrificados e o tecido da pata foi retirado para análise do extravasamento do Azul de Evans.

Observou-se que o ácido zoledrônico inibiu de maneira significativa a hiperalgesia inflamatória induzida pelo zymosan em 88% no modelo de contorções abdominais e em 47% na incapacitação articular. No modelo de contorções abdominais esse efeito foi significantemente revertido em 93% para o L-NAME, em 103% para a aminoguanidina e em 72% para a glibenclamida, sugerindo o envolvimento do NO e dos canais de potássio ATP dependentes no efeito antinociceptivo. O ácido zoledrônico inibiu significativamente ($p < 0,05$) a produção de citocinas pró-nociceptivas, particularmente o TNF e KC, por células residentes da cavidade peritoneal de animais estimulados com zymosan, assim como a expressão de TNF- α tanto em animais submetidos à artrite por zymosan como em animais injetados com carragenina subplantar. Foi eficaz também em inibir a produção de IL-1 em patas de ratos estimulados com carragenina. Contudo, ainda que exerça influência sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, seu efeito antinociceptivo parece não estar relacionado a um efeito antiinflamatório, visto que não foi eficaz em modificar o curso do edema de pata, da permeabilidade vascular, da atividade da MPO, dos níveis da citocina IL-10 no tecido de pata, assim como não alterou a migração celular para a cavidade articular.

Os dados permitem concluir que o ácido zoledrônico possui efeito antinociceptivo e esse efeito parece ser mediado pela estimulação da via NO/cGMP/K⁺ATP.

ABSTRACT

Mechanisms and mediators involved in zoledronic acid antinociceptive effect.

Author: *Adriana Lima de Araújo. Post-graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, University of Salamanca, Spain.*

Zoledronic acid is a bisphosphonate used for the treatment of bone metastases. A possible analgesic property of this drug has been previously described. This study aimed to evaluate if zoledronic acid has an antinociceptive effect and to identify the mechanisms and mediators involved in this effect.

Zoledronic acid was administered in doses ranging from 10 to 300µg/animal (i.p., s.c. or e.v injection) 30 min before zymosan (Zy) (1 mg/animal i.p for the writhing test in mice and 1mg/cavity intra-articular for the rat knee joint incapacitation test). The synovial tissue was harvested for immunohistochemical analysis and the samples of the articular exudates were harvested for cell count and for cytokine level measurements. The exudates from the peritoneal cavity of the mice stimulated by Zy and pretreated with zoledronic acid were also harvested for cytokine level measurements. The roles of nitric oxide (NO) and of the ATP-sensitive potassium channels on zoledronic acid activity were evaluated using drugs involved in these routes. For that, L-NAME (40 mg/kg; s. c.), aminoguanidine (10, 30 and 100 mg/kg; sc), L-arginine (200 mg/kg; i. p.), glybenclamide (1 to 3 mg/kg; i.p.), and diazoxide (10 mg/kg; s.c.) were administered 30 min before zoledronic acid. For the paw edema experimental model, a subplantar injection of carrageenin (300µg /paw) or dextran (300 µg/paw) was administered into the left hind paw one hour after zoledronic acid administration (100 mg/kg). After 4 hours, the animals were sacrificed, and the paw tissue was harvested for immunohistochemical analysis and for detection of the myeloperoxidase (MPO) activity levels. In order to evaluate the vascular permeability, 30 minutes before the sacrifice, the Blue Evans liquid (25 mg/kg) was injected in the penile vein. After the sacrifice, the paw tissue was harvested for analysis.

Zoledronic acid inhibited the writhing response induced by zymosan by up to 88%. Similar results were observed in the rat knee joint incapacitation test induced by zymosan, which showed up to 47% of inhibition ($p<0.05$). In the writhing test in mice,

the antinociceptive effect was reverted by the pretreatment with L-NAME, aminoguanidina, and glybenclamide up to 93%, 103% and 72% respectively, suggesting the involvement of the NO and the ATP-sensitive potassium channel on the antinociceptive effect of zoledronic acid. The pretreatment with zoledronic acid promoted a significant inhibition ($p < 0.05$) on the release of pro-nociceptive cytokines, especially TNF and KC by resident cells from mice stimulated intraperitoneally by Zy, as well as the expression of TNF- α of the articular cavity of the animals submitted to the zymosan-induced arthritis and of the tissue of paw stimulated by carraggenin. Zoledronic acid was also efficient in the inhibition of the release of IL-1 on the paw tissue that was stimulated by carraggenin. Despite zoledronic acid influence upon the pro-nociceptive cytokines production, its antinociceptive effect does not seem to be related to an antiinflammatory effect, because zoledronic acid did not modify the paw edema, the vascular permeability, the MPO activity, IL-10 levels on the paw tissue and was not able to inhibit cell migration to the inflamed joint. The results presented here demonstrate that zoledronic acid exhibits antinociceptive activity and this effect seems to be mediated by activation of the NO/cGMP/K⁺ATP pathway.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<	Menor que
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
α	alfa
β	beta
δ	delta
μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrômetro
μmol	micromol
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ASCO	American Society of Clinical Oncology
AR	Artrite Reumatóide
ATP	Adenosina Trifosfato
AZy	Artrite induzida por Zymosan
Ca^{2+}	Cálcio
BFs	Bisfosfonatos
bFGF	Fator de Crescimento Básico de Fibroblastos
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
Cg	Carragenina
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
Cm	Centímetros
CO_2	Gás Carbônico
CSF	Fatores Estimulantes de Colônias
Dx	Dextran
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro Padrão de Média
e.v	Via Endovenosa

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPP sintase	Farnesil Pirofosfato Sintase
g	gramas
GMPc	Monofosfato Cíclico de Guanosina
h	hora
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
IASP	Associação Internacional para Estudo da Dor
IL-1	Interleucina-1
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
i.a.	Via intraarticular
INCA	Instituto Nacional de Câncer
i.p.	Via intraperitoneal
K ⁺	Potássio
kDa	Kilodalton
kg	kilograma
LAFICA	Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
L-NMA	N ^G monometil-L-arginina
mg	miligramas
MIP1- α	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 alfa
min	minutos
ml	mililitros
nm	nanômetro
MPO	Mieloperoxidase
NaCl	Cloreto de Sódio
Na ⁺	Sódio

NO	Óxido Nítrico
NOSi	Óxido Nítrico Sintase Induzível
NOSn	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NOSe	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₂	Oxigênio
OPD	O-fenilenodiamina
PAF	Fator de agregação plaquetária
PGI ₂	ProstaciclinaI ₂
PKA	Proteínas Quinases A
PKC	Proteínas Quinases C
RPM	Rotações Por Minuto
s.c.	Via subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento beta
TSP	Tempo de Suspensão de Pata
UFC	Universidade Federal do Ceará
Zy	Zymosan

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Dor	19
1.1.1 Base neural da dor	20
1.1.2 Dor inflamatória	21
1.1.2.1 Mediadores da dor inflamatória	22
1.1.2.2 Cascata de citocinas inflamatórias	24
1.1.2.3 Papel das células residentes na dor inflamatória	26
1.1.2.4 Papel do óxido nítrico (NO) na dor inflamatória	27
1.1.3 Artrite e Dor	29
1.2 Bisfosfonatos	29
1.2.1 Histórico	30
1.2.2 Aspectos gerais	31
1.2.3 Estrutura química	32
1.2.4 Mecanismo de ação	33
1.2.5 Ácido zoledrônico	34
1.2.6 Bisfosfonatos e dor	35
1.3 Justificativa e caracterização do problema	36
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Animais	40
3.1.1 Ratos	40
3.1.2 Camundongos	40
3.2 Aspectos éticos	40
3.3 Ambientes	40
3.4. Modelos experimentais	41
3.4.1 Teste de contorções abdominais em camundongos	41
3.4.2 Teste de incapacitação articular em joelho de rato	42
3.4.2.1 Coleta do tecido sinovial para análise imunohistoquímica	42
3.4.2.2 Coleta do lavado articular de joelho de rato	43

3.4.2.3 Migração de células para a cavidade articular	44
3.4.3 Edema de pata	44
3.4.3.1 Análise da permeabilidade vascular	45
3.4.3.2 Ensaio de mieloperoxidase (MPO)	45
3.5 Imunohistoquímica do tecidos.....	46
3.6 Obtenção do sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais residentes de camundongos estimulados <i>in vivo</i> com zymosan	46
3.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	47
3.8 Estudo da via L-Arg/NO/GMPc/KATP no efeito do ácido zoledrônico sobre a nocicepção	47
3.9 Efeito do pós-tratamento com ácido zoledrônico sobre a atividade nociceptiva do zymosan no teste de incapacitação articular em joelho de rato	48
3.10. Análise estatística	49
4 RESULTADOS	50
4.1 Efeito do ácido zoledrônico sobre a atividade nociceptiva do Zymosan no teste de contorções abdominais	51
4.2 Efeito do ácido zoledrônico sobre a atividade nociceptiva do zymosan no teste de incapacitação articular em joelho de rato	51
4.3 Avaliação da participação do óxido nítrico no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico no modelo de contorções abdominais	55
4.4 Avaliação da participação dos canais de potássio ATP dependentes no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico no modelo de contorções abdominais	58
4.5. Efeito do ácido zoledrônico sobre o edema de pata	58
4.6 Efeito do ácido zoledrônico sobre a permeabilidade vascular em pata de ratos estimuladas com carragenina	61
4.7 Efeito do ácido zoledrônico sobre a migração de neutrófilos em pata de rato induzido por carragenina - atividade de mieloperoxidase (MPO)	61
4.8 Efeito do ácido zoledrônico sobre a migração de células para a cavidade articular induzida por zymosan	61
4.9 Efeito do ácido zoledrônico sobre a produção de citocinas (IL-1 e IL-10) induzidas por carragenina em pata de rato	65
4.10. Dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais estimulados <i>in vivo</i> com ácido zoledrônico e zymosan	65
4.11. Imunohistoquímica para TNF- α em tecido sinovial de joelho de rato submetido á artrite por zymosan e em pele de pata de ratos estimuladas com carragenina subplantar	68
4.12. Efeito do pós-tratamento com ácido zoledrônico sobre a atividade nociceptiva do zymosan no teste de incapacitação articular em joelho de rato.....	71
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	82
7. REFERÊNCIAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOR

A dor é uma das grandes preocupações da humanidade. Sua percepção e seu significado vêm sendo modificado através dos tempos e dos contextos históricos e culturais. (TEIXEIRA e OKADA, 2009).

Em 1994 a “*International Association for Study of Pain*” (IASP) definiu dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual presente ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão” (MERSKEY e BOGDUK, 1994).

Fisiologicamente, a dor tem importante função de defesa, é um mecanismo vital e protetor que nos permite viver em um ambiente carregado de perigos potenciais. Funciona como alerta para a existência de alguma ameaça a integridade física do indivíduo. A sua importância é mais claramente demonstrada nos pacientes portadores da Síndrome Riley Day, síndrome da insensibilidade congênita à dor, onde há ausência congênita de nociceptores. Esses bebês e crianças são propensos à mutilação e a danos ambientais contínuos, normalmente resultando em morte em uma idade jovem (TEIXEIRA e FIGUERÓ, 2001).

Podemos classificar a dor em aguda ou crônica. A dor aguda apresenta importante valor biológico, pois denota uma lesão ou iminência de lesão tecidual. Ao contrário, a dor crônica despe-se desse valor biológico e caracteriza-se por persistir por períodos prolongados, geralmente além do tempo de cicatrização do tecido, não havendo causa identificável para tal.

A dor é uma das principais razões de incapacidade e sofrimento para pacientes com diagnóstico de câncer. Em média, 50% dos pacientes portadores de neoplasia maligna apresentam dor em alguma fase de sua doença. Esse número eleva-se para aproximadamente 70% quando nos referimos aos pacientes em estágio avançado da doença. (ORTEGA, 2009; MELO e PINTO FILHO, 2009). No Brasil o diagnóstico de tal enfermidade é feito em uma fase avançada, o que justifica a alta incidência de pacientes com síndromes dolorosas relacionadas ao câncer.

A dor relacionada ao câncer afeta a saúde pública. Trata-se de uma doença com elevada morbidade e mortalidade e de prevalência crescente. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou para o ano de 2030, 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17

milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, as estimativas para o ano de 2012 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos da doença.

1.1.1 Base neural da dor

No início do século XX, Charles Sherrington descobriu os nociceptores e introduziu o termo nocicepção, palavra derivada do latim *nocere*- nocivo/capere- captação. Trata-se de um sistema presente no organismo responsável pela captação do nocivo e pela transformação deste estímulo em alerta para o sistema nervoso central (SNC). Nociceptor é o termo empregado para descrever os receptores responsáveis pela captação dos estímulos. São representados pelas terminações nervosas livres presentes e podem ser encontrados tanto em estruturas somáticas como viscerais (GRIGG *et al.*, 1986; MCMAHON e KOLTZENBURG, 1990).

A dor resulta da integração central de impulsos nervosos periféricos, ativados por estímulos locais. Na sequência de eventos que levam ao fenômeno sensitivo doloroso, o primeiro passo é a transformação do estímulo em potencial de ação. Quando intensos, os estímulos são capazes de alterar as propriedades da membrana do nociceptor e assim, deflagrar potenciais de ação, que são transferidos de fibras aferentes sensitivas do sistema nervoso periférico (SNP) ao SNC (TEIXEIRA, 2009).

A atividade dos receptores nociceptivos é modulada pela ação de substâncias algio gênicas liberadas no local da injúria mediante um estímulo. Essas substâncias podem ser liberadas por diferentes fontes como mastócitos, macrófagos, vasos sanguíneos e células traumatizadas. Dentre as substâncias algio gênicas podemos destacar: citocinas, prostaglandinas, acetilcolina, histamina, bradicinina, serotonina, substância P dentre outras.

Em condições fisiológicas as fibras A-delta e C são responsáveis pela transmissão do estímulo nociceptivo (MILLAN, 1999). Com base na dimensão do corpo celular e seu axônios, os neurônios aferentes podem ser classificados da seguinte maneira: fibras de pequeno diâmetro, amielinizadas e com baixa velocidade de condução (fibras C); fibras de

médio diâmetro, discretamente mielinizadas e com média velocidade de condução (fibras A-delta); ou fibras de grande diâmetro, intensamente mielinizadas e com elevada velocidade de condução (fibras A-beta).

Em estudos experimentais com seres humanos, nos quais os nervos sensoriais cutâneos foram estimulados, foi demonstrado que a atividade das fibras A-delta resulta em uma sensação de dor nítida e bem localizada, enquanto a atividade da fibra C promove dor difusa em queimação (RANG *et al.*, 2004). As diferenças nas velocidades de condução dessas fibras explicam a subjetividade da sensação dolorosa associada ao estímulo nocivo.

É através do trato de Lissauer que as fibras aferentes nociceptivas transmitem os sinais químicos, térmicos e mecânicos. Os corpos celulares dessas fibras encontram-se nos gânglios da raiz dorsal; as fibras penetram na medula espinhal por meio das raízes dorsais terminando na substância cinzenta do corno dorsal (RANG *et al.*, 2004).

No corno dorsal da medula diversas substâncias, neurotransmissores e/ou neuromoduladores, estão envolvidas na transmissão central e na modulação da resposta nociceptiva, como o glutamato, a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e o óxido nítrico (NO) (OLIVEIRA e SILVA, 2009). É aí, no corno dorsal da medula, onde ocorre a sinapse com os neurônios secundários, diante da ligação dos neurotransmissores a receptores específicos. Após a ativação dos neurônios subsequentes a informação nociceptiva é conduzida através do trato espinotalâmico e espinohipotalâmico até o sistema nervoso central supraespinal, onde será analisada e interpretada em locais específicos do córtex.

Mais recentemente foi reportada a existência de outros tratos nociceptivos, os tratos espinoparabrânquioamigdalóide e espinoparabrânquiohipotalâmico, que trafegam contra lateralmente no funículo dorsolateral da medula espinhal. Ambos os tratos estão envolvidos com o componente afetivo-motivacional da dor e na elaboração das respostas neurovegetativas e endócrinas que acompanham os processos dolorosos (OLIVEIRA e SILVA, 2009).

1.1.2 Dor inflamatória

A inflamação (do Latim *inflammatio*, que significa atear fogo) é uma reação complexa do tecido conjuntivo vascularizado em resposta a um agente lesivo. A reação inflamatória envolve uma série de fenômenos, que incluem: dilatação de arteríolas, capilares e vênulas, com aumento de permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo; exsudação de plasma, incluindo-se proteínas; e migração de leucócitos para o foco inflamatório.

Várias células que participam da resposta inflamatória já estão presentes nos tecidos, tais como as células endoteliais, os mastócitos e as células mononucleares residentes, enquanto outras chegam ao foco inflamatório provenientes do sangue, como os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos).

Os neutrófilos são as primeiras células do sistema imunológico a serem recrutadas para o local do dano e são responsáveis pela eliminação do agente infeccioso, fagocitam os microorganismos, células mortas e restos celulares (FERREIRA *et al*, 2009). Para dirigirem-se à área acometida, os neutrófilos são recrutados, fenômeno chamado de quimiotaxia. Estas células saem do interior do leito capilar para o espaço extracelular. É um processo multimediado que envolve uma ação combinada de múltiplas moléculas de adesão celular.

Durante o processo inflamatório ocorre a liberação de substâncias endógenas, os mediadores inflamatórios, que são responsáveis pela manutenção e modulação deste processo (FERREIRA, 1980). Estes podem ser fatores químicos plasmáticos e/ou celulares. A depender da natureza do mediador, este poderá ser capaz de sensibilizar, ou seja, diminuir o limiar de ativação do nociceptor, ativá-lo, ou ambas as ações (FERREIRA, 1993).

É comum pacientes que experimentam dor apresentem diferentes manifestações, como alodínia (resposta dolorosa a um estímulo que anteriormente não era doloroso) e hiperalgesia (resposta dolorosa aumentada a um estímulo previamente doloroso) (BESSON, 1999).

1.1.2.1 *Mediadores da dor inflamatória*

Durante o desenvolvimento da resposta inflamatória várias etapas parecem estar relacionadas à ação de substâncias endógenas que possuem a capacidade de alterar bioquímica e fisicamente a estrutura do local afetado. Tais substâncias químicas, os mediadores, são liberadas inicialmente no local da injúria como mecanismo de alerta, onde os macrófagos parecem exercer papel crucial (FERREIRA, 1980).

No que se refere à dor, podemos destacar duas classes de mediadores inflamatórios liberados durante a resposta imune inata: os mediadores hiperalgésicos intermediários e os mediadores hiperalgésicos finais. Os primeiros são liberados tanto em uma fase inicial como durante o decorrer da resposta inflamatória e são responsáveis pela liberação de outros mediadores intermediários. Já os mediadores hiperalgésicos finais agem diretamente sobre seus receptores específicos, levando assim, às alterações moleculares responsáveis por sua sensibilização. (FERREIRA *et al.*, 2009).

Entre os mediadores finais podemos destacar os eicosonóides (prostaglandina e prostaciclina), as aminas simpáticas, os leucotrienos, o fator de agregação plaquetária (PAF), a histamina e a serotonina. Quando liberados, esses mediadores são capazes de estimular vias de sinalização intracelular, (como a da adenosina monofosfato cíclico –AMPc– e das proteínas quinases A –PKA– e C –PKC–), culminando em sensibilização neuronal (FERREIRA e NAKAMURA, 1979; TAIWO *et al.*, 1989). A ativação desses sistemas altera as características elétricas da membrana neuronal, e isso se deve a modificações ocorridas no limiar de diversos canais iônicos, como os de sódio (Na^+), de potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}), presentes nas membranas e nas organelas citosólicas. Tais eventos resultam em alterações nos potenciais de repouso e uma diminuição do limiar de ativação da membrana, facilitando a ação de estímulos anteriormente inócuos ou muito pouco efetivos (FERREIRA *et al.*, 2009).

Há evidências que substâncias capazes de promover o aumento nos níveis intracelulares de AMPc e Ca^{2+} têm relação com a sensibilização dos nociceptores. Experimentalmente foi demonstrado que a injeção em pata de rato de dibutiryl AMPc (análogo do AMPc) e de Ca^{2+} foi capaz de induzir hiperalgesia (FERREIRA e NAKAMURA, 1979). A administração de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (dopamina ou noradrenalina), mediadores conhecidos por estimularem a síntese de AMPc neuronal, também

se mostrou eficaz em promover hiperalgesia, que pode ser prevenida com o pré-tratamento com antagonista de Ca^{2+} (FERREIRA e NAKAMURA, 1979; TAIWO *et al.*, 1989; FOLLENFANT *et al.*, 1990). Adicionalmente, são também considerados mediadores hiperalgésicos aqueles capazes de promover a síntese de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas, como é o caso das citocinas interleucina-1(IL-1), interleucina-8 (IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF).

É sabido que substâncias que abrem os canais de K^+ são capazes de bloquear a hiperalgesia. Por esse motivo, a via metabólica L-arginina/NO/GMPc/ K^+ parece contrapor a hiperalgesia inflamatória, já que a ativação de tal via promove a abertura dos canais de K^+ ATP dependentes, permitindo a saída deste íon, o que contrabalança o limiar aumentado pelo acúmulo de Ca^{2+} citosólico. Esse sistema regulador negativo do nociceptor sensibilizado apresenta relação com o aumento do GMPc ou de substâncias capazes de estimular a guanilato ciclase neuronal, a exemplo do carbacol e dos geradores de óxido nítrico (MOORE *et al.*, 1991; DUARTE e FERREIRA, 1992; ALVES e DUARTE, 2002; SACHS *et al.*, 2004).

Todos esses achados nos permitem sugerir que a regulação funcional, positiva ou negativa, dos nociceptores na dor inflamatória parecem estar relacionada com as concentrações de AMPc e GMPc no nociceptor. Experimentalmente foi demonstrada a importância desse sistema regulador na dor inflamatória através do modelo de incapacitação articular induzido por zymosan (ROCHA *et al.*, 1999).

Contudo, os mediadores hiperalgésicos finais não são liberados diretamente a partir do reconhecimento do estímulo inflamatório, mas sim, após a estimulação prévia dos mediadores hiperalgésicos intermediários. Entre tais mediadores merecem destaque as citocinas e as quimiocinas por serem consideradas como os mais característicos da dor inflamatória e fundamentais para o fenômeno.

1.1.2.2 Cascata de citocinas inflamatórias

Basicamente a família das citocinas consiste em pequenas proteínas e glicoproteínas, cujo peso molecular situa-se entre 8 e 30 kDa, com propriedades pleiotrópicas

e regulatórias. As citocinas são sintetizadas por diversos tipos celulares do sistema imune e sua produção é desencadeada em resposta a uma infinidade de estímulos, como agentes infecciosos, tumores e estresse. Seu efeito se dá após ligação a seu receptor específico expresso na superfície da célula-alvo, culminando com transdução dos sinais no interior da célula.

Os vários tipos de citocinas podem ser enquadrados em diversas categorias: os interferons (IFN), as interleucinas (IL), os fatores de necrose tumoral (TNF), os fatores estimulantes de colônias (CSF) e uma variedade de outros fatores de crescimento (fatores de crescimento derivados de fibroblastos, da epiderme e das plaquetas) (HOPKINS, 1990). Esses mediadores, além de exercerem importante função no recrutamento de leucócitos (neutrófilos) para o foco inflamatório, são relevantes na gênese da sensibilização nociceptiva. (FERREIRA *et al.*, 2009).

Quanto à hipernocicepção, as citocinas mais importantes e merecedoras de destaque são: o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as interleucinas (IL) -1 e -8. (CUNHA *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 2009). A IL-1 e a IL-8 liberam, respectivamente, prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas (FERREIRA *et al.*, 2009). Ferreira *et al.* (1988) utilizando um modelo experimental de hiperalgesia mecânica, evidenciaram a participação da citocina IL-1 β na dor inflamatória periférica.

É conhecida a propriedade das citocinas de induzir sua própria produção e a de outras citocinas. Neste sentido, o TNF apresenta a capacidade de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas e de fatores tróficos e, por esta característica, pode ser considerado o protótipo da citocina pró-inflamatória (MCDERMOTT, 2001; CUNHA *et al.*, 1992). Quando liberado, o TNF induz a síntese de IL-1 (DINARELLO *et al.*, 1986). Esta, por sua vez, induz sua própria síntese, a de IL-6 (VAN DAMME *et al.*, 1987) e a de IL-8 (STREITER, 1989).

O importante papel exercido pelas citocinas TNF, IL-1 β e IL-8 na gênese da dor inflamatória foi evidenciado por Ribeiro *et al.* (2000). Neste estudo, através do modelo de contorções abdominais, foi demonstrado que, quando injetadas concomitantemente, as citocinas TNF, IL-1 β e IL-8 são capazes de induzir contorções abdominais em camundongos. Corroborando este efeito, o pré-tratamento com anti-soros específicos mostrou-se eficaz em

bloquear a atividade nociceptiva de tais citocinas em animais estimulados com zymosan ou ácido acético.

As citocinas muitas vezes possuem ações antagônicas, contudo muito bem balanceadas. Neste sentido algumas delas podem ser classificadas como pró-inflamatórias, como o TNF, IL-1, IL-6 e IL-8, enquanto outras apresentam efeito anti-inflamatório.

O efeito antinociceptivo das citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 foi demonstrado por Vale *et al.* (2003). Estas citocinas estão envolvidas num mecanismo modulatório da resposta inflamatória inibindo a síntese de mediadores pró-inflamatórios (LORENZETTI *et al.*, 2001).

1.1.2.3 *Papel das células residentes na dor inflamatória*

O importante papel desenvolvido pelas células residentes, como macrófagos e mastócitos, na sinalização da resposta inflamatória está bem esclarecido na literatura.

Os macrófagos são residentes nos tecidos e constituem as células de alarme do organismo (FERREIRA, 1980). Podem ser ativados por citocinas ou por interações imunológicas, como por exemplo, certos produtos bacterianos (LPS -Lipopolissacarídeo), e ainda, pela carragenina (Cg) e pelo zymosan (Zy). Uma vez ativados, são capazes de desencadear mecanismos de defesa por meio da síntese e liberação de inúmeras substâncias que participam dos eventos que ocorrem na reação inflamatória aguda. Dentre estas podemos citar enzimas, inibidores enzimáticos, fatores de coagulação, componentes do sistema complemento, intermediários reativos de oxigênio, derivados lipídicos e citocinas (IL-1, IL-6 e IL-8), além dos derivados do ácido araquidônico, (TAKEMURA e WERB, 1984; NATHAN, 1987; ADAMS e HAMILTON, 1989; LASKIN e PENDINO, 1995).

Quanto aos mastócitos, uma vez ativados, são eficazes em liberar substâncias pré-formadas como a histamina, serotonina, proteasas, heparina e TNF. Podem ainda sintetizar mediadores lipídicos derivados de precursores estocados na membrana das células ou em corpos lipídicos, tais como: prostaglandinas, leucotrieno e fator de ativação plaquetária. Mediante estímulo, possuem também a habilidade de iniciar a transcrição e translação de várias citocinas: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, TNF- α , MIP1- α e bFGF - fator de

crescimento básico de fibroblastos (SALVEMINI *et al.*, 1990; BISSONNETTE *et al.*, 1991; MANNAIONI *et al.*, 1991; MASINI *et al.*, 1991; SEITZ *et al.*, 1994).

Alguns achados demonstraram que a intensidade de neutrófilos que migram para a cavidade peritoneal de animais estimulados tanto com agentes exógenos (LPS, carragenina e zymosan) como endógenos (IL-1 e TNF- α) é proporcional ao número de macrófagos residentes presente nesta cavidade (DE SOUZA e FERREIRA, 1985; SOUZA *et al.*, 1988; CUNHA e FACCIOLLI *et al.*, 1990).

Foi demonstrado que a depleção de células residentes na cavidade peritoneal por meio de uma lavagem prévia foi capaz de reduzir de maneira significativa a atividade nociceptiva do zymosan e do ácido acético, mas não do iloprost (análogo estável de PGI₂). Em contrapartida, o pré-tratamento dos animais com tioglicolato para elevar a população de macrófagos, foi capaz de aumentar o número de contorções induzidas por esses estímulos (CUNHA e FERREIRA, 1986; RIBEIRO *et al.*, 2000; VALE, 2003).

Dados do nosso laboratório demonstraram o importante papel desenvolvido pelos mastócitos residentes no desenvolvimento da resposta dolorosa. Nesse estudo, que utilizou o modelo de contorções abdominais, a depleção de mastócitos peritoneais residentes de camundongos através do pré-tratamento com o composto 48/80 foi eficaz em inibir significativamente a atividade nociceptiva do zymosan e do ácido acético (RIBEIRO *et al.*, 2000).

1.1.2.4 Papel do óxido nítrico (NO) na dor inflamatória

O óxido nítrico (NO) é uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. É composto por um átomo de nitrogênio e um de oxigênio, apresentando um elétron desemparelhado, o que lhe confere a característica de ser altamente reativo com meia-vida de menos de 10 segundos, sendo assim rapidamente oxidado em nitrito e nitrato (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000; DUSSE, VIEIRA e CARVALHO, 2003).

Juntamente com a L-citrulina, o NO é sintetizado a partir da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) sob seus substratos, a L-arginina e o oxigênio molecular (MONCADA,

PALMER e HIGGS, 1991). Três isoformas distintas da NOS foram identificadas: duas expressas constitutivamente -a neuronal (NOS_n) e a endotelial (NOS_e)- produzindo NO em baixos níveis e uma induzida (NOS_i), expressa em altos níveis e em resposta à citocinas durante o desenvolvimento do processo inflamatório, isolada inicialmente em macrófagos (XIE *et al.*, 1992). As três isoenzimas são semelhantes estruturalmente, porém reguladas de modo diverso (NATHAN e XIE, 1994).

Os efeitos paradoxais do NO têm sido citados nos diversos estudos que envolvem esta molécula, em vários tecidos e nas mais diversas circunstâncias, exercendo seu papel tanto nas funções fisiológicas normais, como em situações de injúria tecidual.

Ainda é dúbio o efeito do NO sobre a nocicepção, já que alguns autores relatam um efeito pró-nociceptivo (MOORE *et al.*, 1991; MELLER *et al.*, 1994; SAKURADA *et al.*, 1996) enquanto outros relatam uma ação antinociceptiva (DUARTE e FERREIRA, 1992; SOUZA e PRADO, 2001; VALE *et al.*, 2006).

Duarte *et al.* (1992) demonstraram o envolvimento da via L-arginina/NO/GMPc no efeito antinociceptivo de drogas colinérgicas no modelo de hiperalgesia inflamatória em pata de rato. Esse estudo mostrou que o L-NMA, inibidor da síntese de NO, ou o azul de metileno, inibidor da guanilato ciclase solúvel, foram eficazes em bloquear a atividade analgésica da acetilcolina, enquanto seu efeito foi potencializado com a administração de MY5445, inibidor da fosfodiesterase do GMPc.

A administração de L-NAME, inibidor da síntese de NO, mostrou-se eficaz em inibir o efeito antinociceptivo do sildenafil, inibidor seletivo da fosfodiesterase-5, em modelo de contorção abdominal induzido por zymosan. Ainda nesse estudo, a administração de L-arginina, substrato do NO, foi capaz de reverter o efeito do L-NAME (VALE *et al.*, 2006).

Por outro lado foi demonstrado, nos modelos de contorção abdominal induzido por ácido acético, placa quente e teste de formalina, que a administração de L-NAME induziu um efeito antinociceptivo (MOORE *et al.*, 1991). Tais resultados foram ratificados por outros autores, onde o L-NAME foi eficaz em promover analgesia em modelo de nocicepção induzido por capsaicina (SAKURADA *et al.*, 1996).

Dependendo do modelo experimental e do nível de estímulo do NO, este pode exercer um papel tanto pró como antinociceptivo. Alguns dados do nosso laboratório apontam para um efeito dual do NO no modelo de incapacitação articular induzida por zymosan (ROCHA *et al.*, 1999). Contudo as controvérsias em relação ao efeito sobre a nocicepção do NO ainda carecem de investigações.

1.1.3 Artrite e Dor

A artrite é uma condição inflamatória que afeta as articulações do corpo e pode ser de etiologia variada. A artrite reumatóide (AR) é a forma de artrite mais estudada. Consiste em uma desordem autoimune crônica com um curso variável da doença, é caracterizada por inflamação de múltiplas articulações que frequentemente resulta em dor (SOLEHAN *et al.*, 2011; BIRNBAUM *et al.*, 2012). Em média 1% da população mundial é afligida pela AR, as mulheres em uma frequência de duas a três vezes maior que os homens (MORELAND, RUSSELL e PAULUS, 2001). No Brasil existem cerca de dois milhões de pessoas com a doença.

De natureza crônica e incapacitante a AR é um sério problema de saúde pública. Com a evolução da doença, os pacientes, que frequentemente são acometidos em seus anos mais produtivos, desenvolvem incapacidade para realizar suas atividades, tanto da vida diária como profissional, com importante e significativo impacto para o paciente e para a sociedade (MIJIYAWA, 1995; MORELAND, RUSSELL e PAULUS, 2001).

A produção excessiva de mediadores inflamatórios, liberados tanto por células residentes como por células do infiltrado inflamatório, exerce papel crucial na patogênese da AR (CONTE *et al.*, 2010). Radicais livres, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) e quimiocinas são os principais mediadores envolvidos nesse processo (MAINI *et al.*, 1999).

Ramos *et al.* (2001) realizaram um estudo avaliando os aspectos histológicos, histoquímicos e bioquímicos da cartilagem articular do joelho de ratos no modelo de artrite induzida por zymosan. Esse mesmo trabalho enfatiza as propriedades de um modelo

experimental ideal para o estudo da AR, validando o modelo de artrite por zymosan que preenche os requisitos descritos no trabalho de Oliver e Brann (1996).

Na patogênese da AR, além da reação inflamatória sinovial, há também o comprometimento da epífise óssea, gerando erosões em regiões próximas a áreas não recobertas pela cartilagem articular, ocorrendo também osteólise do córtex e reabsorção óssea. A cartilagem articular é resistente à lise inflamatória, com isso as alterações destrutivas são mais evidentes na junção com a sinóvia, zona de contato com o *pannus*. A lesão é caracterizada pela ativação dos condrócitos e reabsorção da matriz, mediante a ação das citocinas aí sintetizadas. Pesquisas envolvendo as citocinas interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) sugerem fortemente que elas exerçam um importante papel na patogênese da AR (NOURI, PANAYI e GOODMAN, 1994) e de alguns tipos de artrite experimental e, dentre eles, da artrite induzida por Zy (VAN DE LOO et al., 1995). Embora os antagonistas da IL-1 não sejam eficazes na prevenção da artrite induzida por antígeno intra-articular, parecem suprimir a ocorrência e a intensidade da fase aguda de artrite por Zy (GEGOUT et al., 1994). O fluido sinovial da AR contém altos níveis de IL-6, TNF- α e fator transformador de crescimento beta (TGF- β) (PILLINGER e ABRAMSON, 1995).

Zymosan (Zy) é um polissacarídeo derivado da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, uma substância capaz de induzir fenômenos flogísticos sistêmicos, amplamente utilizada em estudos farmacológicos. Zy tem sido bastante empregado em estudos de indução ao choque não séptico, por seus efeitos sistêmicos importantes, quando administrado por via parenteral ou via peritoneal, diferentemente do tipo de reação inflamatória induzida no ambiente intra-articular. Quando injetado na articulação de ratos, Zy promove inflamação e nocicepção com subaguda e persistente proliferação da sinóvia e degradação da cartilagem, reproduzindo a maioria dos achados da AR (ROCHA et al., 1999, ROCHA et al., 2002; Ramos et al., 2001; VALE et al., 2006; CHAVES et al., 2011). Na artrite induzida por Zy, há manifestações articulares que parecem associar um processo prostaglandina-2-dependente (dor, edema, febre) com efeitos agressivos à cartilagem articular relacionados com produção de IL-1 (GEGOUT et al., 1995; VAN DE LOO et al., 1995).

1.2 BISFOSFONATOS

1.2.1. Histórico

Estes compostos são quimicamente conhecidos desde meados do século XIX, quando a primeira síntese de seu protótipo foi datada em 1865 na Alemanha. No entanto, somente em 1897 o primeiro bisfosfonato, o etidronato, foi sintetizado (RODAN e FLEISCH, 1996; FLEISCH, 2007; WIDLER, JAHNKE e GREEN, 2012).

Os bisfosfonatos (BFs) constituem uma classe de drogas antirreabsortivas e que estruturalmente se assemelham aos pirofosfatos (P-O-P). Estes últimos são produtos normais do metabolismo ósseo humano (BONABELLO *et al.*, 2001; FLEISCH, 1981; FLEISCH, 2007).

Foi estudando os pirofosfatos que Fleisch e colaboradores descobriram os bisfosfonatos. Estes pesquisadores perceberam que *in vitro* os pirofosfatos ligavam-se fortemente ao fosfato de cálcio e eram eficazes em inibir tanto a formação como a dissolução de cristais de fosfato de cálcio. No entanto esse efeito não era observado *in vivo*, possivelmente justificado pela sua falta de estabilidade, visto que os mesmos sofriam rapidamente hidrólise em suas ligações P-O-P (FLEISCH, RUSSELL e FRANCIS, 1969; FLEISCH, 1981; LIN, 1996). Daí surgiu os bisfosfonatos, que são análogos sintéticos do pirofosfato em que um átomo de carbono substitui o átomo central de oxigênio (P-C-P). Dessa forma, os bisfosfonatos tornaram-se resistentes à hidrólise enzimática, sendo extremamente estáveis, apresentando alta afinidade pelos fosfatos de cálcio e pela hidroxiapatita, o principal componente ósseo (BONABELLO *et al.*, 2001; CLÉZARDIN, 2005; KAWABATA *et al.*, 2006; DIAZ-BORJON *et al.*, 2006; MAJKOWSKA *et al.*, 2009).

1.2.2 Aspectos gerais

Os bisfosfonatos são uma importante classe de drogas antirreabsortivas, que previnem a perda de massa óssea, usada para o tratamento de doenças com excesso de reabsorção óssea, tais como a doença do Paget, neoplasias malignas associadas à metástase óssea, osteoporose pós-menopausa entre outras (HARADA *et al.*, 2004; KAWABATA *et al.*,

2006; MONKKONEN *et al.*, 2006; SHU, YAMAMOTO e NAGASHIMA, 2006; JOURNÉ *et al.*, 2007; MARUOTTI *et al.*, 2012). Esses compostos agem inibindo a reabsorção óssea mediada por osteoclastos (DUNFORD *et al.*, 2001).

Apresentam pequena vida útil no plasma, mas se acumulam rapidamente aos tecidos ósseos mineralizados (WALKER *et al.*, 2002), minimizando assim, seus efeitos colaterais. Quando utilizado para tratamento neoplásico sua terapêutica é comumente realizada em associação a outros agentes quimioterápicos como um protetor ósseo e um inibidor do desenvolvimento tumoral. (COLEMAN, 2005).

De maneira geral os bisfosfonatos são bem tolerados durante o tratamento e cursam com baixos índices de efeitos colaterais de significado clínico. Porém, há relatos de casos de osteonecrose mandibular relacionado ao uso de bisfosfonatos (ZUAZAGA *et al.*, 2006).

1.2.3 Estrutura química

A sua capacidade em inibir a reabsorção óssea é dependente da presença de dois grupos fosfatos na cadeia P-C-P, que se faz necessário para interação com o alvo molecular no osteoclasto, assim como para se ligar ao mineral ósseo (ROGERS *et al.*, 1995; VAN BEEK *et al.*, 1998).

Contudo, o potencial anti-reabsortivo é determinado pela estrutura química e tridimensional das duas cadeias laterais, R₁ e R₂ anexado ao átomo de carbono central (**Figura 1**) (ROGERS *et al.*, 2000; DUNFORD *et al.*, 2001). Neste sentido, a ligação ao osso mineral é intensificada pela presença de um grupo hidroxil em R₁, mas é a configuração de R₂ que será determinante para os efeitos celulares dos bisfosfonatos e pela sua eficácia em inibir a reabsorção óssea (TENENBAUM *et al.*, 2002).

Os bisfosfonatos podem ser divididos em duas classes farmacológicas que diferem em relação à estrutura e mecanismo de ação: os que contêm um átomo de nitrogênio (BFs aminados), os de segunda e terceira geração, e os que não contêm o átomo de nitrogênio (BFs não-aminados), os de primeira geração (MONKKONEN *et al.*, 2006; JOURNÉ *et al.*, 2007). A principal diferença entre os dois grupos é a capacidade antirreabsortiva onde os BFs

aminados, como o ácido zoledrônico, são mais eficazes (DRAKE, CLARKE e KHOSLA, 2008).

Figura 1. Estrutura química do pirofosfato e do bisfosfonato

1.2.4 Mecanismo de ação

Todo bisfosfonato compartilha de uma mesma cadeia P-C-P, no entanto o grupo dos BPs aminados possui uma maior atividade anti-osteoclástica. Ambas as classes promovem apoptose, porém por mecanismos diferentes. (MONKKONEN *et al.*, 2006; JOURNÉ *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação dos BFs aminados parece estar associado à inibição de uma enzima no ciclo do mevalonato. Os BFs ligam-se e inibem a ação da Farnesil Pirofosfato Sintase (FPP sintase), enzima chave na regulação da via do ácido mavelonato essencial para a produção de colesterol, esteróis e lipídeos isoprenóides. A inibição desta enzima previne a modificação de importantes proteínas sinalizadoras com lipídios isoprenoides e a subsequente falta de proteínas prenidadas leva a perda da função osteoclástica, e consequentemente, a indireta morte celular apoptótica (JOURNÉ *et al.*, 2007; MONKKONEN *et al.*, 2006; RUSSELL *et al.*, 2007). Provavelmente, nessa classe de bisfosfonatos, a inibição da prenilação de proteínas parece ser o principal mecanismo de ação que leva ao efeito citotóxico. (LEHENKARI *et al.*, 2002; MONKKONEN *et al.*, 2006 ; JOURNÉ *et al.*, 2007).

O grupo de BFs não-aminados apresentam um mecanismo de ação diferente, não agem inibindo o ciclo do mevalonato. Esse grupo age incorporando-se nas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) pela classe II aminoacil-transferase da RNA sintetase encontrada na superfície óssea, sendo posteriormente captados pelos osteoclastos. Esses análogos não hidrolisáveis de ATP são citotóxicos e o seu acúmulo no interior da célula leva a apoptose da mesma (LEHENKARI *et al.*, 2002).

1.2.5 Ácido zoledrônico

O ácido zoledrônico é um bifosfonato de terceira geração (bisfosfonatos com nitrogênio associado), com massa molecular de 290.1g/mol. Quanto a sua estrutura química caracteriza-se por um grupo imidazole, contendo dois átomos de nitrogênio (DUNFORD *et al.*, 2001).

A síntese dos BFs aminados surgiu pela necessidade de aperfeiçoar o efeito antirreabsortivo dessa classe de drogas. Sendo considerados mais potentes aqueles que possuem um átomo de nitrogênio num anel heterocíclico, como o ácido zoledrônico, podendo ser até 10.000 vezes mais potentes que o etidronato, um BFs não aminado (DRAKE, CLARKE e KHOSLA, 2008).

O ácido zoledrônico é o único bisfosfonato aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de metástases osteoplásticas do câncer de próstata e recomendado pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) para o tratamento de câncer de mama com metástase óssea (COLEMAN, 2005).

Metástases ósseas são comuns em cânceres como o de mama, próstata, pulmão e nos mielomas múltiplos (RUBENS, 1998). Estas metástases produzem uma desregulação entre formação e reabsorção da matriz óssea, isto conduz a uma hipercalcemia e um enfraquecimento estrutural que cursa com lesões como fratura ou compressão da coluna vertebral em 8-30% dos pacientes com metástases ósseas (WALKER *et al.*, 2002). O ácido zoledrônico é o único bisfosfonato capaz de reduzir significativamente a morbidade dos pacientes com metástase óssea (PAPARELLA *et al.*, 2011).

1.2.6 Bifosfonatos e dor

Os bisfosfonatos podem ser considerados uma importante ferramenta terapêutica em associação com outras modalidades com osteólise marcante como o mieloma múltiplo e câncer de mama (FULFARO *et al.*, 1998). Nessas circunstâncias clínicas os bisfosfonatos se mostraram capazes de reduzir complicações esqueléticas, induzir o alívio da dor e melhorar a qualidade de vida (HORTOBAGYI *et al.*, 1996)

Alendronato, um BFs aminado, administrado por via endovenosa (e.v), ou por via oral, é capaz de reduzir a dor em pacientes com metástase óssea por carcinoma de próstata (ADAMI, 1997). Essa mesma droga dada por via e.v., reduziu a dor espontânea associada à síndrome da distrofia simpática reflexa (ADAMI *et al.*, 1997). Até pouco tempo atrás apenas um estudo foi realizado para determinar se o efeito analgésico está presente em situações dolorosas não relacionadas com patologias ósseas, onde o alendronato mostrou-se eficiente em inibir a dor visceral provocada pela injeção de ácido acético, no entanto não inibe a fase inflamatória do teste da formalina (GOICOECHEA *et al.*, 1999).

Um estudo mais recente demonstrou o efeito antinociceptivo do clodronato, alendronato e pamidronato em camundongos utilizando dois modelos diferentes (BONABELLO *et al.*, 2001).

Walker *et al.* (2002) demonstraram o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico em um modelo de câncer ósseo cursando com alodinia e hiperalgesia. O ácido zoledrônico age também como inibidor da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 (DERENNE *et al.*, 1999; SENARANTE *et al.*, 2000). As evidências clínicas apontam para uma atividade analgésica na dor associada ao câncer ósseo, além de seus efeitos diretos sobre as células cancerígenas. Estudos pré-clínicos desse efeito foi demonstrado em camundongos (BONABELLO *et al.*, 2001). No entanto, os estudos experimentais avaliando a atividade analgésica desse bisfosfonato não sugerem um mecanismo para o efeito. Kawabata *et al.* (2006), demonstraram o efeito anti-alodínico do etidronato em um modelo de artrite crônica e o possível envolvimento de canais de potássio ATP-dependentes no fenômeno.

Uma pesquisa realizada por Wong, Stockler e Pavlakis (2012) objetivou avaliar os efeitos dos bisfosfonatos sobre eventos ósseos relacionados, dor óssea, qualidade de vida,

recorrência e sobrevida em mulheres portadoras de câncer de mama. Nesse estudo concluiu-se que os bisfosfonatos são eficazes em reduzir os eventos ósseos relacionados, assim como retardar o desenvolvimento dos mesmos; concluíram também que alguns bisfosfonatos, entre eles o ácido zoledrônico, são eficazes em reduzir a dor óssea e melhorar a qualidade de vida.

Recentemente Paparella *et al.* (2011) concluíram que o tratamento com ácido zoledrônico de pacientes portadores de câncer de próstata com metástase óssea é eficaz em prevenir as complicações ósseas e em controlar os sintomas dolorosos. Outros autores tiveram conclusões similares, onde a terapia com o ácido zoledrônico também se mostrou eficaz tanto em reduzir complicações ósseas como no tratamento paliativo da dor em pacientes com o mesmo tipo de câncer (DEMIRTAS *et al.*, 2011).

Corroborando com os dados supracitados, um estudo randomizado avaliando o efeito do ácido zoledrônico sobre a dor articular em joelho de pacientes com diagnóstico clínico de osteoartrite e com lesão de medula óssea dessa articulação, concluíram que esse bisfosfonato se mostrou eficaz em minimizar a dor e em reduzir a área da medula óssea lesionada (LASLETT *et al.*, 2012).

1.3 JUSTIFICATIVA E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

A ocorrência de dor é crescente e, talvez, isso se deva aos novos hábitos de vida, ao aumento da longevidade, ao prolongamento da sobrevida de pacientes portadores de enfermidades naturalmente fatais e às modificações as quais o meio ambiente fora submetido nas últimas décadas. Além de proporcionar importante e significativo estresse para o doente e sua família, a dor é razão de fardos econômicos e sociais para a sociedade (TEIXEIRA e SIQUEIRA, 2009).

Tendo em vista os escassos trabalhos experimentais publicados com esse assunto associado às crescentes evidências clínicas de que os bisfosfonatos possuem atividade analgésica, o presente trabalho tem o intuito de investigar o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico em modelos experimentais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do ácido zoledrônico sobre a resposta nociceptiva inflamatória procurando identificar os possíveis mecanismos envolvidos em tal efeito.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar:

- O efeito do ácido zoledrônico sobre a nocicepção visceral e articular induzida por estímulos inflamatórios
- O efeito de ácido de zoledrônico sobre parâmetros inflamatórios em modelos de inflamação induzida por zymosan, tais como infiltração de leucócitos e edema
- Papel de citocinas no efeito do ácido zoledrônico sobre a nocicepção
- O envolvimento do óxido nítrico e canais de potássio ATP dependentes no mecanismo de ação do ácido zoledrônico

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

3.1.1 Ratos

Para realização do presente estudo foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*), machos, pesando entre 170 e 200 gramas (g), provenientes do Biotério Central do Campos do Pici - Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.1.2 Camundongos

Para a realização do presente estudo foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, pesando entre 25-35g, provenientes do Biotério Central do Campos do Pici - Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

Os protocolos experimentais utilizados no presente estudo seguiram as recomendações da UFC. A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, sendo aprovada de acordo com o protocolo 071/2007.

3.3 AMBIENTES

Os animais foram acondicionados, em número de 20-25 animais quando camundongos e em número de 5-6 animais quando ratos, em gaiolas de polipropileno, medindo 40 centímetros (cm) de comprimento, 31 cm de largura e 17 cm de altura. O fundo das gaiolas era coberto por raspas de madeira que eram trocadas duas vezes por semana; e o teto era constituído por uma grade de metal com um espaço para apoiar o bebedouro e a

ração. Os animais permaneciam em um ambiente com temperatura de 25°C, com exaustão de ar, em um ciclo de 12h claro/escuro, com acesso à água e comida *ad libitum*.

3.4. MODELOS EXPERIMENTAIS

Todos os experimentos, observações clínicas e comportamentais foram realizados entre 8 e 18h

3.4.1 Teste de contorções abdominais em camundongos

O modelo utilizado foi descrito anteriormente por COLLIER *et al* (1968). Foram utilizados camundongos. Zymosan (1mg/animal) foi injetado por via intraperitoneal (i.p.), os animais foram alocados em um grande funil e a intensidade de nocicepção foi quantificada pelo número total de contorções abdominais ocorridas nos primeiros 20 minutos após sua administração. Uma contorção sendo identificada como a extensão das patas traseiras acompanhada por contração do abdome. Um grupo de animais foi pré-tratado com ácido zoledrônico que foi administrado 30 minutos antes do zymosan por vias subcutânea e intraperitoneal com doses entre 10 e 300 µg/kg (*Figura 2*).

Figura 2. Ilustração do protocolo experimental do modelo de contorção abdominal

3.4.2 Teste de incapacitação articular em joelho de rato

O modelo foi descrito anteriormente por Tonussi e Ferreira (1992), posteriormente modificado (MAGALHÃES *et al.*, 1997; VIANA *et al.*, 1998) e adaptado para o nosso laboratório. Ratos Wistar machos foram pré-tratados com ácido zoledrônico (10 a 300 µg; i.p) 30 minutos antes de receberem a injeção intrarticular, no joelho posterior direito, de zymosan (1 mg/animal; 50 µl de salina) e foram postos para deambular forçadamente em um carrossel de piso metálico (cilindro de alumínio, 30 cm de diâmetro x 50 cm de largura, coberto por uma tela de alumínio nas mesmas proporções), giratório, com capacidade para 3 animais. A velocidade utilizada foi de 3 RPM. As patas traseiras foram calçadas com sapatilhas metálicas e a sapatilha da pata direita foi conectada à porta de dados de um microcomputador. Ao tocar a sapatilha direita no piso metálico fechava-se um circuito e ao final de 1 minuto o computador registrava o tempo de suspensão da pata (TSP), isto é, o tempo que o animal permaneceu com a pata direita levantada sem tocá-la no cilindro. O TSP foi medido antes da injeção do estímulo e de hora em hora até a 4ª hora. Um aumento do TSP indica nocicepção (incapacitação articular), isto é, a incapacidade do animal deambular normalmente sobre o carrossel (**Figura 3**). Antes da realização do ensaio os animais foram treinados, permitindo-se um período de deambulação e adaptação ao ambiente.

3.4.2.1 Coleta do tecido sinovial para análise imunohistoquímica

Os animais, ratos Wistar, foram pré-tratados com ácido zoledrônico (100 µg; ip) 30 min antes de receberem a injeção intrarticular de zymosan (1mg/50µl/ animal) no joelho posterior direito, após 4 horas foram anestesiados com hidrato de cloral (0,1ml/30g) e sacrificados por exsanguinação. A pele e os ligamentos articulares do joelho injetado foram removidos e procedeu-se remoção cirurgica do tecido sinovial. O tecido foi fixado em formol 10% e posteriormente em alcool 70%. As peças foram desidratadas e parafinizadas para corte e realização de lâminas

Figura 3. Ilustração do protocolo experimental do modelo de incapacitação articular em joelho de rato

3.4.2.2 Coleta do lavado articular de joelho de rato

Os animais foram pré-tratados com salina ou ácido zoledrônico (100 µg; i.p) 30 minutos antes de receberem a injeção intrarticular de zymosan (1mg/50µl/ animal) no joelho posterior direito, após 4 horas foram anestesiados com hidrato cloral e sacrificados por exsanguinação. A pele e os ligamentos articulares do joelho injetado foram removidos e procedeu-se a lavagem da cavidade articular pela injeção de 400 µl de salina heparinizada (40 UI/ml) através da membrana sinovial recolhendo-se o exsudato articular. As alíquotas foram colocadas em tubos ependorfs e centrifugadas. O sobrenadante foi estocado a -70°C para posterior análise.

3.4.2.3 Migração de células para a cavidade articular

O lavado articular foi coletado como descrito acima e 20 μ l foram retirados de cada amostra e colocados em 380 μ l de solução de Turk. O número total de células foi contado em câmaras de Neubauer com o auxílio de um microscópio ótico.

3.4.3. Edema de pata

Os animais, ratos Wistar, foram pré-tratados com salina ou ácido zoledrônico (100 μ g/kg; i.p.) 30 minutos antes da administração do estímulo inflamatório, que consistiu em injeção subplantar de carragenina (300 μ g/pata; 0,1ml) ou dextran (300 μ g/pata; 0,1ml) na pata traseira esquerda. O volume da pata traseira esquerda de cada animal foi mensurado usando pletismômetro (UGO BASILI) antes e a cada hora por 4 horas após a injeção do estímulo (**Figura 4**). O edema foi calculado como a variação de volume, isto é, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume da pata antes do mesmo.

Figura 4. Foto representativa da medida do edema de pata em um pletismógrafo

3.4.3.1 *Análise da permeabilidade vascular*

Azul de Evans foi medido quantitativamente por espectrofotometria. Os animais, ratos Wistar, foram pré-tratados com salina ou ácido zoledrônico (100µg/kg; i.p.) 30 minutos antes da administração de carragenina (300µg/pata; subplantar). Meia hora antes do sacrifício foi injetada por via e.v, na veia peniana, o corante Azul de Evans na dose de 25 mg/kg, dissolvido em salina. Os animais foram sacrificados na 4ª hora após a administração da carragenina e o tecido da pata foi retirado para análise do extravasamento do Azul de Evans. Baseado no método de extração de azul de Evans de Kwan, Hu e Sessle (1996), imediatamente após a extração do tecido, este foi pesado e imerso em solução de 2 mL de formaldeído, assim mantido “overnight”. O sobrenadante (100 µl) foi extraído, sua absorbância foi determinada através de espectrofotômetro em 630 nm, e sua concentração determinada pela comparação com uma curva padrão da mesma amostra. A quantidade de azul de Evans foi expressa em µg e calculada por peso da amostra.

3.4.3.2 *Ensaio de mieloperoxidase (MPO)*

Os animais foram pré-tratados com ácido zoledrônico (100 µg/kg) 1 hora antes da administração de salina ou carragenina (300µg/pata) por via sub-plantar na pata traseira direita de cada animal. Os animais foram sacrificados e o tecido da pata foi colhido 4 horas após a injeção do estímulo. As amostras foram estocadas a -70°C, em ependorfs de 1,5ml, para posterior dosagem da atividade de MPO. A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em grânulos azurófilos de leucócitos polimorfonucleares e tem sido usado como índice quantitativo para avaliar a inflamação em vários tecidos. Os níveis da atividade de MPO foram determinados por meio da técnica descrita por Bradley, Christensen e Rothstein (1982), utilizando peróxido de hidrogênio 0,0005 % como substrato para MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1µmol de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a água (H₂O) em 1 min a 22°C. No ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio foi degradado ocorreu a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianisidina em composto de cor marrom. A variação da densidade óptica da mistura das amostras com a solução de o-dianisidina em função do tempo de reação foi

medida por espectrofotômetro à 600nm. Os resultados foram expressos como unidade de MPO/ mg de tecido.

3.5 IMUNOHISTOQUÍMICA DO TECIDOS

As amostras histológicas do tecido sinovial e da pele de pata foram submetidas ao ensaio de imunohistoquímica com o objetivo de avaliar a participação de TNF no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico.

O ensaio de imunohistoquímica foi realizado na seguinte sequência: desparafinização e hidratação dos cortes, seguida da ativação antigênica (98°C por 15min) no microondas, inibição da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 10min. Em seguida as secções foram incubadas com os anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology) para o TNF, ficando *over night* a 4°C. O controle negativo não recebeu anticorpo primário. No dia seguinte foi realizada a incubação com o anticorpo secundário biotilado universal (LSAB - DAKO) durante 30 min e incubação com o complexo strepto-avidina-peroxidase (LSAB - DAKO) durante 30 min. A coloração foi realizada através da adição do diaminobenzidina-peróxido (DAB-H₂O₂), e foi realizada a contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Então foi realizada a desidratação e montagem das lâminas, que foram examinadas no microscópio Leica® e registradas as fotografias dos cortes obtidos.

3.6 OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES DE CAMUNDONGOS ESTIMULADOS *IN VIVO* COM ZYMOSAN

Os macrófagos foram estimulados *in vivo*. Para isso, camundongos pré-tratados, 30 minutos antes, com ácido zoledrônico (30 µg/kg; i.p e e.v) receberam injeção por via intraperitoneal de salina ou zymosan (1mg/animal) e após 15 minutos foram sacrificados em

câmara de éter. A cavidade peritoneal foi lavada com 2ml de meio de cultura RPMI completo em ambiente asséptico (fluxo laminar). Colheu-se o exsudato e este foi colocado em uma placa de cultura (1 poço por animal). Foram encubados por 12h em estufa de CO₂ a 37°C, em uma atmosfera de 5%. Após a adesão dos macrófagos os sobrenadantes foram colhidos e estocados a -70°C para posterior dosagem de citocinas.

3.7. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

O ensaio imunoenzimático foi realizado nas amostras de lavado articular e sobrenadante de cultura de macrófagos previamente estocado. Resumidamente, placas para ELISA foram incubadas por 12h a 4°C com anticorpo primário (10 µg/ml). Após bloqueio das placas, as amostras e a curva padrão foram adicionadas em duplicata em várias diluições e incubadas por 24h a 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com solução tampão e incubadas com anticorpo monoclonal biotilado 1:1000 (100 µl/ well). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 1h, as placas foram lavadas e 100 µL do complexo HRP-avidina diluído 1:5000 foram adicionados. O reagente de cor 0-fenilenodiamina (OPD, 50µL) foi adicionado 15min depois e as placas foram incubadas no escuro a 37°C por 15 a 20min. A Reação enzimática foi parada com H₂SO₄ e a absorbância medida a 490nm.

3.8 ESTUDO DA VIA L-Arg/NO/GMPc/KATP NO EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE A NOCICEPÇÃO

No modelo de contorções abdominais foi investigada a melhor via de administração e a participação do NO e de canais de potássio ATP dependentes

Para avaliar o papel do óxido nítrico sobre a atividade do ácido zoledrônico os animais foram pré-tratados com L-NAME (inibidor não seletivo da enzima oxido nitrico sintase, 30 mg/kg; s. c.) ou aminoguanidina (inibidor seletivo da enzima oxido nitrico sintase

induzida a 10, 30 e 100 mg/kg; s.c.), 30 minutos antes injeção do ácido zoledrônico (30 µg/kg; i. p.). Zymosan (1 mg/animal) foi administrado 30 minutos depois da injeção de ácido zoledrônico. Um grupo controle foi realizado da mesma maneira com administração de L-arginina (200 mg/kg; i. p.) 5 min antes da injeção de L-NAME. Em outro grupo de animais foram injetado somente L-arginina (200 mg/kg; i. p.) ou somente L-NAME (30 mg/kg; s. c.) antes da administração de zymosan. O número de contorções foi contada como descrito.

O papel dos canais de potássio ATP dependentes sobre a atividade do ácido zoledrônico foi avaliado utilizando fármacos envolvidos nessas vias. Para isso os animais foram pre-tratados com glibenclamida (1mg/kg; i.p), um bloqueador específico dos canais de potássio ATP dependentes ou com salina 45 minutos antes da administração do ácido zoledrônico (30 µg/kg; i. p.). Outros grupos de animais receberam diazóxido, ativador de canais ATP dependentes (10 mg/kg; s.c) ou veículo 20 minutos antes da administração de glibenclamida (1mg/kg; i.p) ou diazóxido (10 mg/kg; s.c) mais veículo. Em ambos os grupos foi seguido a injeção de estímulo, zymosan (1mg/animal; i.p). Durante os 20 primeiros minutos após o estímulo o número de contorções foi contado, como descrito acima.

3.9 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ZYMOSAN NO TESTE DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM JOELHO DE RATO

Nesse modelo experimental o ácido zoledrônico (100 µg/kg; i.p. ou i.a.) foi administrado uma hora após a injeção de uma subdose de zymosan (250µg/articulação; 50µl) ou salina (50µl por articulação). A intensidade da incapacitação articular foi medida pelo tempo de suspensão da pata em segundos, o qual foi mensurada durante 1 min antes e a cada hora até a 4ª hora após a administração do zymosan.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM). As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA) e a significância entre os grupos estabelecida pelo teste Turkey. O número (N) de animais por grupo experimental foi no mínimo 5. A significância mínima aceita foi de $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ZYMOSAN NO TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS

As contorções abdominais foram realizadas de acordo com o protocolo supracitado. Os resultados obtidos demonstram que, dentre os grupos experimentais testados, todos os grupos que receberam ácido zoledrônico inibiram as contorções abdominais induzidas por zymosan com resultados significativos ($p < 0,01$) com 88% de inibição máxima para a dose de 30µg/kg.

Porém não houve diferença estatística entre as várias doses testadas (10, 30 e 100µg). Com relação as vias de administração testadas (endovenosa, subcutânea e intraperitoneal) apenas as vias endovenosa e intraperitoneal demonstraram diferenças estatísticas ($p < 0,01$) não existindo diferenças quando comparadas uma com a outra (**Figura 5 A e B**).

4.2 EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ZYMOSAN NO TESTE DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM JOELHO DE RATO

O ácido zoledrônico na dose de 100 µg/kg por via i.p foi capaz de inibir em 47,7% de modo significativo ($p < 0,05$) a incapacitação articular induzida pela injeção intrarticular de zymosan. Esse efeito também foi observado quando o ácido zoledrônico foi administrado localmente, por via intrarticular (**Figura 6 e Figura 7**).

Não observamos diferenças estatísticas entre a administração intrarticular e a intraperitoneal com 41% e 52%, respectivamente de inibição com relação ao grupo controle.

Figura 5. Efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico sobre as contorções abdominais induzidas por zymosan. Ácido zoledrônico (10 a 100 µg; ip; painel A) ou 30µg/kg por via endovenosa (EV), subcutânea (SC) ou intraperitoneal (IP) (painel B) foi administrado 30 min antes do Zymosan (1 mg/animal; ip). O número de contorções abdominais foi contado durante 20 min. As barras representam a média ± E.P.M. do número de contorções, n=6, *p<0.05, ** p<0,01 (ANOVA seguido do teste de Turkey).

Figura 6. Efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico no teste da incapacitação articular induzido por zymosan. Ácido zoledrônico (10 a 300 µg; ip) foi administrado 30 min antes do Zymosan (1 mg/animal; intrarticular). A intensidade de incapacitação articular foi medida pelo tempo de suspensão da pata em segundos, o qual foi mensurado durante 1 min antes e a cada hora até a 4ª hora após a administração do zymosan. As barras representam a média $\pm$ EPM dos maiores valores do tempo de suspensão da pata em segundos obtidos na 3ª e 4ª horas de medida. * $p < 0.05$ (ANOVA seguido do teste de Turkey).

Figura 7. Efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico por via intrarticular no teste da incapacitação articular induzido por zymosan. Salina (S) ou ácido zoledrônico (Ac. Zol; 100 µg/kg) foi administrado por via intraperitoneal ou por via intrarticular 30 min antes do Zymosan (1 mg/animal; intrarticular). A intensidade de incapacitação articular foi medida pelo tempo de suspensão da pata em segundos, o qual foi mensurado durante 1 min antes e a cada hora até a 4ª hora após a administração do zymosan. As barras representam a média ±EPM dos maiores valores do tempo de suspensão da pata em segundos obtidos na 3ª e 4ª horas de medida. *p<0.05 (ANOVA seguido do teste de Turkey)

4.3 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NO MODELO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS

No intuito de avaliar a participação do óxido nítrico no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico foi realizado experimentos de contorções abdominais com animais tratados previamente com L-NAME (inibidor não seletivo da enzima oxido nitrico sintase) ou aminoguanidina (inibidor seletivo da enzima oxido nitrico sintase induzida) e L-Arginina (substrato para síntese de óxido nítrico) antes da injeção do ácido zoledrônico. Os resultados obtidos demonstram que o ácido zoledronico tem efeito antinociceptivo sobre o zymosan ($p<0,05$) e que o L-NAME (Figura 8) e aminoguanidina (**Figura 8**) significativamente reverterem este efeito em 93% para o L-NAME e em 103% para o efeito aximo da aminoguanidina na dose de 30 mg/kg ($p<0,05$).

O pré-tratamento com L-arginina antes da administração de L-NAME previne o efeito do L-NAME sobre a antinocicepção do ácido zoledrônico. L-arginina quando administrada sem o L-NAME não modifica o efeito antinociceptivo de ácido zoledrônico (**Figura 9**). Esses dados sugerem que provavelmente o óxido nítrico deve estar envolvido no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico.

Figura 8. Aminoguanidina reverte o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico no modelo de contorções abdominais induzidas por zymosan O animais form pré-tratados com aminoguanidina (10, 30 e 100 mg/kg; sc) ou salina (S) 30 min antes do ácido zoledrônico (30 µg/kg; ip). O ácido zolerônico foi administrado 30 min antes do zymosan (1 mg/animal; ip). O numero de contorções abdominais foi contado durante 20 min. A barras representam a média ± E.P.M. do numero de contorções, n=6,*p<0.05 com relação ao grupo controle (C) e #p<0,05 com relação ao grupo tratado com Ac. Zoledrônico e salina (S) (ANOVA seguido do teste de Turkey).

Figura 9. L-NAME reverte o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico no modelo de contorções abdominais induzidas por zymosan. Os animais foram pré-tratados com L-NAME (30 mg/kg; sc) ou salina (S) 30 min antes do ácido zoledrônico (30 µg/kg; ip). L-arginina (L-ARG; 200 mg/kg, ip) ou salina (S) foi administrada 5 min antes do L-NAME. O ácido zoledrônico foi administrado 30 min antes do zymosan (1 mg/animal; ip). O número de contorções abdominais foi contado durante 20 min. As barras representam a média ± E.P.M. do número de contorções, n=6, *p<0,05, ** p<0,01 com relação ao grupo controle (C) e #p<0,05 com relação ao grupo tratado com ácido zoledrônico e salina (S) (ANOVA seguido do teste de Turkey).

4.4 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO ATP DEPENDENTES NO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO NO MODELO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS

No intuito de avaliar a participação dos canais de potássio ATP dependentes no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico foi realizado experimentos utilizando o bloqueador de canais de potássio ATP dependente, glibenclamida, e também uma substância promotora da abertura dos canais de potássio, diazóxido, como tratamentos prévios à administração do ácido zoledrônico. Os resultados obtidos demonstram que o ácido zoledrônico tem efeito antinociceptivo sobre o zymosan ($p < 0,05$) e que o glibenclamida significativamente reverte este efeito ($p < 0,05$) em 71,7% demonstrando número de contorções dos animais semelhantes aos que receberam somente zymosan.

O pré-tratamento com diazóxido antes da administração de glibenclamida previne o efeito da glibenclamida sobre a antinocicepção do ácido zoledrônico. Diazóxido quando administrado sem glibenclamida não modifica o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico. Esses dados sugerem que provavelmente os canais de potássio ATP dependentes estão envolvidos no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico (*Figura 10*).

4.5 EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE O EDEMA DE PATA

Para investigar um possível efeito antiinflamatório do ácido zoledrônico foi realizado inicialmente o modelo de edema de pata por carragenina e dextran. Nós observamos que o pré-tratamento com o ácido zoledronico no edema de pata induzido por carragenina, demonstrou uma tendência a amplificação, entretanto não houve diferenças significativas entre os grupos (*Figura 11 A*).

O ácido zoledronico não modificou o edema induzido por dextran (*Figura 11 B*).

Figura 10. Glibenclamida reverte o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico no modelo de contorções abdominais induzidas por zymosan. Os animais foram pré-tratados com salina (S) ou glibenclamida (GLIB; 1 mg/kg; via oral) 30 min antes do ácido zoledrônico (30 µg/kg; ip). Diazóxido (1 mg/kg, ip) foi administrado 30 min antes da glibenclamida ou veículo (V). O ácido zoledrônico foi administrado 30 min antes do zymosan (1 mg/animal; ip). As barras representam a média ± E.P.M. do número de contorções, n=6, *p<0.05 com relação ao grupo controle (C) e #p<0,05 com relação ao grupo tratado com ácido zoledrônico e salina (S) (ANOVA seguido do teste de Turkey).

Figura 11. Efeito do ácido zoledrônico sobre o edema de pata induzido por carragenina e dextran em ratos. Salina ou ácido zoledrônico (100μg/kg; i.p.) foi administrado 30min antes da carragenina (300μg/pata; subplantar) ou 30 minutos antes da administração de dextran (300μg/pata; subplantar). O edema foi medido antes do estímulo e uma vez a cada hora por quatro horas. Os pontos representam a média ± E.P.M. da variação do volume (Δ, diferença entre o volume inicial e o final) da pata em ml.

4.6 EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE A PERMEABILIDADE VASCULAR EM PATA DE RATOS ESTIMULADAS COM CARRAGENINA

O efeito do pré-tratamento com ácido zoledrônico foi avaliado sobre o aumento de permeabilidade vascular induzida por carragenina. A análise dos resultados demonstra que o ácido zoledrônico não influencia o aumento de permeabilidade vascular induzido por carragenina, quando comparado ao grupo controle (*Figura 12*).

4.7 EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM PATA DE RATO INDUZIDO POR CARRAGENINA - ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO).

A MPO é uma enzima presente nos grânulos intracelulares dos neutrófilos. Sua atividade tem sido usada como índice quantitativo para avaliar a infiltração neutrofílica em vários tecidos. Os nossos resultados demonstram que o ácido zoledrônico não inibe sua atividade de MPO. Isso foi observado pelo pré-tratamento sistêmico de ácido zoledrônico (100 µg/kg) quando comparado com o grupo salina e com o grupo que recebeu apenas o estímulo com carragenina (300µg/pata) (*Figura 13*).

4.8 EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS PARA A CAVIDADE ARTICULAR INDUZIDA POR ZYMOSAN

Para avaliar o efeito do pré-tratamento com o ácido zoledrônico sobre a migração de células na artrite por zymosan o líquido sinovial foi coletado 6 horas após a injeção intrarticular de zymosan (pico de influxo celular na cavidade articular). Nossos resultados mostram que o ácido zoledrônico não modifica o influxo de células para a cavidade articular quando dado por via sistêmica e nem quando injetado localmente (intrarticular) (*Figura 14*).

Figura 12. Efeito do pretratamento com ácido zoledrônico sobre o aumento de permeabilidade vascular induzido por carragenina em pata de ratos. Salina (S) ou ácido zoledrônico (Ac. Zol.; 100 µg/kg; i.p.) foi administrado 30 min antes da carragenina (300 µg/pata; subplantar). O grupo controle (C) recebeu injeção subplantar de salina (0,2 µl). 30 minutos antes do sacrifício foi injetado por via endovenosa o corante Azul de Evans. Os animais foram sacrificados na 4ª hora após a administração da carragenina e o tecido da pata foi retirado para análise do extravasamento do Azul de Evans. As barras representam a média ± EPM. da concentração de azul de Evans (µg) por mg de tecido. *p < 0.05 (ANOVA seguido do teste de Turkey).

Figura 13. Efeito do ácido zoledrônico sobre a atividade de MPO em pata de rato estimulados com carragenina. Salina (S) ou Carragenina (C; 300µg/pata) foi injetada por via sub-plantar na pata traseira direita de cada animal 30 minutos após a administração de ácido zoledrônico (100 µg/kg). Os animais foram sacrificados e o tecido da pata foi colhido 4 horas após a injeção. A medida da atividade de MPO foi realizada após 1 minuto do início da reação colorimétrica. As barras representam a média $\pm$ EPM. da atividade de MPO em unidade /mg de tecido. * $p < 0.05$ com relação ao grupo S (ANOVA seguido do teste de Turkey).

Figura 14. Efeito do ácido zoledrônico sobre a migração de células para a cavidade articular de joelhos de ratos estimulados com zymosan. Salina ou ácido zoledrônico (100 ug/kg) foi administrado por via intraperitoneal ou por via intrarticular 30 min antes do Zymosan (1 mg/animal; intrarticular). A contagem total de células foi realizada em amostras de fluido articular coletadas 6 horas após a injeção do zymosan. As barras representam a média $\pm$ EPM do número de células x 10⁶/ml de fluido coletado.

4.9 EFEITO DO ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS (IL-1 E IL-10) INDUZIDAS POR CARRAGENINA EM PATA DE RATO

A dosagem de citocinas foi realizada em sobrenadante do homogenato da pele de patas de ratos pre-tratados com ácido zoledrônico (100 µg/kg) e injetados com carragenina supplantar. Nossos resultados mostram que a carragenina induziu de modo significativo ($p<0,001$) os níveis da citocina pró-inflamatória, IL-1, em 257% mas não modificou os níveis da citocina antiinflamatória IL-10. O pre-tratamento com ácido zoledrônico inibiu de modo significativo ($p<0,01$) a produção de IL-1, em 35% mas não teve efeito sobre a produção de IL-10 (*Figura 15*).

4.10 DOSAGEM DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS ESTIMULADOS IN VIVO COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO E ZYMOSAN

A dosagem de citocinas foi realizada no sobrenadante de cultura das células colhidas da cavidade peritoneal de camundongos tratados pelo protocolo descrito para o teste de contorções abdominais. Foram dosados as citocinas TNF e KC (quimiocina semelhante a IL-8 humana) o sobrenadante da cultura de células que foram colhidas desses animais. Os resultados obtidos demonstram que níveis elevados de TNF e da quimiocina KC são observados nas amostras colhidas de animais pré-tratados com salina e estimulados com zymosan quando comparadas as amostras colhidos de animais normais.

O pré-tratamento com o ácido zoledronico diminui significativamente ($p<0,05$) os níveis tanto de TNF (*Figura 16A*) como de KC (*Figura 16B*) por via intraperitoneal como por via endovenosa.

Figura 15. Efeito do pré-tratamento com ácido zoledrônico sobre a produção de citocinas (IL-1 e IL-10) induzidas por carragenina em pata de rato. Salina (C) ou Carragenina (300µg/pata) foi injetada por via sub-plantar na pata traseira direita de cada animal. Ácido zoledrônico (Ac. Zol.; 100 µg/kg; i.p.) ou salina (S) foi administrado 30 min antes da carragenina. Os animais foram sacrificados e o tecido da pata foi colhido 4 horas após a injeção. As citocinas foram dosadas por ELISA no sobrenadante do homogenato do tecido colhido. As barras representam as médias da concentração de IL-1 (painel A) e IL-10 (painel B) em pg/ml $\pm$ EPM. de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Turkey).

Figura 16. Efeito do ácido zoledrônico sobre a produção de citocinas (TNF- α e KC) por células peritoneais residentes coletadas de animais pré-tratados com ácido zoledrônico e estimulados com zymosan. As amostras analisadas são líquidos sobrenadante de cultura de macrófagos peritoneais que foram coletados de camundongos estimulados com zymosan (1 mg/animal; ip) e pré-tratados 30 min antes com ácido zoledrônico (30 µg/kg; ip e ev). As barras representam as médias dos níveis de TNF (painel A) e KC (quimiocina; painel B) $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste de Turkey).

4.11 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA TNF α EM TECIDO SINOVIAL DE JOELHO DE RATO SUBMETIDOS À ARTRITE POR ZYMOSAN E EM PELE DE PATA DE RATOS ESTIMULADAS COM CARRAGENINA SUBPLANTAR

A imunohistoquímica realizada em tecido sinovial de joelho de rato e em pele de pata de rato, para detecção da citocina TNF- α , mostrou que o zymosan e a carragenina induziram o aumento da imunomarcção para TNF- α , principalmente na região de membrana sinovial e no tecido conjuntivo da pele.

O pré-tratamento com o ácido zoledrônico foi capaz de inibir a expressão de TNF- α tanto em animais submetidos à artrite por zymosan como em animais injetados com carragenina subplantar (*Figuras 17 e 18*).

Figura 17. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) no tecido sinovial de joelho de ratos submetidos à artrite induzida por zymosane pré-tratados com ácido zoledrônico. Os animais foram pré-tratados com salina ou ácido zoledrônico (100 μ g/kg) 30 minutos antes da injeção de zymosan (1 mg/animal) As sinóvias foram retiradas após 4 horas da injeção de zymosan para detecção de TNF- α por imunohistoquímica (aumento de 400X). Controle negativo, sinóvia submetida à artrite por zymopsan na ausência do anticorpo primário anti-TNF- α (A); Sinóvia de um animal naive mostrando discreta marcação para TNF- α (B); sinóvia de animal estimulada com zymosan, mostrando intensa marcação para TNF- α (C); sinóvia de animal pré-tratado com ácido zoledrônico, mostrando redução relevante da marcação para TNF- α (D).

Figura 18. Fotomicrografias da marcação por imunohistoquímica do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) da pele de pata de ratos estimuladas com carragenina subplantar, e pré-tratados com ácido zoledrônico. Os animais foram pré-tratados com salina ou ácido zoledrônico (100 μ g/kg) 30 minutos antes da injeção de carragenina (300 μ g/pata) As peles das patas foram retiradas após 4 horas da injeção de carragenina para detecção de TNF por imunohistoquímica (aumento de 100X, A, C e E; Aumento de 400x B, D e F). Controle negativo, animal injetado com carragenina na ausência do anticorpo primário anti- TNF- α (A e B); animal injetado com carragenina, mostrando intensa marcação para TNF- α (C e D); animal pré-tratado com ácido zoledrônico, mostrando redução relevante da marcação para TNF- α (E e F).

4.12 EFEITO DO PÓS-TRATAMENTO COM ÁCIDO ZOLEDRÔNICO SOBRE A ATIVIDADE NOCICEPTIVA DO ZYMOSAN NO TESTE DE INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM JOELHO DE RATO

Nós buscamos investigar o efeito do pós-tratamento com ácido zoledrônico sobre a atividade nociceptiva do zymosan no teste de incapacitação articular. O ácido zoledrônico foi administrado uma hora após zymosan, o qual foi injetado uma subdose (25% da dose cheia), com o intuito de evidenciar uma possível amplificação da sua resposta. A dose de 250µg de zymosan por articulação não é suficiente para induzir uma incapacitação articular significativa (*Figura 19*).

Entretanto, quando administramos ácido zoledrônico uma hora após a subdose de zymosan nós pudemos observar uma incapacitação articular que mimetiza uma dose cheia, sugerindo que o ácido zoledrônico amplificou o efeito nociceptivo do zymosan. Conseqüentemente, o ácido zoledrônico (i.p.) induz significativamente ($p<0.05$) um aumento de 123% na atividade nociceptiva do zymosan na quarta hora após a indução da artrite subclínica

Figura 19. Efeito do pós-tratamento com ácido zoledrônico sobre a incapacitação articular induzida por zymosan. Ratos foram injetados com salina (C) ou ácido zoledrônico (100µg/kg; i.p. ou i.a.) 1 hora após a administração de zymosan (250ug/articulação; 50µl) ou salina (50µl por articulação). A intensidade de incapacitação articular foi medida pelo tempo de suspensão da pata em segundos, o qual foi mensurado durante 1 min antes e a cada hora até a 4ª hora após a administração do zymosan. As barras representam a média $\pm$ EPM dos maiores valores do tempo de suspensão da pata em segundos obtidos nas horas de medida. Os asteriscos indicam diferenças estaticamente significantes entre os grupos e o grupo C (* p <0.05; ANOVA seguido do teste de Turkey).

5. DISCUSSÃO

Grandes avanços da medicina na abordagem ao paciente oncológico ocorreram nas últimas décadas. O surgimento de uma série de novas possibilidades terapêuticas como manipulações genéticas e imunológicas, inibição de angiogênese, além de uma variedade de novas associações de drogas culminaram em significativas respostas terapêuticas e aumento da sobrevida dos pacientes em tratamento oncológico.

Concomitantemente ao aumento da sobrevida de tais pacientes, aumenta-se também o sintoma mais temido pelo paciente oncológico, a dor. Esse sintoma atinge aproximadamente 50% de todos os pacientes portadores de neoplasia maligna em alguma fase de sua doença, elevando-se para 70% ao se tratar de pacientes em estágios avançados da doença (MELO e PINTO FILHO, 2009).

Os bisfosfonatos constituem uma importante classe de drogas com potente poder de inibição da reabsorção óssea, sendo largamente utilizados como agentes terapêuticos de doenças ósseas metabólicas, tais como: a doença do Paget, tumor associado à osteólises e osteoporose pós-menopausa (KAWABATA *et al.*, 2006; MONKKONEN *et al.*, 2006; JOURNÉ *et al.*, 2007; SHU, YAMAMOTO e NAGASHIMA, 2006; HARADA *et al.*, 2004; DE LUCA *et al.*, 2011). Dentre os bisfosfonatos, o ácido zoledrônico é único que se mostrou eficaz em reduzir e em retardar eventos ósseos associados em pacientes com câncer renal ou prostático avançado com metástase óssea (POLASCIK e MOURAVIEV, 2008). É também o único bisfosfonato aprovado pelo FDA para o tratamento de metástases osteoplásticas do câncer de próstata e recomendado pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) para o tratamento de câncer de mama com metástase óssea (COLEMAN, 2005).

Evidências clínicas apontam a eficácia do ácido zoledrônico, dentre a classe de bisfosfonatos, na diminuição da dor do câncer ósseo. Recentemente, vários autores reportaram que além do efeito benéfico sobre o câncer ósseo, há também um efeito positivo quanto à inibição da dor associada a estas metástases (POLASCIK e MOURAVIEV, 2008; COSTA e MAJOR, 2009; AFT, 2011; WOLFE *et al.*, 2011; CHOUDHURY *et al.*, 2011). Experimentalmente foi demonstrado que o ácido zoledrônico possui efeito antinociceptivo em modelo de câncer ósseo em ratos, em modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) e em modelo de dor neuropática por constrição

nervosa (WALKER *et al.*, 2002). Em adição, vários outros autores demonstraram o efeito antinociceptivo de outros bisfosfonatos, como alendronato (GOICOCHEA *et al.*, 1999), etidronato (KAWABATA *et al.*, 2006), risedronato (CARVALHO *et al.*, 2006), clodronato e pamidronato (BONABELLO *et al.*, 2001).

Diante de tais dados clínicos e experimentais, procuramos estudar o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico em modelos experimentais de dor inflamatória, bem como o possível mecanismo envolvido neste efeito.

Nesse sentido, foi utilizado o modelo de contorções abdominais e incapacitação articular em joelho de ratos. O teste de contorções abdominais, descrito por Collier *et al.* (1968), extensivamente estudado e validado vem sendo utilizado por nosso grupo em diversos estudos. Como estímulo inflamatório escolhemos o zymosan por seus efeitos estarem bem esclarecidos na literatura. Trata-se de um polissacarídeo derivado da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, uma substância que induz fenômenos flogísticos sistêmicos, amplamente empregada em estudos farmacológicos. Zymosan tem sido bastante empregado em estudos de indução ao choque não séptico, por seus efeitos sistêmicos importantes, quando inoculado por via parenteral ou via peritoneal, diferentemente do tipo de reação inflamatória induzida no ambiente intra-articular. Ademais, zymosan apresenta também a propriedade de induzir inflamação e nocicepção quando injetado na articulação de ratos, com subaguda e persistente proliferação da sinóvia e degradação da cartilagem, reproduzindo a maioria dos achados da artrite reumatoide (AR) (ROCHA *et al.*, 1999; ROCHA *et al.*, 2002; VALE *et al.*, 2006).

Quando administrado zymozan apresenta capacidade de induzir o extravasamento de proteínas plasmáticas e de infiltrados de células inflamatórias, culminando em uma cascata de eventos que incluem ativação de vias do sistema complemento, geração de produtos do metabolismo do ácido araquidônico e degranulação de mastócitos. (DOHERTY *et al.*, 1985; RAO *et al.*, 1994).

Na presente investigação farmacológica foi demonstrado que o ácido zoledrônico inibiu de maneira significativa a hiperalgesia inflamatória induzida pelo zymosan em dois modelos experimentais de dor inflamatória: contorções abdominais em camundongos e

incapacitação articular em joelho de rato. No teste de contorção abdominal os resultados obtidos demonstram que, dentre os grupos experimentais testados, todos os grupos que receberam ácido zoledrônico inibiram as contorções abdominais induzidas por zymosan com inibição máxima para a dose de 30µg/kg e que a melhor via de administração foi a intra-peritoneal.

Bonabello *et al.* (2000), investigaram o efeito antinociceptivo de quatro bisfosfonatos: clodronato, alendronato, pamidronato e etidronato. Nesse estudo, utilizando o modelo de contorções abdominais, ficou demonstrado o efeito antinociceptivo do clodronato e do pamidronato.

O modelo de incapacitação articular foi Inicialmente descrito por Bustamente (1982) e modificado por Tonussi e Ferreira (1992), que substituíram o estímulo, ácido úrico, por carragenina e eliminaram a subjetividade do observador ao introduzir no modelo um sistema automático de aquisição de dados. Posteriormente, em nosso laboratório, tal modelo foi readaptado substituindo-se novamente o estímulo inflamatório, desta vez por zymosan. (MAGALHÃES *et al.*, 1997; VIANA *et al.*, 1998)

A inflamação articular induzida por zymosan em joelho de ratos caracteriza-se pela liberação de mediadores inflamatórios e pela acentuada migração celular, além da hiperalgesia desenvolvida. Em consequência da artrite induzida pelo zymosan, os animais desenvolvem uma alteração da marcha, que foi denominada incapacitação articular. Após a injeção de tal estímulo, os animais desenvolvem de maneira progressiva incapacitação articular que tem início na segunda hora e é máxima entre a terceira e quarta hora. Ocorre ainda um acentuado aumento da permeabilidade vascular, o que leva a formação de edema e acentuado influxo celular, com predomínio de polimorfonucleares (ROCHA *et al.*, 1999).

A nocicepção induzida por zymosan no teste de incapacitação articular em joelho de ratos pode ser mensurada a partir do tempo de suspensão da pata em segundos quando os animais são colocados para andar no carrossel metálico, como descrito anteriormente no material e métodos. Baseado em dados anteriores (ROCHA *et al.*, 1999; VALE *et al.*, 2003) a dose escolhida foi de 1mg/animal, já que esta se mostrou capaz de induzir artrite e apresentou efeito máximo nociceptivo no modelo descrito. Como o aparelho mensura apenas o tempo de

suspensão da pata traseira direita de cada animal durante um minuto, todos os animais foram testados antes da administração do estímulo algio gênico (tempo zero) para determinar esse tempo em uma deambulação normal. Os resultados são mostrados em forma de delta (Δ) onde o valor de cada medida é subtraído do tempo zero, desta forma fica mais nítido o real tempo de incapacitação articular. Trata-se de um fácil modelo experimental que possibilita o estudo de drogas analgésicas periféricas e de origem central (TONUSSI e FERREIRA, 1992; MAGALHÃES *et al.*, 1997). Adicionalmente, tal modelo permite a mensuração de parâmetros inflamatórios por meio da coleta do exsudato articular para avaliação da migração leucocitária e dosagem de mediadores liberados no local da inflamação.

O ácido zoledrônico na dose de 100 $\mu\text{g/kg}$ também se mostrou eficaz em inibir a incapacitação articular em joelho de ratos induzido por zymosan, tanto por via sistêmica como por via intrarticular.

Mais recentemente, Kawabata *et al.* (2006), demonstraram o efeito anti-alodínico do etidronato (não aminobisfosfonato) e do alendronato (aminobisfosfonato) em um modelo de artrite por adjuvante e o possível envolvimento de canais de potássio ATP-dependentes no fenômeno. De acordo com esse achado da literatura, resolvemos investigar se o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico também se relaciona com esse mecanismo. Utilizando a glibenclamida como ferramenta farmacológica, nós observamos que o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico foi revertido com a administração da mesma, apesar de termos utilizado um modelo de nocicepção aguda. Isso sugere que possivelmente os canais de potássio ATP dependentes estão envolvidos nesse fenômeno, a semelhança do que foi demonstrado para o etidronato e alendronato.

É sabido que substâncias que abrem os canais de potássio têm o poder de inibir a hiperalgesia. A ativação da via metabólica arginina/NO/GMPc/ K^+ promove a abertura dos canais de K^+ ATP dependentes e possibilita a saída destes íons, o que contrabalança o limiar aumentado pelo acúmulo de Ca^+ citosólico. Este efeito tem relação com o aumento de GMPc ou de substâncias que estimulem o guanilato ciclase neuronal, como os geradores do óxido nítrico (DUARTE *et al.*, 1992).

Sabendo-se que a abertura dos canais de potássio é o último estágio da via analgésica arginina/NO/GMPc/ K^+_{ATP} , buscamos investigar a participação do NO no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico. A administração de L-NAME (inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase) reverteu o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico no modelo de contorções abdominais induzidas por zymosan. Em adição quando utilizamos a L-arginina, a mesma reverte o efeito do L-NAME, mostrando que o fenômeno realmente se deve a produção de NO. Outros trabalhos utilizaram o L-NAME, em dose semelhante, para mostrar a participação do NO em fenômenos de analgesia. A exemplo disso foi demonstrado a participação do NO no efeito analgésico do sildenafil (JAIN *et al.*, 2001; VALE *et al.*, 2006).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula composta por um átomo de oxigênio e um de nitrogênio e de suma importância para homeostase. Juntamente com a L-citrulina, NO é produto da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) sobre a L-arginina e o oxigênio molecular.

Três isoformas distintas da NOS foram identificadas: duas expressas constitutivamente, produzindo NO em baixos níveis, a neuronal (NOSn) e a endotelial (NOSe); e uma induzida (NOSi), expressa em altos níveis e em resposta à citocinas durante o desenvolvimento do processo inflamatório. Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como a NG-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO), NG-amino-L-arginina (L-NAA), NG-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) (REES *et al.*, 1990; MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS. Além destes inibidores, a aminoguanidina é também capaz de inibir a NOS e apresenta uma relativa seletividade para NOSi.

Sabendo da seletividade da aminoguanidina pela NOSi procuramos identificar se essa isoforma estaria envolvida no efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com aminoguanidina foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico, sugerindo a participação da NOSi em tal efeito.

Estudos demonstraram que o NO modula a transmissão sináptica tanto no sistema nervoso central, bem como no sistema nervoso periférico (SALTER *et al.*, 1996; JAIN *et al.*,

1999), comportando-se como um neurotransmissor. Nas terminações nervosas o NO é produzido pela NO sintase neuronal, podendo difundir-se para o meio extracelular onde ativa a guanilato ciclase nas células vizinhas.

Ainda é dúbio o efeito do NO sobre a nocicepção, já que alguns autores relatam um efeito pró-nociceptivo (MOORE *et al.*, 1991; MELLER *et al.*, 1994; SAKURADA *et al.*, 1996), enquanto outros relatam uma ação antinociceptiva (SOUZA e PRADO, 2001; VALE *et al.*, 2006). Dados do nosso laboratório apontam para um efeito hipernociceptivo do NO no modelo de incapacitação articular induzida por zymosan (ROCHA *et al.*, 1999).

A dor inflamatória caracteriza-se pela sensibilização dos neurônios nociceptivos (hipernocicepção), resultante da ação dos mediadores inflamatórios por células não neuronais no local da injúria. Nesse sentido, nosso grupo demonstrou o papel crucial desenvolvido pelas células residentes sobre a resposta nociceptiva do zymosan no modelo de contorções abdominais. Alguns dos resultados mostraram que a depleção de células residentes na cavidade peritoneal por meio de uma lavagem prévia foi capaz de reduzir de maneira significativa a atividade nociceptiva do zymosan e do ácido acético, mas não do iloprost (análogo estável de PGI₂). Em contrapartida o pré-tratamento dos animais com tioglicolato, para elevar a população de macrófagos, foi capaz de aumentar o número de contorções induzidas por esses estímulos (CUNHA e FERREIRA, 1986; RIBEIRO *et al.*, 2000; VALE *et al.*, 2003).

Sabido o mecanismo de ação do zymosan sobre as células residentes, buscamos investigar se o ácido zoledrônico além de ativar a via arginina/NO/GMPc/K⁺, poderia também estar inibindo a ativação das células residentes. Para isso foi realizada a dosagem de citocinas, TNF e KC (CXCL1, ligante da quimiocina (C-X-C motif) 1, quimiocina homóloga a IL-8 humana) no sobrenadante de cultura de macrófagos retirados da cavidade peritoneal de camundongos tratados com ácido zoledrônico e estimulados com zymosan *in vivo*. Nossos resultados mostraram que o ácido zoledrônico, quando injetado 1 hora antes do zymosan foi capaz de inibir a produção de TNF e KC, indicando um possível efeito antiinflamatório. Esse resultado nos motivou a investigar se além do efeito antinociceptivo, o ácido zoledrônico também demonstrava um efeito antiinflamatório.

Neste contexto optamos por investigar o efeito do ácido zoledrônico sobre o edema de pata induzido por outro agente flogístico, a carragenina. Trata-se de um polissacarídeo sulfatado, derivado principalmente de algas do mar irlandês (*Chondrus crispus*). Carragenina é um agente que induz inflamação por liberação de prostaglandinas. É classicamente utilizada em estudos por sua capacidade de induzir inflamação aguda, edema de pata e injúria nos vasos sanguíneos, liberação de cininas e por potencializar a endotoxicidade.

Nós observamos que o pré-tratamento com o ácido zoledrônico no edema de pata induzido por carragenina, demonstrou uma tendência à amplificação, entretanto não houve diferenças significativas entre os grupos. O ácido zoledrônico também não se mostrou capaz de alterar a permeabilidade vascular analisada por meio do extravasamento de azul de Evans, corroborando com o resultado do edema de pata.

O-Ishi e Sakuma (1970) validaram o modelo experimental de edema de pata. Trata-se de um modelo matemático onde o edema é resultado do equilíbrio dinâmico simples entre duas forças, o volume mensurado antes e após o edema. Nesse mesmo trabalho também ficou demonstrado a eficácia da carragenina e do dextran em induzir edema.

A medida do extravasamento do Azul de Evans é um método visual e quantitativo seguro para se estudar inflamação, visto que o azul de Evans se liga a proteínas plasmáticas. Durante a resposta inflamatória ocorre o extravasamento do azul de Evans ligado a proteínas plasmáticas e isso pode ser mensurado quantitativamente.

Ainda no modelo de edema de pata, utilizamos o dextran como estímulo. Diferente da carragenina, o edema induzido por dextran se dá pela sua capacidade de estimular a degranulação de mastócitos. Nossos resultados mostraram que o ácido zoledrônico não foi capaz de inibir o edema induzido por dextran.

É sabido que a inflamação se caracteriza pelo extravasamento de líquido e células sanguíneas para o interstício, o que promove um acúmulo de fluidos e neutrófilos nos tecidos extracelulares. A MPO é uma enzima presente nos grânulos intracelulares dos neutrófilos. Sua atividade tem sido usada como índice quantitativo para avaliar a infiltração neutrofílica em

vários tecidos. Uma vez que há grande influxo de leucócitos no edema de pata induzido por carragenina, supõe-se que estes leucócitos sejam predominantemente neutrófilos.

Neste sentido, buscou-se investigar a atividade de MPO nos tecidos das patas de animais submetidos ao protocolo de edema de pata induzido por carragenina. Os nossos resultados demonstram que o ácido zoledrônico não foi capaz de inibir a atividade de MPO, o que é plausível com o resultado do edema de pata induzido por carragenina. Nesse modelo o pico de edema que acontece na 3ª hora após a injeção da carragenina coincide com o início da migração de neutrófilos, sugerindo que a migração é importante para a intensidade do edema da carragenina.

No intuito de demonstrar que o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico não depende de um efeito antiinflamatório, nós ainda demonstramos que o ácido zoledrônico não foi capaz de inibir a migração de células para a cavidade articular induzida por zymosan.

É conhecido o importante papel exercido pelos neutrófilos no processo inflamatório e, na resposta hipernociceptiva, isso também foi demonstrado. Recentemente Guerrero *et al.* (2008), através de um modelo de artrite induzida por zymosan na articulação tarso-tibial, mostraram que a resposta máxima hipernociceptiva do zymosan coincidia com o momento em que também era máxima a migração de neutrófilos. Ademais, ainda nesse trabalho, ficou demonstrado que LTB₄ media a hipernocicepção induzida por zymosan através da quimiotaxia de neutrófilos. E por meio de um mecanismo de retroalimentação, os neutrófilos estimulam ainda mais a produção de LTB₄ e também de PGE₂. Esse mecanismo possivelmente estimula diretamente as terminações nervosas nociceptivas, culminando no fenômeno de hipernocicepção.

De acordo com os resultados do presente estudo, o mecanismo antinociceptivo do ácido zoledrônico não parece ser dependente da inibição da migração de neutrófilos, visto que esse efeito não foi observado nas articulações estimuladas com zymosan e nem nas patas estimuladas com carragenina.

Ainda que não tenhamos observado nenhum efeito antiinflamatório nos modelos clássicos de inflamação aguda, nossos resultados mostraram que o ácido zoledrônico foi capaz de inibir a produção das citocinas pró-inflamatórias: IL-1, TNF e KC.

O ácido zoledrônico foi capaz de inibir a produção de IL-1 do homogenato da pele da pata de ratos estimulados com carragenina. Também foi capaz de inibir a expressão de TNF na sinóvia de animais com artrite por zymosan e a expressão de TNF na pele de pata de animais que foram injetados com carragenina. A produção de TNF e de KC também foram inibidas pelo ácido zoledrônico no sobrenadante de cultura de células da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com zymosan. Juntos esses resultados sugerem que o ácido zoledrônico é capaz de inibir a produção das citocinas TNF, IL-1 e KC, e que possivelmente essa inibição também relaciona-se com seu efeito antinociceptivo.

Para Monkkonen *et al.* (1998) alguns bisfosfonatos, os que não possuem o grupo amino em sua cadeia, são eficazes em inibir a liberação de citocinas pro-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF, assim como de NO por macrófagos, possuindo assim, efeito anti-inflamatório. Em contrapartida, os aminobisfosfonatos, agem de forma contrária, sendo capazes de sensibilizar os macrófagos e assim, induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF).

Anteriormente, contrariando o que foi sugerido por Monkkonen *et al.* (1998), Sansoni *et al.* (1985), demonstraram o efeito inibitório do alendronato sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias. Nesse estudo o alendronato foi capaz de inibir de maneira dose-dependente produção *in vitro* de IL-1 β , IL-6 e TNF- α por monócitos ativados. O ácido zoledrônico age também como inibidor da produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, o que foi demonstrado posteriormente por outro autor (DERENNE *et al.*, 1999).

O TNF é considerado peça chave na resposta da dor inflamatória. É sabido que este é a primeira citocina a ser liberada após a indução de inflamação por carragenina (CUNHA *et al.*, 1992). Depois de sintetizado, TNF possui a capacidade de induzir a liberação de IL-1 β pelas células residentes, e conseqüentemente, de prostaglandinas, mediadores finais da hiperalgesia.

O papel crucial desenvolvido pelas células residentes sobre a resposta nociceptiva foi demonstrado por Ribeiro *et al.* (2000). Neste estudo a administração intraperitoneal de zymosan mostrou-se capaz de induzir a liberação de diversos mediadores inflamatórios prostaglandínicos e simpáticos por células residentes. Ainda nesse mesmo estudo, foi sugerido que a atividade nociceptiva do zymosan e do ácido acético em modelo de contorção abdominal se dá pela liberação de TNF- α , IL-1 β e IL-8 por células residentes, visto que concomitante a inibição da gênese dessas citocinas ocorre a inibição da nocicepção, já que anticorpos específicos para estas citocinas foram capazes de diminuir o número de contorções abdominais induzidas por zymosan e por ácido acético.

Semelhante aos nossos resultados em que o tratamento com ácido zoledrônico inibe a produção de TNF, mas não inibe o edema de pata e aumento de permeabilidade vascular, um estudo anterior avaliou o efeito da talidomida na dor inflamatória obtendo resultados semelhantes. Esse trabalho mostrou a inibição da nocicepção em modelos de hiperalgesia plantar e contorções abdominais pela talidomida, mas não a inibição do edema de pata estimulado com carragenina. Ainda nesse estudo, foi sugerido que o efeito antinociceptivo da talidomida está relacionado com a inibição da produção de TNF por células residentes (RIBEIRO *et al.*, 2000).

Outro estudo, avaliando também o efeito antinociceptivo da talidomida em modelo de incapacitação articular induzido por zymosan, mostrou que essa droga foi eficaz em inibir a produção de TNF- α no lavado articular. Foi também sugerido o envolvimento da inibição da produção do TNF- α no mecanismo antinociceptivo da talidomida (VALE *et al.*, 2006).

Foi reportado por Vale *et al.* (2004), o envolvimento da inibição na produção de TNF- α e de IL-1 β no efeito antinociceptivo da pentoxifilina. Neste estudo demonstrou-se que a pentoxifilina foi capaz de inibir as concentrações de TNF- α e de IL-1 β no exsudato articular de ratos estimulados com zymosan, no sobrenadante de cultura de macrófagos retirados da cavidade peritoneal de camundongos e estimulados com zymosan *in vivo*, assim como a expressão de TNF- α do tecido de patas de ratos estimuladas com carragenina.

As interleucinas IL-1 e IL-8 são secretadas em resposta a lesão tecidual por vários tipos celulares (WESTWICK, LI e CAMP, 1989). Cunha *et al.* (1991), reportaram a capacidade da IL-8 em induzir hiperalgesia por um mecanismo simpatomimético dependente. Nesse estudo o pré-tratamento com indometacina (inibidor da ciclooxigenase) se mostrou capaz de inibir a hiperalgesia induzida por IL-1 β , mas não por IL-8, enquanto o pré-tratamento com drogas simpatolíticas mostraram-se eficazes em inibir a hiperalgesia induzida por IL-8, mas não por IL-1 β .

Está bem descrito na literatura o papel desenvolvido pelas citocinas na resposta nociceptiva. Algumas são conhecidas por seu papel pró-nociceptivo, como TNF, IL-1 e IL-8, enquanto outras exercem o papel oposto, agindo no sentido de inibir essa resposta, como IL-4, IL-10 e IL-13.

A IL-10 é sintetizada por diversos tipos celulares, incluindo macrófagos, mastócitos e linfócitos Th2. Acredita-se que essa citocina exerça um importante papel inibitório sob a produção de citocinas pró-inflamatória e na expressão de COX-2 e NOSi (VALE *et al.*, 2003).

Foi sugerido por Poole *et al.* (1995) que são dois os mecanismos envolvidos no efeito inibitório exercido pela IL-10 sobre a hiperalgesia inflamatória mecânica induzida por carragenina: a inibição de citocinas hiperalgésicas e da expressão de COX-2.

O efeito antinociceptivo das citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 foi demonstrado por VALE *et al* (2003). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias do lavado articular de ratos estimulados com zymosan e da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com zymosan ou ácido acético estavam diminuídos quando os animais eram pré-tratados com IL-4, IL-10 e IL-13. Já o pré-tratamento com os anti-soros, anti IL-4, IL-10 e IL-13, foi capaz de amplificar tanto as contorções abdominais como a incapacitação articular, mostrando que existe um mecanismo endógeno antinociceptivo dependente dessas citocinas inibitórias.

Nossos resultados demonstraram que o ácido zoledrônico não foi capaz de alterar a produção de IL-10 no sobrenadante do homogenato de pele de pata de ratos injetados com

carragenina, sugerindo que essa citocina não está envolvida no efeito antinociceptivo estudado no presente trabalho.

Atualmente tem sido referido na literatura um efeito transitório e agudo associado a primeira administração do ácido zoledrônico, que se caracteriza por artromialgia, febre, fadiga e dor (MONKKONEN *et al.*, 1997; POLASCIK e MOURAVIEV, 2008; ZHOU *et al.*, 2011). Segundo Monkkonen et al (1997), em uma revisão sobre o assunto, esse efeito é característica dos aminobisfosfonados e foi visto com o ibandronato e pamidronato. Esse fenômeno parece ser devido ao aumento agudo e transitório de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 e TNF. No entanto, até o momento, nada foi mencionado quanto ao ácido zoledrônico.

Curiosos a respeito desses achados da literatura resolvemos adicionar ao nosso trabalho outro protocolo de administração do ácido zoledrônico que fosse capaz mimetizar esse efeito.

Acreditando que possivelmente o ácido zoledrônico pudesse apresentar um efeito inverso aos nossos achados anteriores, procuramos investigar seu efeito quando administrado após o zymosan. Procuramos utilizar uma subdose de zymosan, quatro vezes menor que a dose tradicional, buscando visualizar uma possível amplificação do efeito hiperalgésico desse estímulo no modelo de incapacitação articular. A dose de 250µg de zymosan por articulação não é suficiente para induzir uma incapacitação articular significativa. Entretanto, quando administramos ácido zoledrônico uma hora após a subdose de zymosan nós pudemos observar uma incapacitação articular que mimetiza uma dose cheia de zymosan, sugerindo que o ácido zoledrônico amplificou o efeito nociceptivo do zymosan. Essa mesma subdose de zymosan já havia sido utilizada em outro estudo, no modelo de incapacitação articular, com a intenção de demonstrar, da mesma forma, a amplificação de um fenômeno nociceptivo. (VALE *et al.*, 2003).

Acreditamos que esse efeito contrário aos nossos achados iniciais se deve ao momento da administração do ácido zoledrônico. Quando administrado uma hora antes do zymosan apresenta efeito antinociceptivo e inibidor da produção de citocinas, enquanto sua administração pós-zymosan apresenta efeito contrário, amplificando o fenômeno nociceptivo. Na clínica também observa-se um efeito semelhante, onde na primeira administração do ácido

zoledrônico, aproximadamente pouco mais de 10% dos pacientes desenvolvem artromialgias transitórias e, em seguida, um alívio das dores relacionadas ao câncer e às metástases ósseas. (POLASCIK e MOURAVIEV, 2008).

Acreditamos que o ácido zoledrônico possa realmente ter essas duas propriedades: inicialmente um efeito pro-nociceptivo e tardiamente um efeito antinociceptivo. Provavelmente aqueles pacientes que experimentam dor após a primeira administração de ácido zoledrônico sejam portadores de algum processo inflamatório subclínico, o que permite uma amplificação transitória pelo início do tratamento com ácido zoledrônico, mas que posteriormente com a continuidade do tratamento dá lugar a um efeito analgésico de característica mais duradoura.

Em nosso resultado experimental observamos que, para que o efeito pró-nociceptivo do ácido zoledrônico aconteça, é necessário um evento de *priming* o qual foi simulado pela subdose de zymosan. Isso é verdadeiro, pois quando injetamos o ácido zoledrônico sem esse *priming* os animais não apresentaram comportamento nociceptivo, mesmo que o ácido zoledrônico seja injetado diretamente na articulação. Entretanto, quando a mesma dose de ácido zoledrônico é administrada previamente ao zymosan intrarticular observa-se um efeito antinociceptivo. Isso corrobora com a idéia de que é necessário um evento inflamatório inicial para que seja deflagrado o efeito nociceptivo do ácido zoledrônico, que na clínica parece ser transitório e somente após a primeira administração.

Esse resultado carece de maior investigação por meio da realização de mais experimentos, inclusive com avaliação dos níveis de citocinas circulantes tanto sistemicamente quanto localmente, no lavado articular.

Os dados apresentados no presente trabalho, em parte, poderiam explicar o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico. Nossa maior contribuição consistiu em sugerir o envolvimento do NO e a inibição de citocinas pró-inflamatórias, nesse efeito. Assim, auxiliar na descoberta de novas abordagens terapêuticas.

6. CONCLUSÃO

Diante dos dados apresentados neste trabalho, foi possível concluir que:

1. O ácido zoledrônico foi capaz de inibir a ação nociceptiva do zymosan no modelo de contorções abdominais e no modelo de incapacitação articular.
2. A produção de NO e a abertura de canais de potássio ATP dependentes parecem estar relacionadas com o efeito antinociceptivo do ácido zoledrônico.
3. O ácido zoledrônico inibiu significativamente a produção de citocinas pró-nociceptivas, particularmente o TNF α e KC, por células residentes da cavidade peritoneal de animais estimulados com zymosan. Foi eficaz também em inibir a produção de IL-1 em patas de ratos estimulados com carragenina, podendo significar um efeito adicional à sua atividade antinociceptiva. No entanto, não houve alteração na produção da citocina antiinflamatória IL-10.
4. Contudo, ainda que exerça influência sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, seu efeito antinociceptivo parece não estar relacionado a um efeito antiinflamatório, visto que não se mostrou eficaz em inibir a migração celular para a cavidade articular, não alterou o curso do edema de pata e também não apresentou influencia sobre a permeabilidade vascular.

7. REFERÊNCIAS

ACKERMANN, L., HARVIMA, I.T., PELKONEN, J., RITAMAKI-SALO, V., NAUKKARINEN, A., HARVIMA, R.J., HORSMANHEIMO, M. Mast cells in psoriatic skin are strongly positive for interferon-gamma. **Br. J. Dermatol.** 140: 624-633, 1999

ADAMS, D.O., HAMILTON, T.A. The activated macrophage and granulomatous inflammation. **Curr. Top. Pathol.** 79: 151-167, 1989

ADAMI, S. Bisphosphonates in prostate carcinoma. **Cancer.** 80: 1674-1679, 1997

AFT, R. Bisphosphonates in breast cancer: clinical activity and implications of preclinical data. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 9: 194-205, 2011

ALVES, D., DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. **Eur. J. Pharmacol.** 444: 1-2, 2002

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. Ad Hoc Committee on Clinical. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.** 39: 713-722, 1996

BAUMANN, H., GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today.** 15: 74-80, 1994

BENFORD, H.L., MCGOWAN, N.W., HELFRICH, M.H., MUTTALL, M.E., ROGERS, M. J. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. **Bone.** 28: 465-473, 2001

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet.** 353: 1610-1615, 1999

BIRNBAUM, H.G., PIKE, C., BANERJEE, R., WALDMAN, T., CIFALDI, M. Changes in Utilization and Costs for Patients with Rheumatoid Arthritis, 1997 to 2006. **Pharmacoeconomics.** 2012

BISSONNETTE, E.Y., HOGABOAM, C.M., WALLACE, J.L., BEFUS, A.D. Potentiation of tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. **J. Immunol.** 147: 3060-3065, 1991

BONABELLO, A., GALMOZZI, M.R., BRUZZESE, T., ZARA, G.P. Analgesic effects of bisphosphonates in mice. *Pain.* 91: 269-275, 2001

BRADLEY, P.P., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.** 60: 618-622, 1982

BUSTAMANTE, A.M.F. **Caracterización de un modelo para la evaluación de la analgesia en ratas:** medición de la limitación funcional producida por administración intra-articular de ácido úrico. Tese – Universidade Autonoma do México, 1982

CATALANO, A., MORABITO, N., ATTERITANO, M., BASILE, G., CUCINOTTA, D., LASCO, A. Vitamin D Reduces Musculoskeletal Pain After Infusion of Zoledronic Acid for Postmenopausal Osteoporosis. **Calcif. Tissue Int.** 90: 279-285, 2012

CARVALHO, A.P., BEZERRA, M.M., GIRÃO, V.C., CUNHA, F.Q., ROCHA, F.A. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of risedronate in experimental pain models in rats and mice. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 7: 601-606, 2006

CHAHN, L.A., IGGO, A. The effects of bradykinin and prostaglandin E1 on rat cutaneous afferent nerve activity. **Br. J. Pharmacol.** 59: 343-347, 1977

CHAVES, H.V., RIBEIRO, R. A., DE SOUZA, A.M., RODRIGUES, E SILVA, A.A., GOMES, A.S., VALE, M.L., BEZERRA, M.M., BRITO, G.A. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **J. Biomed. Biotechnol.** 2011: 707985, 2011

CHOUDHURY, K.B., MALLIK, C., SHARMA, S., CHOUDHURY, D.B., MAITI, S., ROY, C. A randomized controlled trial to compare the efficacy of bisphosphonates in the management of painful bone metastasis. **Indian J. Palliat Care.** 17: 210-218, 2011

CLÉZARDIN, P. Anti-tumour activity of zoledronic acid. **Cancer Treatment Rev.** 31: 1-8, 2005

COLEMAN, R. E. Bisphosphonates in breast cancer. **Ann. Oncol.** 16: 687-695, 2005

COLLIER, H.O.J., DINNEEN, L.C., CHISTINE, A., JOHNSON, A., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemoter.** 32: 295, 1968

CONTE, F.P., MENEZES-DE-LIMA, O.J.R., VERRI, W.A. J.R., CUNHA, F.Q., PENIDO, C., HENRIQUES, M.G. Lipoxin A(4) attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. **Br. J. Pharmacol.** 161: 911-924, 2010

CORRADO, A., NEVE, A., MARUOTTI N, GAUDIO A., MARUCCI A, CANTATORE FP. Dose-dependent metabolic effect of zoledronate on primary human osteoblastic cell cultures. **Clin Exp Rheumatol.** 28: 873-879, 2010

CORSINI, E., GALLI, C.L. Cytokines and irritant contact dermatitis. **Toxicol. Lett.** 102-103: 277-282, 1998

COSTA, L., MAJOR, P.P. Effect of bisphosphonates on pain and quality of life in patients with bone metastases. **Nat. Clin. Pract. Oncol.** 6: 163-174, 2009

CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.** 129: 65-76, 1986

CUNHA, F.Q., LORENZETTI, B.B., POOLE, S., FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.** 104: 765-767, 1991

CUNHA, F. Q., POOLE, S., LORENZETTI, B. B., FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.** 107: 660-664, 1992

DE LUCA, A., LAMURA, L., GALLO, M., DANIELE, G., D'ALESSIO, A., GIORDANO, P., MAIELLO, M.R., PERGAMENO, M., PERRONE, F., NORMANNO, N. Pharmacokinetic evaluation of zoledronic acid. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.** 7: 911-918, 2011

DE SOUZA, G.E., FERREIRA, S.H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions.** 17: 97-103, 1985

DEMIRTAS, A., SAHIN, N., CANIKLIOGLU, M., KULA, M., EKMEKCIOGLU, O., TATLISEN, A. Assessment of the effects of zoledronic Acid therapy on bone metabolic indicators in hormone-resistant prostate cancer patients with bone metastasis. **ISRN Urol.** 2011: 392014, 2011

DERENNE, S., AMIOT, M., BARILLE, S., COLLETTE, M., ROBILLARD, N., BERTHAUD, P., HAROUSSEAU, J.L., BATAILLE, R. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. **J. Bone Miner. Res.** 14: 2048–2056, 1999

DIAZ-BORJON, A., SEYLER, T.M., CHEN, N.L., LIM, S.S. Bisphosphonate-associated arthritis. **J. Clin. Rheumatol.** 12: 131-133, 2006.

DINARELLO, C.A., CANNON, J.G., WOLFF, S.M., BERNHEIM, H.A., BEUTLER, B., CERAMI, A., FIGARI, I.S., PALLADINO, M.A.JR., O'CONNOR, J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J. Exp. Med.** 163: 1433-1450, 1986

DJEU, J. Y., SERBOUSEK, D., BLANCHARD, D. K. Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v. 76, p. 1405-1409, 1990

DOHERTY, N.S., POUBELLE, P., BORGEAT, P., BEAVER, T.H., WESTRICH, G.L., SCHRADER, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins.** 30: 769-789, 1985

DRAKE, M.T., CLARKE, B.L., KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin. Proc.** 83: 1032-1045, 2008

DUARTE, I.D., FERREIRA, S.H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.** 221: 171-174, 1992

DUNFORD, J.E., THOMPSON, K., COXON, F.P., LUCKMAN, S.P., HAHN, F.M., POULTER, C.D., EBETINO, F.H., ROGERS, M.J. Structure–activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 296: 235–242, 2001

DUSSÉ, L.M.S., VIEIRA, L.M., CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Laboratorial**, 39: 343-350, 2003

EVANS, A.R., VASKO, M.R., NICOL, G.D. The cAMP transduction cascade mediates the PGE₂-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. **J. Physiol.** 516: 163-178, 1999

FACCIOLI, L.H., SOUZA, G.E., CUNHA, F.Q., POOLE, S., FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions.** 30: 344-349, 1990

FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia: mechanism of the analgesic action of aspirin-like drugs and opiate-antagonists. **Br. J. Clin. Pharmacol.** 10: 237-245, 1980

FERREIRA, S. H. Inflammatory pain: the role of cytokines and its control by drugs which release nitric oxide. **Ann. Inst. Super. Sanita.** 29: 367-373, 1993

FERREIRA, S. H. **Dor inflamatória e analgesia.** Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/html/Repensando/DorInflamatoriaAnalgesia.html>>. Acesso em: 20 Mar. 2011

FERREIRA, S. H., FERRARI, L. F., CUNHA, T. M., NASCIMENTO, P. G. B. D., JUNIOR, W. A. V., CUNHA, F. Q. Dor Inflamatória. In: **Dor: princípios e prática.** 1. ed. São Paulo: Artmed, 2009, cap. 19, p. 265-279

FERREIRA, S.H., LORENZETTI, B.B., BRISTOW, A.F., POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature.** 334: 698-700, 1988

FERREIRA, S.H., NAKAMURA, M. I - Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins.** 18: 179-190, 1979

FILLINGIM, R. B., KING, C. D., DA SILVA, M.C.R., WILLIAMS, B.R., RILEY III, J.L. Sex, Gender, and Pain: A Review of Recent Clinical and Experimental Findings. **J. Pain.** 10: 447-485, 2009

FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocr. Rev.** 19: 80-100, 1998

FLEISCH, H. Diphosphonates: history and mechanisms of action. **Metab. Bone Dis. Relat. Res.** 3: 279-287, 1981

FLEISCH, H. Development of bisphosphonates. **Breast Cancer Res.** 4: 30-34, 2002

FLEISCH, H. Introduction to bisphosphonates. History and functional mechanisms. **Orthopade.** 36: 103-104, 2007

FLEISCH, H., RUSSELL, R.G., FRANCIS, M.D. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. **Science.** 165: 1262-1264, 1969

FLORA FILHO, R. F., ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Brasil.** 46: 265-271, 2000

FOLLENFANT, R.L., NAKAMURA, M., GARLAND, L.G. Sustained hyperalgesia in rats evoked by 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid is attenuated by the protein kinase inhibitor H-7. **Br. J. Pharmacol.** 99: 289, 1990

FRANCIS, M.D., RUSSELL, R.G., FLEISCH, H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. **Science.** 165: 1264-1266, 1969

FUJISAWA, H., WANG, B.H., KONDO, S., SHIVJI, G.M., SAUDER, D.N. Costimulation with ultraviolet B and interleukin-1 alpha dramatically increase tumor necrosis factor-alpha production in human dermal fibroblasts. **J. Interferon Cytokine Res.** 17: 307-313, 1997

FULFARO, F., CASUCCIO, A., TICOZZI, C., RIPAMONTI, C. The role of bisphosphonates in the treatment of painful metastatic bone disease: a review of phase III trials. **Pain.** 78: 157-169, 1998

GEGOUT, P., GILLET, P., CHEVRIER, D., GUINGAMP, C., TERLAIN, B., NETTER, P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sci.** 17: 321-326, 1994

GEGOUT, P., GILLET, P., TERLAIN, B., NETTER, P. Zymosan induced arthritis in rats II. Effects of antiinflammatory drugs. **Life Sci.** 56: 389-394, 1995

GOICOECHEA, C., PORRAS, E., ALFARO, M.J., MARTIN, M. I. Alendronate Induces Antinociception in Mice, Not Related With Its Effects in Bone. *Jpn. J. Pharmacol.* 79: 433-437, 1999

GOLD, M.S., LEVINE, J.D., CORREA, A.M. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. **J. Neurosci.** 18: 10345-10355, 1998

GOLDBERG, N.D., HADDOX, M.K., NICOL, S.E., GLASS, D.B., SANFORD, C.H., KUEHL, F.A.J., ESTENSEN, R. Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: the Yin Yang hypothesis. **Adv. Cyclic Nucleotide Res.** 5: 307-330, 1975

GORDON, J.R., GALLI, S.J. Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-alpha during IgE-dependent biological responses. *J. Exp. Med.* 174: 103-107, 1991

GRIGG, P., SCHAIBLE, H.G., SCHMIDT, R.F. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. *J. Neurophysiol.* 55: 635-643, 1986

GUERRERO, A.T., VERRI JUNIOR, W.A., CUNHA, T.M., SILVA, T.A., SCHIVO, I.R., DAL-SECCO, D., CANETTI, C., ROCHA, F.A., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. *J. Leukoc. Biol.* 83: 122-130, 2008

HANNINGTON-KIFF, J. G. Intravenous regional sympathetic block with guanethidine. *Lancet*. 1: 1019-1020, 1974

HARADA, H., NAKAYAMA, T., NANAHA, T., KATSUMATA, T. Effects of bisphosphonates on joint damage and bone loss in rat adjuvant-induced arthritis. *Inflamm. Res.* 53: 45-52, 2004

HOPKINS, S. J. Cytokines and eicosanoids in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 49: 207-210, 1990

HORTOBAGYI, G.N., THERIAULT, R.L., PORTER, L., BLAYNEY, D., LIPTON, A., SINOFF, C., WHEELER, H., SIMEONE, J.F., SEAMAN, J., KNIGHT, R.D. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal complications in patients with breast cancer and lytic bone metastases. Protocol 19 Aredia Breast Cancer Study Group. *N. Engl. J. Med.* 335: 785, 1996

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (Brasil). **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2012

JAIN, N. K., KULKARNI, S. K. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, modulates cholinergic antinociception. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 21: 161-165, 1999

JAIN, N.K., PATIL, C.S., SINGH, A., KULKARNI, S.K. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Brain Res.* 909: 170-178, 2001

JOURNÉ, F., KHEDDOUMI, N., CHABOTEAUX, C., DUVILLIER, H., LAURENT, G., BODY, J.J. Extracellular calcium increases bisphosphonate-induced growth inhibition of breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 10, 2007

KAWABATA, A., KAWAO, N., HIRONAKA, Y., ISHIKI, T., MATSUNAMI, M., SEKIGUCHI, F. Antiallodynic effect of etidronate, a bisphosphonate, in rats with adjuvant-induced arthritis: involvement of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuropharmacology*. 51: 182-190, 2006

KHASAR, S.G., MCCARTER, G., LEVINE, J.D. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J. Neurophysiol.* 81: 1104-1112, 1999

KWAN, C.L., HU, J.W., SESSLE, B.J. Neuroplastic effects of neonatal capsaicin on neurons in adult rat trigeminal nucleus principalis and subnucleus oralis. *J. Neurophysiol.* 75: 298-310, 1996

LASKIN, D.L., PENDINO, K.J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 655-677, 1995

LASLETT, L.L., DORÉ, D.A., QUINN, S.J., BOON, P., RYAN, E., WINZENBERG, T.M., JONES, G. Zoledronic acid reduces knee pain and bone marrow lesions over 1 year: a randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 2012

LEHENKARI, P.P., KELLINSALMI, M., NÄPÄNKANGAS, J.P., YLITALO, K.V., MÖNKKÖNEN, J., ROGERS, M.J., AZHAYEV, A., VÄÄNÄNEN, H. K., HASSINEN, I.E. Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. **Mol. Pharmacol.** 61: 1255-1262, 2002

LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone.** 18: 75-85, 1996

LOH, L., NATHAN, P.W. Painful peripheral states and sympathetic blocks. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.** 41: 664-671, 1978

LORENZETTI, B. B., POOLE, S., VEIGA, F.H., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-13. **Eur. Cytokine Network.** 12: 260-267, 2001

MAGALHÃES, J.F.G., VIANA, C.F.G., ARAGÃO JR, A.G., MORAES, V.G., RIBEIRO R.A., VALE, M.R. Analgesic and anti-inflammatory activities of *ageratum conyzoides* in rats. **Phytoter. Res.** 11: 183-188, 1997

MAINI, R.N., TAYLOR, P.C., PALEOLOG, E., CHARLES, P., BALLARA, S., BRENNAN, F.M., FELDMANN, M. Anti-tumour necrosis factor specific antibody (infliximab) treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** 58: 56-60, 1999

MAJKOWSKA, A., NEVES, M., ANTUNES, I., BILEWICZ, A. Complexes of low energy beta emitters ⁴⁷Sc and ¹⁷⁷Lu with zoledronic acid for bone pain therapy. **Appl. Radiat. Isot.** 67: 11-13, 2009

MANNAIONI, P.F., MASINI, E., PISTELLI, A., SALVEMINI, D., VANE, J.R. Mast cells as source of superoxide anions and nitric oxide-like factor: relevance to histamine release. **Int. J. Tissue React.** 13: 271-278, 1991

MARUOTTI, N., CORRADO, A., NEVE, A., CANTATORE, F.P. Bisphosphonates: effects on osteoblast. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 2012

MASINI, E., SALVEMINI, D., PISTELLI, A., MANNAIONI, P.F., VANE, J.R. Rat mast cells synthesize a nitric oxide like-factor which modulates the release of histamine. **Agents Actions.** 33: 61-63, 1991

MATTHEWS, N. Tumour-necrosis factor from the rabbit. V. Synthesis in vitro by mononuclear phagocytes from various tissues of normal and BCG-injected rabbits. **Br. J. Cancer.** 44: 418-424, 1981

MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF α biology in health and disease. **Cell Mol. Biol.** 47: 619-635, 2001

MCMAHON, S. B., KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci.** 13: 199-201, 1990.

- MELLER, S.T., CUMMINGS, C.P., TRAUB, R.J., GEBHART, G.F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. **Neuroscience**. 60: 367-374, 1994
- MELO, I. T. V., PINTO FILHO, W. A. Dor no câncer. In: **Dor: princípios e prática**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2009, cap. 64, p. 792-804
- MERSKEY, H., BOGDUK, N. **Classification of chronic pain**: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2nd ed. Seattle: IASP, 1994
- MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Prog. Neurobiol.** 57: 1-164, 1999
- MIJIYAWA, M. Epidemiology and semiology of rheumatoid arthritis in Third World countries. **Rev. Rhum. Engl. Ed.** 62: 121-126, 1995
- MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43: 109-142, 1991
- MÖNKKÖNEN, H., AURIOLA, S., LEHENKARI, P., KELLINSALMI, M., HASSINEN, I.E., VEPSÄLÄINEN, J., MÖNKKÖNEN, J. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. **Br. J. Pharmacol.** 147: 437-445, 2006
- MÖNKKÖNEN, H., LEHENKARI, P.P., KELLINSALMI, M. *et al.* A new mechanism of action for bisphosphonates: apppi dedicated cytotoxicity of N-BPs. **Bone**. 34: 66-67, 2004
- MOORE, P.K., OLUYOMI, A.O., BABBEDGE, R.C., WALLACE, P., HART, S.L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.** 102: 198-202, 1991
- MORELAND, L.W., RUSSELL, A.S., PAULUS, H.E. Management of rheumatoid arthritis: the historical context. **J. Rheumatol.** 28: 1431-1452, 2001
- NAKAMURA, M., FERREIRA, S.H. A Peripheral Sympathetic Component in Inflammatory Hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.** 135: 145-153, 1987
- NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.** 79: 319-326, 1987
- NATHAN, C., XIE, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**. 78: 915-918, 1994
- NOURI, A.M.E., PANAYI, G.S., GOODMAN, S.M. Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease: I – the presence of interleukin-1 in synovial fluids. **Clin Exp Immunol.** 55: 295-302, 1994
- OLIVEIRA, L. M., SILVA, L. F. S. Mecanismos neurais e modulação da dor. In: **Dor: princípios e prática**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2009, cap. 17, p. 235-246

OLIVER, S. J., BRAHN, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **J. Rheum.** 23: 56-60, 1996

ORTEGA, E. I. O tratamento da dor como um direito humano. In: **Dor: princípios e prática**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2009, cap. 3, p. 77-90

O-ISHI, S., SAKUMA, A.A model for rat paw edema. I. Fitness of the model to some types of edema. **Jpn. J. Pharmacol.** 20: 337-348, 1970

PAPARELLA, S., FINKELBERG, E., VARISCO, D., TONDELLI, E., ROCCO, F. Use of zoledronic acid in patients with prostate cancer bone metastases: control of pain and musculoskeletal complications. **Urologia.** 78: 300-304, 2011

PARADA, C. A., REICHLING, D. B., LEVINE, J. D. Chronic hyperalgesic priming in the rat involves a novel interaction between cAMP and PKCepsilon second messenger pathways. **Pain.** 113: 185-190, 2005

PILLINGER, M.H., ABRAMSON, S.B. The neutrophil in rheumatoid arthritis. **Rheum Dis Clin North Am.** 21: 691-713, 1995

POLASCIK, T.J., MOURAVIEV, V. Zoledronic acid in the management of metastatic bone disease. **Ther. Clin. Risk Manag.** 4: 261-268, 2008

POOLE, S., CUNHA, F.Q., SELKIRK, S., LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. **Br. J. Pharmacol.** 115: 684-688, 1995

RAMNATH N., CREAVER P., Matrix metalloproteinase inhibitors. **Curr. Oncol. Rep.** 6: 96-102, 2004

RAMOS, A. M. O., SOARES, M. L. M., ROCHA, L. R. M., JERÔNIMO, S. M. B., ROCHA, F. A. C., PATRÍCIO, F. R. S. Zymosan-induced arthritis in rats: histopathological, histochemical, and biochemical study of the articular cartilage. **Rev. Bras. Reumatol.** 41: 205-212, 2000.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. Fármacos analgésicos. In: **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, cap. 40, p. 640-663

RAO, T. S., SHAFFER, A. F., CURRIE, J. L., ISAKSON, P. C. Role of mast cells in calcium ionophore (A23187)-induced peritoneal inflammation in mice. **Inflammation.** 18: 187-192, 1994.

REES, D. D., PALMER, R. M., SCHULZ, R., HODSON, H. F., MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.** v.101, p. 746-752, 1990

RIBEIRO, R. A., VALE, M. L., THOMAZZI, S. M., PASCHOALATO, A. B., POOLE, S., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 387: 111-118, 2000

ROCHA, F. A., ARAGAO JUNIOR, A.G., OLIVEIRA, R. C., POMPEU, M. M., VALE, M. R., RIBEIRO, R. A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm. Res.** 48: 485-490, 1999

ROCHA, J.C.S., PEIXOTO, M.E., JANCAR, S., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A., ROCHA, F.A. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.** 136: 588-596, 2002

RODAN, G.A., FLEISCH, H.A. Bisphosphonates: mechanisms of action. **J. Clin. Invest.** 97: 2692-2696, 1996

ROGERS, M.J., GORDON, S., BENFORD, H.L., COXON, F.P., LUCKMAN, S.P., MONKKONEN, J., FRITH, J.C. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Cancer.** 88: 2961-78, 2000

ROGERS, M.J. New insights into the molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Curr. Pharm. Design.** 9: 2643–2658, 2003

RUBENS, R.D. Bone metastases – the clinical problem. **Eur. J. Cancer.** 34: 210–213, 1998

RUSSELL, R.G., XIA, Z., DUNFORD, J.E., OPPERMAN, U., KWAASI, A., HULLEY, P.A., KAVANAGH, K.L., TRIFFITT, J.T., LUNDY, M.W., PHIPPS, R.J., BARNETT, B.L., COXON, F.P., ROGERS, M.J., WATTS, N.B., EBETINO, F.H. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. **Ann. N Y Acad. Sci.** 117: 209-257, 2007

SACHS, D., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine_NO_cGMP_protein kinase G_ATP-sensitive K_channel pathway. **PNAS.** 101: 3680-3685, 2004

SACHS, D., VILLARREAL, C., CUNHA, F., PARADA, C., FERREIRA, S.H. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. **Br. J. Pharmacol.** 156: 826-834, 2009

SAKURADA, T., SUGIYAMA, A., SAKURADA, C., TANNO, K., SAKURADA, S., KISARA, K., HARA, A., ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.** 29: 271-278, 1996

SALVEMINI, D., MASINI, E., ANGGARD, E., MANNAIONI, P.F., VANE, J. Synthesis of a nitric oxide-like factor from L-arginine by rat serosal mast cells: stimulation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 169: 596-601, 1990

SALTER, M., STRIJBOS, P.J., NEALE, S., DUFFY, C., FOLLENFANT, R.L., GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP pathway is required for nociceptive signalling at specific loci within the somatosensory pathway. **Neuroscience.** 73: 649-655, 1996

SANSONI, P., PASSERI, G., FAGNONI, F., MOHAGHEGHPOUR, N., SNELLI, G., BRIANTI, V., ENGLEMAN, E.G. Inhibition of antigen-presenting cell function by alendronate in vitro. **J. Bone Miner. Res.** 10: 1719-1725, 1995

SENARANTE, S. G., PIRIANOV, G., MANSI, J. L., ARNETT, T. R., COLSTON, K. W. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. **Br. J. Cancer.** 82: 1459–1468, 2000

SEITZ, M., LOETSCHER, P., DEWALD, B., TOWBIN, H., CESKA, M., BAGGIOLINI, M. Production of interleukin-1 receptor antagonist, inflammatory chemotactic proteins, and prostaglandin E by rheumatoid and osteoarthritic synoviocytes--regulation by IFN-gamma and IL-4. **J. Immunol.** 152: 2060-2065, 1994

SHU, G., YAMAMOTO, K., NAGASHIMA, M. Differences in osteoclast formation between proximal and distal tibial osteoporosis in rats with adjuvant arthritis: inhibitory effects of bisphosphonates on osteoclasts. **Mod. Rheumatol.** 16: 343-349, 2006

SOARES, A.C., LEITE, R., TATSUO, M. A., DUARTE, I. D. Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **Eur. J. Pharmacol.** 400: 67-71, 2000

SOARES, A.C., DUARTE I. D. Dibutyl- γ -cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE₂-induced hyperalgesic paw. **Br. J. Pharmacol.** 134: 127-131, 2001

SOLEHAN, H.M., SAID, M.S., SHAHARIR, S., RAJALINGHAM, S. Rheumatoid arthritis: refractory to infliximab, a tumor necrosis factor inhibitor. **J. Clin. Med. Res.** 3: 270-274, 2011

SOUSA, A.M., PRADO, W.A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. **Brain Res.** 897: 9-19, 2001

SOUZA, G.E., CUNHA, F.Q., MELLO, R., FERREIRA, S.H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions.** 24: 377-380, 1988

STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L., SHOWELL, H.J., REMICK, D.G., PHAN, S.H., WARD, P.A., MARKS, R.M. Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF- α , LPS, and IL-1 β . **Science.** 243: 1467-1469, 1989

SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. **New Horiz.** 3: 3-32, 1995

TAKEMURA, R., WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physiol.** 246: 1-9, 1984

TAIWO, Y. O., LEVINE, J. D. Contribution of guanine nucleotide regulatory proteins to prostaglandin hyperalgesia in the rat. **Brain Res.** 492: 400-403, 1989

- TEIXEIRA, M. J., OKADA, M. Dor: evolução histórica dos conhecimentos. In: **Dor: princípios e prática**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2009, cap. 1, p. 57-66
- TEIXEIRA, M. J., DOWGAN, S.R., SIQUEIRA, T. Epidemiologia da dor. In: **Dor: princípios e prática**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2009, cap. 3, p. 27-56
- TEIXEIRA M. J., FIGUEIRÓ, A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001
- TENENBAUM, H. C., SHELEMAY, A., GIRARD, B., ZOHAR, R., FRITZ, P.C. Bisphosphonates and periodontics: potential applications for regulation of bone mass in the periodontium and other therapeutic/diagnostic uses. **J. Periodontol.** 73: 813-822, 2002
- TONUSSI, C. R., FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain.** 48: 421-427, 1992
- VALE, M. L., MARQUES, J. B., MOREIRA, C. A., ROCHA, F. A., FERREIRA, S. H., POOLE, S., CUNHA, F. Q., RIBEIRO, R. A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 304: 102-108, 2003
- VALE, M. L., BENEVIDES, V. M., SACHS, D., BRITO, G. A., DA ROCHA, F. A., POOLE, S., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q., RIBEIRO, R. A. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. **Br. J. Pharmacol.** 143: 833-844, 2004
- VALE, M. L., CUNHA, F. Q., BRITO, G. A., BENEVIDES, V. M., FERREIRA, S. H., POOLE, S., RIBEIRO, R. A. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **Eur. J. Pharmacol.** 536: 309-317, 2006
- VAN BEEK, E. R., LÖWIK, C. W., EBETINO, F. H., PAPAPOULOS, S. E. Binding and antiresorptive properties of heterocycle-containing bisphosphonate analogs: structure-activity relationships. **Bone.** 23: 437-442, 1998
- VAN DAMME, J., DE LEY, M., VAN SNICK, J., DINARELLO, C.A., BILLIAU, A. The role of interferon-beta 1 and the 26-kDa protein (interferon-beta 2) as mediators of the antiviral effect of interleukin 1 and tumor necrosis factor. **J. Immunol.** 139: 1867-1872, 1987
- VAN DE LOO, F.A., JOOSTEN, L.A., VAN LENT, P.L., ARNTZ, O.P., VAN DEN BERG, W.B., Role of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction: effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. **Arthritis Rheum.** 38: 164-172, 1995
- VERRI, W. A., CUNHA, T.M., PARADA, C. A., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. **Proc. Natl. Sci. USA.** 112: 116-138, 2006
- VIANA, C.F.G., ARAGÃO JR, A.G.M., RIBEIRO, R.A., MAGALHÃES, J.F.G., VALE, M.R. Effect of *Ageratum conyzoides* in nociception and inflammatory response induced by zymosan. **Fitoterapia.** 4: 349-354, 1998

XIE, Q.W., CHO, H.J., CALAYCAY, J., MUMFORD, R.A., SWIDEREK, K.M., LEE, T.D., DING, A., TROSO, T., NATHAN, C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**. 256: 225-228, 1992

WAGNER, R., JANJIGIAN, M., MYERS, R. R. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. **Pain**. 74: 35-42, 1998

WALKER, K., MEDHURST, S.J., KIDD, B.L., GLATT, M., BOWES, M., PATEL, S., MCNAIR, K., KESINGLAND, A., GREEN, J., CHAN, O., FOX, A.J., URBAN, L.A. Disease modifying and anti-nociceptive effects of the bisphosphonate, zoledronic acid in a model of bone cancer pain. **Pain**. 100: 219-229, 2002

WALSH, L.J., TRINCHIERI, G., WALDORF, H.A., WHITAKER, D., MURPHY, G.F. Human Dermal Mast-Cells Contain and Release Tumor-Necrosis-Factor-Alpha, Which Induces Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 88: 4220-4224, 1991

WESTWICK, J., LI, S.W., CAMP, R.D. Novel neutrophil-stimulating peptides. **Immunol. Today**. 10: 146-147, 1989

WIDLER, L., JAHNKE, W., GREEN, J. R. The chemistry of bisphosphonates: from antiscaling agents to clinical therapeutics. **Anticancer Agents Med. Chem**. 12: 95-101, 2012

WOLFE, T. D., PILLAI, S. P., HILDRETH, B. E., LANIGAN, L. G., MARTIN, C. K., WERBECK, J. L., ROSOL, T. J. Effect of zoledronic acid and amputation on bone invasion and lung metastasis of canine osteosarcoma in nude mice. **Clin. Exp. Metastasis**. 28: 377-389, 2011

WONG, M. H., STOCKLER, M. R., PAVLAKIS, N. Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. **Cochrane Database Syst. Rev**. 2: 3474, 2012

ZHOU, W.B., ZHANG, P.L., LIU, X.A., YANG, T., HE, W. Innegligible musculoskeletal disorders caused by zoledronic acid in adjuvant breast cancer treatment: a meta-analysis. **J Exp Clin Cancer Res**. 30: 72, 2011.

ZUAZAGA, D. P., CRELGO, J. G., GORBEA, R. M., PÉREZ A. E., LÓPEZ, C. S. Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonates. Report of three cases. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**. 11: 76-79, 2006