

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ANDERSON MARCOS DO NASCIMENTO SANTOS

**ANÁLISE *IN VITRO* DO EFEITO DA SINVASTATINA COMO TRATAMENTO
DA OSTEOARTRITE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR**

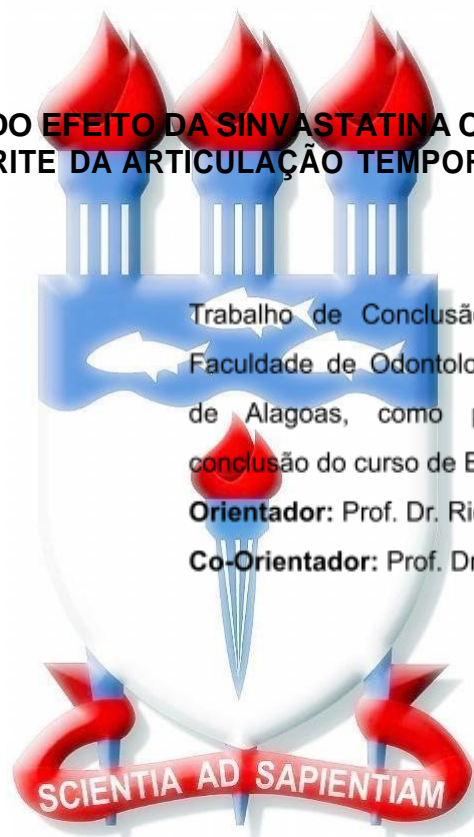


MACEIÓ-AL
2022-02

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ANDERSON MARCOS DO NASCIMENTO SANTOS

**ANÁLISE *IN VITRO* DO EFEITO DA SINVASTATINA COMO TRATAMENTO
DA OSTEOARTRITE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR**



Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para conclusão do curso de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Viana Bessa Nogueira

Co-Orientador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

MACEIÓ-AL

2022-2

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237a Santos, Anderson Marcos do Nascimento.
Análise *in vitro* do efeito da sinvastatina como tratamento da osteoartrite da articulação temporomandibular / Anderson Marcos do Nascimento Santos. – 2022.
26 f. : il.

Orientador: Ricardo Viana Bessa Nogueira.
Co-orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Odontologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 25-26.

1. Tratamento farmacológico. 2. Osteoartrite. 3. Articulação temporomandibular. 4. Sinvastatina. 5. Osteoblastos. I. Título.

CDU: 616.314:616.716




FOLHA DE APROVAÇÃO


ANDERSON MARCOS DO NASCIMENTO SANTOS

ANÁLISE *IN VITRO* DO EFEITO DA SINVASTATINA COMO TRATAMENTO DA OSTEOARTRITE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR


BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 RICARDO VIANA BESSA NOGUEIRA
Data: 22/12/2022 14:10:59-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Ricardo Viana Bessa Nogueira – ORIENTADOR


Documento assinado digitalmente
 MONALY DE OLIVEIRA LIMA
Data: 21/12/2022 18:46:37-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Ma. Monaly de Oliveira Lima - EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 JANAINA ANDRADE LIMA SALMOS DE BRITO
Data: 22/12/2022 13:54:32-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Janaina A. L. Salmos de Brito - EXAMINADORA

APROVADA EM: _____ / _____ / _____

Documento assinado digitalmente
 RICARDO VIANA BESSA NOGUEIRA
Data: 22/12/2022 14:14:27-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Coordenação dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FOUFAL

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, criador dos céus e da Terra, por ter me sustentado e me dado força, sabedoria e discernimento para concluir esta graduação. A Ele seja dada toda honra e glória desde agora e para sempre.

Agradeço a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas, em todo o seu corpo de professores por todo conhecimento ofertado, não apenas instruindo para o exercício da profissão, mas também ensinando e formando um ser humano mais completo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Viana Bessa Nogueira. Por todas as horas arduamente dedicadas a mim dispondo de tempo para me ensinar os caminhos para além da profissão que irei exercer.

Agradeço a minha amada esposa Gabriella Keren por todo apoio incondicional, por ser meu ombro amigo, ser meu bote salva-vidas, minha conselheira, minha ajudadora e meu braço forte. Eu não teria conseguido sem você e serei sempre seu fã número um.

Agradeço imensamente aos meus pais, Aldo Quintino e Elizabete Santos, por serem meus primeiros educadores e por me darem todo o suporte emocional e financeiro para que eu pudesse cursar Odontologia sem precisar me preocupar com outra coisa senão a própria faculdade.

Agradeço aos meus irmãos de sangue Alberto Santos e Lucas Santos que estiveram comigo me auxiliando a cursar e a valorizar uma graduação em uma Universidade pública, gratuita e de qualidade que só a UFAL poderia me proporcionar.

Agradeço imensamente à minha dupla Daniela Ferreira por se tornar não apenas uma dupla nos meus atendimentos, mas uma amiga para todos os momentos e tornar mais leve os momentos de dificuldade na nossa graduação. Também agradeço ao grande Daniel Vasconcellos pela parceria, amizade e companheirismo vivido durante todos esses anos e a todos os meus odontomigos que me aguentaram durante todo curso. Amo vocês e espero que a nossa amizade perdure por muitos anos.

Por fim, agradeço a toda Família do Laboratório de Biologia Celular (LBC/UFAL) na pessoa do Prof. Dr. Emiliano Barreto, Prof. Dr. Marvin Lins, Ma. Juliane Pereira, Ma. Liliane Patrícia, Alef Bezerra e Erick Ferreira (Erinho) e em especial ao Me. Julianderson Carmo e a Ma. Monaly Lima que ultrapassaram os ensinamentos acadêmicos e se tornaram amigos que carrego no meu peito.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do processo de passagem celular.	15
Figura 2: Esquema do ensaio de Viabilidade Celular.	17
Figura 3: Esquema do protocolo para a quantificação de Óxido Nítrico	18
Figura 4: Efeito da sinvastatina sobre a viabilidade de células osteoblásticas MG-63 após 24 horas	19
Figura 5: Efeito da sinvastatina sobre a viabilidade de células osteoblásticas MG-63 após 48 horas	20
Figura 6: Efeito da sinvastatina sobre a produção de nitrito por células MG-63 estimuladas por LPS	21

SUMÁRIO

MANUSCRITO	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVO	13
3. METODOLOGIA	14
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	24

MANUSCRITO

MANUSCRITO

**ANÁLISE *IN VITRO* DO EFEITO DA SINVASTATINA COMO TRATAMENTO
DA OSTEOARTRITE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR**

IN VITRO ANALYSIS OF THE EFFECT OF SIMVASTATIN AS A TREATMENT OF
OSTEOARTHRITIS OF THE TEMPOROMANDIBULAR JOINT

ANDERSON MARCOS DO NASCIMENTO **SANTOS**¹

RICARDO V. BESSA-NOGUEIRA²

1 Discente, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Alagoas (FOUFAL), Maceió, Brasil.

2 Professor Associado, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Alagoas (FOUFAL), Maceió, Brasil.

Autor de correspondência:

Ricardo V. Bessa Nogueira, DDS; MSc; Ph.D

Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Alagoas

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Campus A. C. Simões,

Cidade Universitária, 57072-900, Maceió, Alagoas, Brasil.

Telefone: 55-82-32141169 Fax: 55-82-32141169

E-mail: ricardo.bessa@foufal.ufal.br

RESUMO

A osteoartrite consiste na degeneração musculoesquelética e da cartilagem, incluindo remodelação do tecido ósseo condilar, sendo uma das formas mais comuns das artrites. Suas principais manifestações são com quadros agudos e crônicos de dor, bem como apresentação de desarranjos internos da articulação temporomandibular, podendo prejudicar a fala, mastigação e outros movimentos mandibulares. A sinvastatina é um fármaco que tem se destacado em estudos que apresentam efeitos imunomoduladores, antioxidantes e antiinflamatórios, e com isso, se mostrando capaz de regular o processo inflamatório. O objetivo do estudo foi avaliar a ação da sinvastatina na modulação do processo inflamatório da osteoartrite da articulação temporomandibular. Trata-se de um estudo do tipo experimental, onde foi utilizada a linhagem de osteoblastos humanos MG-63 para avaliar *in vitro* os efeitos da sinvastatina. Os resultados demonstraram que após 24 horas a concentração de 30 μM de sinvastatina diminuiu a viabilidade celular dos osteoblastos, contudo, após 48h, houve redução da viabilidade celular nas concentrações de 0,3; 1; 3; 10 e 30 μM . Ao mensurar a produção de óxido nítrico por osteoblastos estimulados por LPS foi constatado que houve diminuição da produção de nitrito ao tratamento com sinvastatina nas concentrações de 0,1; 0,3; 1 e 3 μM . Com isso, até o momento, o tratamento com sinvastatina se mostrou capaz de reduzir a produção de nitrito em concentrações inferiores a 3 μM , diminuindo os níveis de óxido nítrico nas células MG-63, fortalecendo seu potencial modulador da inflamação.

PALAVRAS CHAVES:

Tratamento Farmacológico; Osteoartrite; Articulação Temporomandibular; Sinvastatina; Osteoblastos.

ABSTRACT

Osteoarthritis consists of musculoskeletal and cartilage degeneration, including remodeling of the condylar bone tissue, being one of the most common forms of arthritis. Its main manifestations are with acute and chronic pain, as well as the presentation of internal disorders of the temporomandibular joint, which may impair speech, chewing and other mandibular movements. Simvastatin is a drug that has stood out in studies that show immunomodulatory, antioxidant and anti-inflammatory effects, and with that, it has been shown to be able to regulate the inflammatory process. The objective of the study was to evaluate the action of simvastatin in the modulation of the inflammatory process of osteoarthritis of the temporomandibular joint. This is an experimental study, where the MG-63 human osteoblast lineage was used to evaluate the effects of simvastatin in vitro. The results showed that after 24 hours the concentration of 30 μM of simvastatin reduced the cell viability of osteoblasts, however, after 48 hours, there was a reduction in cell viability at concentrations of 0.3; 1; 3; 10 and 30 μM . When measuring the production of nitric oxide by osteoblasts stimulated by LPS, it was observed that there was a decrease in the production of nitrite when treated with simvastatin at concentrations of 0.1; 0.3; 1 and 3 μM . Thus, so far, treatment with simvastatin has been shown to be able to reduce nitrite production, decreasing levels of nitric oxide in MG-63 cells, strengthening its potential to modulate inflammation.

KEYWORDS:

Drug Therapy; Osteoarthritis; Temporomandibular Joint; Simvastatin; Osteoblasts.

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) consiste na degeneração musculoesquelética e da cartilagem, incluindo remodelação do tecido ósseo condilar, sendo uma das formas mais comuns das artrites, afetando aproximadamente 15% da população mundial, em maioria do gênero feminino. Neste processo ocorre um desequilíbrio fisiológico que é oriundo da diminuição na capacidade adaptativa da articulação temporomandibular (ATM) a sobrecargas funcionais, provocada por deslocamento do disco articular, ação de mediadores inflamatórios e aumento da fricção mecânica que convergem para o aumento da degeneração tecidual (BIANCHI, 2019).

A osteoartrite da articulação temporomandibular (OA-ATM) é o resultado de uma resposta biológica a uma perturbação na remodelação da articulação temporomandibular. Em uma situação de sobrecarga, a articulação muda a sua conformação a fim de manter o equilíbrio entre a articulação, a função do aparelho estomatognático e a oclusão. Entretanto, o prolongamento dessa situação de sobrecarga acarreta em uma remodelação incorreta da ATM. Sendo assim, fatores mecânicos, hábitos e sobrecargas funcionais são as causas mais comuns que levam ao acometimento da OA-ATM (DERWICH; MITUS-KENIG; PAWLOWSKA, 2020).

A OA pode acometer qualquer articulação do corpo, contudo, estudos indicam que os locais de maior acometimento da OA são o quadril, joelhos, mãos, pés e coluna vertebral. O diagnóstico das OAs pode ser realizado por meio de imagens radiográficas, bem como com possíveis sintomas que possam estar acometendo o indivíduo. Ela afeta majoritariamente mulheres e pessoas acima de 50 anos de idade. Na ATM, a OA pode se desenvolver de forma assintomática, porém, não é descartado que haja sintomas como dor articular e crepitação em movimentos mandibulares (LITWIC, 2013; DU, 2020).

Existem algumas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento da OA-ATM, que partem desde o tratamento conservador até manobras cirúrgicas. Como tratamento conservador pode ser entendido a prescrição de medicamentos anti-inflamatórios (esteroidais ou não-esteroidais) e fisioterapia. Ainda podem ser realizadas manobras mais invasivas como injeções intra-articulares, artrocentese e artroscopia (DERWICH; MITUS-KENIG; PAWLOWSKA, 2020).

As estatinas são uma classe de medicamentos (cuja sinvastatina faz parte) amplamente utilizadas para o tratamento de hiperlipidemias. Estudos apontam que seu uso também possui um efeito protetor nos ossos inibindo apoptose e combatendo fatores pró-inflamatórios, além de induzir a osteoblastogênese e inibir a osteoclastogênese. A principal ação das estatinas é inibir a produção da enzima HMG-Coa redutase, bloqueando a via do mevolonato, diminuindo a produção de colesterol. Esta via é de fundamental importância para a sinalização de mediadores inflamatórios (DU, 2020; HORECKA, 2016).

Estudos recentes têm demonstrado que, em modelos animais, a sinvastatina é capaz de estimular a regeneração óssea e promover a formação óssea. Isso pode ser explicado devido às propriedades deste fármaco em promover a diferenciação de osteoblastos, promover atividades anti-inflamatórias, inibir a ação de osteoclastos e promover a neovascularização. Isto decorre da influência da sinvastatina sobre proteínas morfogenéticas e fatores de crescimento endotelial e seu efeito anti-inflamatório, pela inibição de metaloproteinases da matriz (GUPTA; DEL FABBRO; CHANG, 2019).

A interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), prostaglandinas (PG) e óxido nítrico (NO) estão entre os mediadores inflamatórios encontrados em superprodução nas articulações de pacientes com OA-ATM. Dentre eles, destaca-se o NO, que é considerado como um mediador catabólico da inflamação que favorece a apoptose e a produção de citocinas pró-inflamatórias. O NO é sintetizado pela conversão de L-arginina em NOH-arginina. A diminuição dos níveis de óxido nítrico induzido (iNOS) tem como resultado a diminuição de mediadores inflamatórios na OA-ATM (ABRAMSON, 2008; ABRAMSON, 2008).

O NO está envolvido nos mecanismos de dor inflamatória, fato demonstrado através de avaliações experimentais em modelos animais, nos quais foram administrados inibidores de NO e a sensação dolorosa diminuiu, especialmente em artrites. A nível celular, o NO é responsável por promover a mediação de diversas funções celulares no local da inflamação sinovial, destacando-se a transdução de sinal, a função mitocondrial e a apoptose. Entretanto, o NO não se difunde para outros tecidos, sendo produzido localmente por osteoblastos e participa das patologias articulares (ALI, 2014; ROCHA, 2003).

Os osteoblastos são células especializadas mononucleares derivadas de células-tronco mesenquimais pluripotentes que podem se diferenciar por meio da ativação de

diferentes vias de transcrição de sinalização em diferentes linhagens de células mesenquimais, como osteoblastos, condrócitos, fibroblastos, mioblastos e adipócitos. Os osteoblastos estão entre as células que compõem a ATM, estando associado a remodelação do osso subcondral, sendo, juntamente com os condroblastos, células fundamentais na homeostase da ATM e seu desarranjo está associado a distúrbios articulares (MARUOTTI; CORRADO; CANTATORE, 2017).

Além disso, os osteoblastos estão envolvidos na diferenciação de osteoclastos por meio do sistema RANK/RANKL/OPG. Nesse sistema RANK se liga a metaloproteinases formando o ligante RANKL essa ligação entre RANK-RANKL por consequência irá formar mediadores do tipo TNF e NF- κ B que estão envolvidos na osteoclastogênese, promovendo a remodelação óssea. Uma alteração no sistema RANK/RANKL/OPG associada a uma situação de carga anormal leva a uma alteração no perfil desses osteoblastos prejudicando a homeostase óssea (MARUOTTI; CORRADO; CANTATORE, 2017; KOVÁCS; VAJDA; NAGY, 2019).

De posse destas informações, o objeto de estudo dessa pesquisa foi avaliar a ação da sinvastatina na modulação do processo inflamatório da osteoartrite da articulação temporomandibular (ATM), no tocante à viabilidade e produção de NO por osteoblastos. Diante do exposto, o presente estudo teve como questão de pesquisa: qual a ação da sinvastatina na modulação do processo inflamatório da osteoartrite da articulação temporomandibular (ATM)?

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a ação da sinvastatina na modulação do processo inflamatório da osteoartrite da articulação temporomandibular.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Avaliar o efeito da sinvastatina sobre a viabilidade de osteoblastos;
2. Avaliar o efeito da sinvastatina na produção de óxido nítrico de osteoblastos estimulados com LPS.

3. METODOLOGIA

Este estudo classifica-se como um estudo original, do tipo experimental, realizado entre outubro de 2020 a julho de 2022 no Laboratório de Biologia Celular (LBC), no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas.

3.1 Cultura de Células

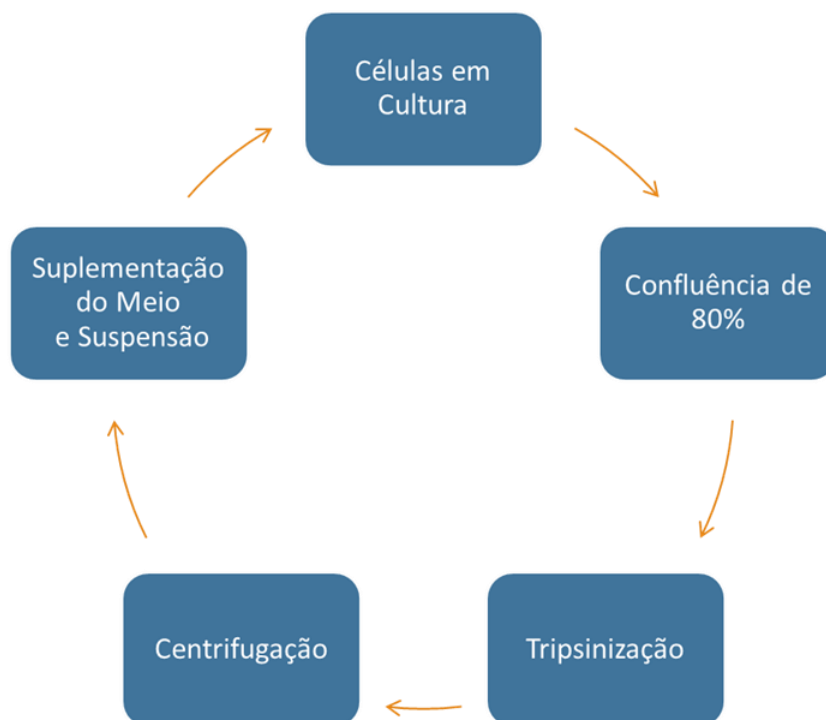
Osteoblastos humanos da linhagem (MG-63), obtidos do banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram semeados seguindo as instruções do BCRJ, em meio de cultura Dulbecco's Eagle Modified Medium (DMEM), suplementados com Soro Bovino Fetal (SBF 10%), penicilina/streptomicina (0,02%), piruvato de sódio (1 mM) e L-glutamina (2 mM), em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ a 37°C em garrafas de cultura de 25 cm³. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscópio invertido (Olympus IX70).

As células foram mantidas por meio de trocas de suplementação a cada 72 horas com confluência celular em torno de 80% (ISHIMOTO, 2019), seguindo a sequência:

1. Desaderir as células da garrafa: realizado por meio de tripsinização, utilizando 3 mL de tripsina a 0,05% por 5 minutos;
2. Centrifugação: transferência das células para um tubo cônico com 8 mL de meio suplementado para centrifugação durante 10 minutos;
3. Descarte e suspensão: o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com a adição de um 1 mL de meio DMEM para posterior passagem para a nova garrafa de cultura com meio suplementado nas mesmas condições de cultura.

Para melhor exemplificação desta metodologia, a figura 1 descreve o ciclo para a passagem das células.

Figura 1 - Esquema do processo de passagem celular.



A figura mostra as etapas em sequência do protocolo de manutenção das células em cultura. O período entre as passagens foi entre 3 a 5 dias. Fonte: Autor, 2022.

3.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi mensurada após o tratamento com sinvastatina por 24h utilizando o método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), descrito por Mosmann (1986). Este método objetiva a avaliação indireta da viabilidade celular por meio da mensuração da densidade óptica a partir da formação dos cristais de *formazan* no citoplasma celular. Macroscopicamente, quanto mais intensa é a coloração formada pela produção desses cristais, maior a quantidade de células viáveis (MOSMANN, 1983; MASCARO, 2011).

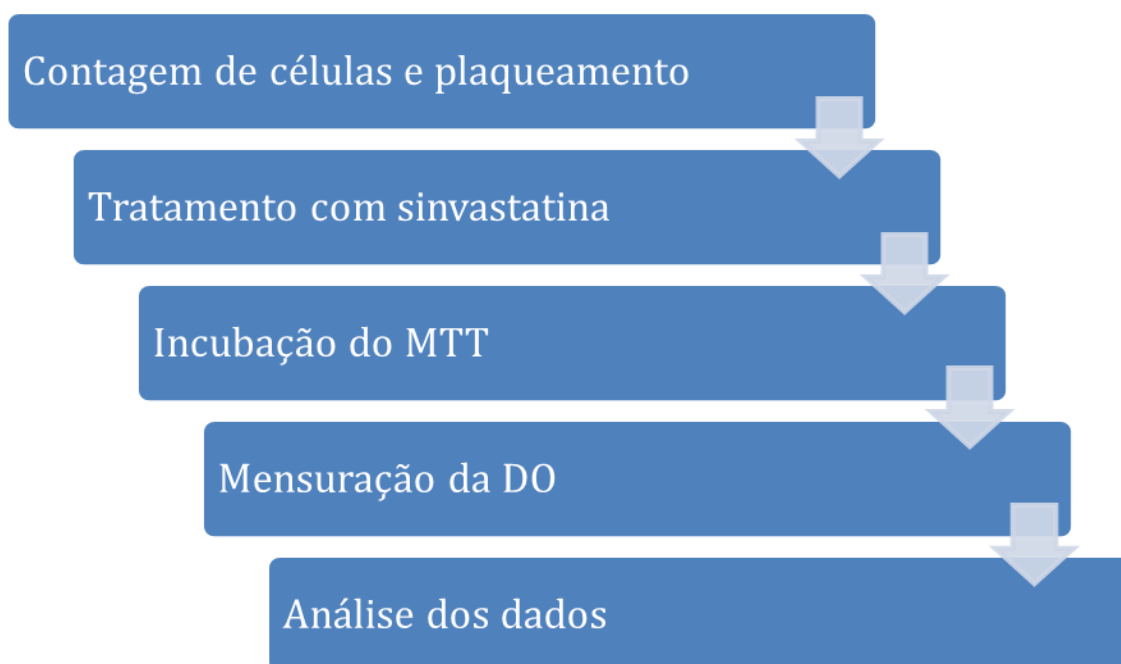
Para este ensaio, a linhagem de osteoblastos MG-63 foram distribuídos em duas placas de 96 poços, em meio DMEM suplementado, na densidade de 7×10^3 células/poço, em um volume de 200 μ L/poço, sendo mantidas em estufa de 5% de CO_2 a 37°C durante *overnight* para que houvesse adesão das células em suspensão no fundo da placa de cultura. No dia seguinte, as duas placas foram distribuídas nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo Controle:** células expostas apenas a meio de cultura;
- **Grupo Sinvastatina:** células expostas a meio de cultura com sinvastatina nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 μM .

Posteriormente, as células foram submetidas ao tratamento nos grupos citados em um meio DMEM suplementado com SBF a 2%, penicilina/streptomicina (0,02%), piruvato de sódio (1 mM) e L-glutamina (2 mM) (grupo controle) e neste mesmo meio DMEM adicionado de sinvastatina nas diferentes doses (grupo tratado) por 24h e 48h em estufa de CO_2 . Esta diminuição no percentual de SBF se dá para que não ocorra multiplicação celular excessiva, a fim de evitar que falte substrato necessário para a manutenção das células em homeostase. Após o tratamento de 24h e 48h foi adicionado 25 μL /poço de MTT (na dose de 5 mg/mL). O MTT foi incubado por 4 horas em estufa. Após isso, descartamos o sobrenadante e adicionamos 150 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), para solubilizar os cristais de formazan produzidos. A densidade óptica (DO) da solução em cada poço foi mensurada a 540 nm em espectrofotômetro. O percentual de viabilidade celular foi determinado seguindo a fórmula padrão:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Densidade óptica das células tratadas}}{\text{Densidade óptica das células não tratadas}} \times 100$$

Figura 2 - Esquema do ensaio de Viabilidade Celular.



Segundo esquema, são indicadas as etapas para a realização do ensaio de viabilidade celular, que objetivou a determinação de concentração viável a ser utilizada no presente estudo. Fonte: Autor, 2022.

3.3 Quantificação de óxido nítrico

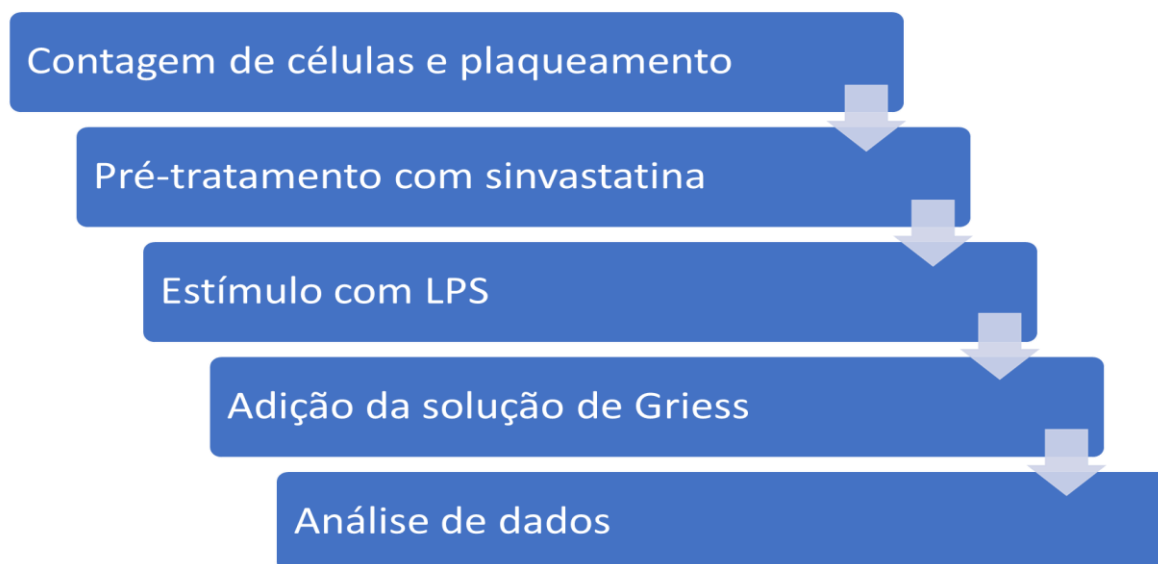
A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pelo método de Griess. Este ensaio consiste na mensuração nos níveis de nitrito produzidos no sobrenadante das células em cultura, sendo assim considerado um método indireto para a avaliação de NO. Neste ensaio, as células foram distribuídas em microplacas de 96 poços em meio DMEM a 10% SBF na densidade de 5×10^3 células/poço, em um volume de 200 μL por poço, sendo mantidas *overnight* em estufa de 5% de CO_2 a 37°C . Posteriormente, as células foram mantidas em meio de cultura suplementado com 2% de SBF por 24 horas, e organizadas nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo Controle:** células expostas apenas a meio de cultura;
- **Grupo Sinvastatina:** células expostas a meio de cultura com 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 μM de sinvastatina;
- **Grupo LPS:** células expostas a meio de cultura e estimuladas com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS;

- **Grupo Sinvastatina+LPS:** células expostas a meio de cultura com 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 μM de sinvastatina e estimuladas com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de LPS;

Após 24 horas, 100 μL do sobrenadante de cada poço/grupo de células MG-63, previamente tratados com sinvastatina nas diferentes concentrações citadas anteriormente, foram recolhidos e transferidos para outra placa de 96 poços. Uma regressão linear, a partir da curva padrão, foi utilizada para avaliar as concentrações de nitrito obtidas a partir do sobrenadante de cada amostra. Após diluições seriadas, a partir de 100 μL . A figura 3 descreve o passo a passo desta técnica.

Figura 3 - Esquema do protocolo para a quantificação de Óxido Nítrico.



Neste esquema, estão descritas as etapas para a realização do ensaio para quantificação de óxido nítrico a partir da coleta do sobrenadante celular. Fonte: Autor, 2022

3.4 Análise estatística

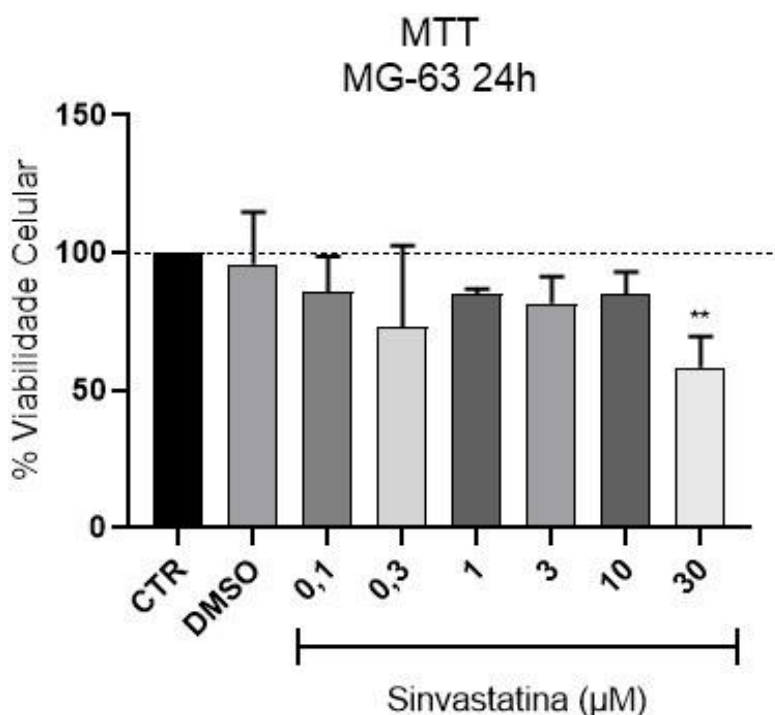
Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados foram analisados através do teste one-way ANOVA, aplicando-se o pós-teste de Newman Keuls. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para construção dos gráficos, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 7.00.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da sinvastatina sobre a viabilidade de osteoblastos

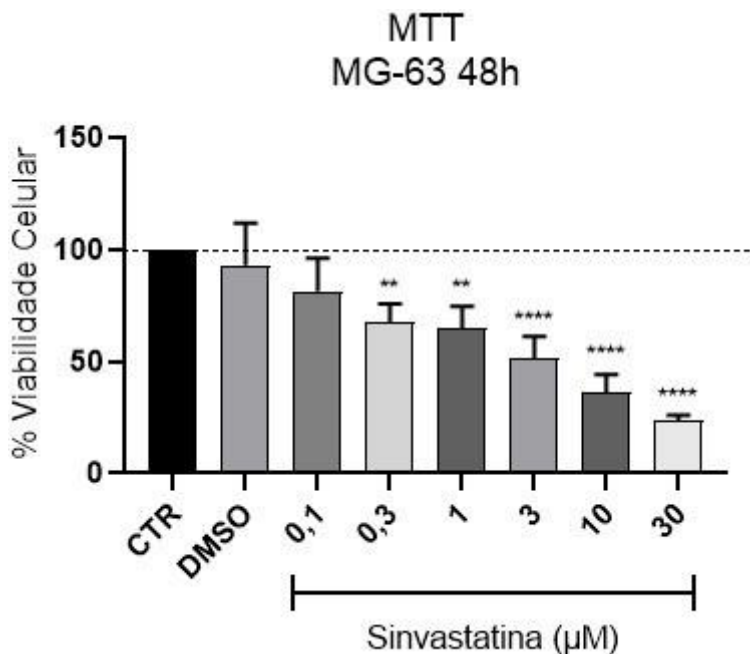
Com o intuito de observar a ação da sinvastatina sobre a viabilidade celular de osteoblastos do tipo MG-63, foi observado que após 24h de tratamento, a sinvastatina foi capaz de reduzir a viabilidade dessas células apenas na concentração de 30 μM , em relação ao grupo controle (figura 4). Entretanto, ao analisar a viabilidade destas células após o período de 48h, observou-se que houve redução da viabilidade celular nas concentrações de 0,3; 1; 3; 10 e 30 μM , em relação ao grupo controle (figura 5). Células expostas ao DMSO 1% (veículo) em ambos os tempos (24 e 48 h) não exibiram alterações significativas na viabilidade quando comparadas às células do grupo controle.

Figura 4 - Efeito da sinvastatina sobre a viabilidade de células osteoblásticas MG-63 após 24 horas



Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT em células MG-63 expostas apenas a meio de cultura (CTR), células expostas a DMSO (DMSO) e células tratadas com sinvastatina nas concentrações (0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 μM) após 24 horas. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA One-Way seguido do pós-teste Newman-Keuls. As barras representam a média \pm EPM ($n = 4$) da porcentagem de células viáveis, com ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (tracejado no gráfico).

Figura 5 - Efeito da sinvastatina sobre a viabilidade de células osteoblásticas MG-63 após 48 horas.

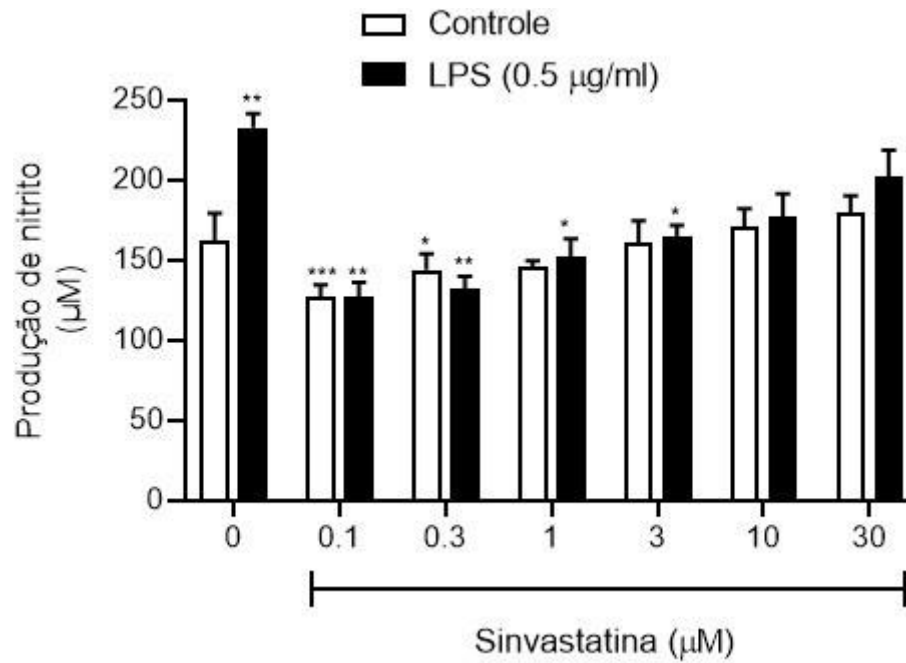


Ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de MTT em células MG-63 expostas apenas a meio de cultura (CTR), células expostas a DMSO (DMSO) e células tratadas com sinvastatina nas concentrações (0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 µM) após 48 horas. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA One-Way seguido do pós-teste Newman-Keuls. As barras representam a média ± EPM ($n = 4$) da porcentagem de células viáveis, com ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,001$ comparado às células não tratadas no respectivo tempo de análise.

4.2 Efeito da sinvastatina sobre a produção de óxido nítrico em células MG-63 estimuladas com LPS

Para avaliar se o tratamento com a sinvastatina é capaz de reduzir a produção de óxido nítrico em células osteoblásticas do tipo MG-63, foi realizado um pré-tratamento com a sinvastatina nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 µM com posterior estímulo com 0,5 µg/mL de LPS. Com isso, foi possível observar que após 24 horas o tratamento com sinvastatina foi capaz de reduzir a produção de nitrito de células estimuladas com LPS nas concentrações de 0,1; 0,3; 1 e 3 µM. (Figura 6)

Figura 6 - Efeito da sinvastatina sobre a produção de nitrito por células MG-63 estimuladas por LPS.



Produção de nitrito por células osteoblásticas (5×10^3) na presença de LPS por 24 horas com e sem a utilização de sinvastatina nas diferentes concentrações onde 0 equivale ao grupo sem tratamento com sinvastatina. A análise estatística foi realizada mediante o teste ANOVA One-Way seguido do pós-teste Newman-Keuls, onde valor de $p < 0,05$. Diferenças significativas entre os valores estão representadas por (***)

5. DISCUSSÃO

A OA-ATM é uma patologia crônica que provoca uma degeneração da articulação temporomandibular que pode causar dor, problemas de mastigação e disfunções ao aparelho estomatognático. Estudos recentes têm realizado um reposicionamento da sinvastatina, de seu uso para o tratamento de dislipidemias, para sua utilização no manejo de OAs, isto decorre de experimentação científica que pode demonstrar propriedades anti-inflamatórias e atividades de promoção de diferenciação de osteoblastos desse fármaco. Dessa forma, elencar novas experimentações se mostra de grande valor científico para proporcionar um novo tratamento para OA-ATM (BIANCHI, 2019; HORECKA, 2016).

Ao se observar a ação da sinvastatina sobre a viabilidade celular de células osteoblásticas MG-63 *in vitro* após 24 horas, nossos resultados mostraram que apenas na concentração de 30 μM , a sinvastatina foi capaz de reduzir de maneira significativa o número de células viáveis em 40%. Buscando ter um acompanhamento de maior amplitude de tempo, uma nova amostra experimental tratada em iguais condições foi realizada e observada após 48 horas. Com isso, ficou demonstrado que a sinvastatina reduziu a proporção de células viáveis a partir de menores concentrações (0,3 μM). Dessa forma, nossos achados indicam uma limitação na concentração e tempo de tratamento com sinvastatina para estudos posteriores.

Em um estudo realizado em camundongos, as concentrações crescentes de 1 μM , 5 μM e 10 μM sinvastatina foram capazes de aumentar a viabilidade celular em condrócitos em modelo de trauma de ATM induzido após 7 dias de tratamento. Isto demonstra um efeito protetivo da sinvastatina em células que compõem a articulação temporomandibular (RIEGGER, 2022).

Um estudo realizado na Índia por Suthanthiran e colaboradores, demonstraram que foi observada a diminuição da viabilidade celular em células SaSO-2 (uma linhagem de osteoblastos) em concentrações superiores a 2 mg (equivalente a 5 μM). Outro estudo avaliou a viabilidade celular de fibroblastos estimulados com 3 $\mu\text{g/mL}$ de LPS frente às concentrações de sinvastatina de 1 a 50 μM e fez uma relação com o percentual de apoptose, concluindo que o aumento da concentração de sinvastatina se

mostrou dose-dependente com o aumento dos níveis de apoptose neste estudo (LITINSKY, 2009). Comparando estes estudos com os nossos, observa-se uma limitação na concentração segura do tratamento com sinvastatina em células humanas.

A fim de verificar o potencial da sinvastatina na modulação da inflamação, foi realizado o ensaio para quantificação de óxido nítrico (um marcador de inflamação). Para isso, as células foram tratadas com sinvastatina nas concentrações de 0,1 a 30 μM e estimuladas com LPS. Assim, foi possível observar que a sinvastatina foi capaz de reduzir a produção de nitrito nas concentrações de 0,1; 0,3; 1 e 3 μM em células MG-63 estimuladas com LPS.

O óxido nítrico está fortemente associado a OA e seus mediadores liberados, como a IL-1, o TNF- α são mediadores que favorecem a inflamação, bem como a sinalização por o NF- κB . Estudos sugerem que a sinvastatina é capaz de regular negativamente a produção de NF- κB que, por consequência, diminuirá a produção de NO e de espécies reativas de oxigênio, impedindo o progresso da OA-ATM (CHANG, 2014).

Conforme o estudo de Yu e Kim (2018) a sinvastatina também se mostrou capaz de reduzir a produção de NO por meio do bloqueio da ação das metaloproteinases (MMPs) 1 e 13 em condrócitos. As MMPs estão presentes nas articulações e são responsáveis pela degradação de colágeno, proteoglicanos e outros elementos da matriz extracelular. Sendo assim, a ação da sinvastatina em inibir a produção de MMPs e NO é benéfica ao tratamento da OA-ATM.

6. CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, a sinvastatina se mostrou um fármaco de efeito dose-dependente e tempo-dependente sobre a viabilidade de osteoblastos humanos do tipo MG-63. Com relação ao efeito modulador da inflamação pela sinvastatina, ela mostrou-se capaz de diminuir a produção de nitrito em células estimuladas com LPS nas suas diferentes concentrações.

Levando em consideração a importância de se estudar novos tratamentos para doenças degenerativas, como a OA-ATM, faz-se necessário o aumento da produção científica acerca de experimentos com osteoblastos humanos tratados com sinvastatina, permitindo a evolução terapêutica e impactando diretamente a prática clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, Steven B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 10, n. 2, p. 1-7, 2008.

ABRAMSON, Steven B. Osteoarthritis and nitric oxide. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 16, p. S15-S20, 2008.

ALI, Adel Mahmoud et al. Níveis de óxido nítrico mais elevados estão associados à atividade da doença em pacientes egípcios com artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, p. 446-451, 2014.

BIANCHI, Jonas. Temporomandibular joint osteoarthritis: integrative analysis of clinical, biomolecular and imaging markers. Tese (Doutorado em Ciências Odontológicas). Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2019.

CHANG, Chih-Hung et al. Anti-inflammatory effects of hydrophilic and lipophilic statins with hyaluronic acid against LPS-induced inflammation in porcine articular chondrocytes. **Journal of orthopaedic research**, v. 32, n. 4, p. 557-565, 2014.

DERWICH, Marcin; MITUS-KENIG, Maria; PAWLOWSKA, Elzbieta. Interdisciplinary approach to the temporomandibular joint Osteoarthritis—Review of the literature. **Medicina**, v. 56, n. 5, p. 225, 2020..

DU, Jing et al. Effect of high fat diet and excessive compressive mechanical force on pathologic changes of temporomandibular joint. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2020.

GUPTA, Swati; DEL FABBRO, Massimo; CHANG, Jia. The impact of simvastatin intervention on the healing of bone, soft tissue, and TMJ cartilage in dentistry: a systematic review and meta-analysis. **International journal of implant dentistry**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2019.

HORECKA, Anna et al. Simvastatin effect on calcium and silicon plasma levels in postmenopausal women with osteoarthritis. **Biological trace element research**, v. 171,

n. 1, p. 1-5, 2016.

ISHIMOTO, Kaichi et al. Rapid establishment of highly migratory cells from cancer cells for investigating cellular functions. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 39, n. 3, p. 194-198, 2019.

KOVÁCS, Béla; VAJDA, Enikő; NAGY, Előd Ernő. Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4653, 2019.

LITINSKY, Ira et al. Simvastatin induces apoptosis of fibroblast-like synoviocytes. **The Open Rheumatology Journal**, v. 3, p. 35, 2009..

LITWIC, Anna et al. Epidemiology and burden of osteoarthritis. **British medical bulletin**, v. 105, n. 1, p. 185-199, 2013.

MARUOTTI, Nicola; CORRADO, Addolorata; CANTATORE, Francesco P. Osteoblast role in osteoarthritis pathogenesis. **Journal of cellular physiology**, v. 232, n. 11, p. 2957-2963, 2017.

MASCARO, Marcelo Betti et al. Efeito do lipopolissacarídeo de Escherichia coli sobre a proliferação de osteoblastos. **ConScientiae Saúde**, v. 10, n. 2, p. 210-214, 2011.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

RIEGGER, Jana et al. Simvastatin and fluvastatin attenuate trauma-induced cell death and catabolism in human cartilage. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 2022.

ROCHA, Francisco Airton Castro da et al. Effect of nitric oxide synthase in articular inflammatory pain and cellular influx of zymosan-induced arthritis in rats. **Revista**

Brasileira de Reumatologia, v. 43, p. 206-217, 2003.

SUTHANTHIRAN, Thanga Kumaran et al. Collagen with simvastatin promotes cell metabolism in osteoblast-like SaOS-2 cells. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 4, n. Suppl 2, p. S142, 2012..

YU, Seon-Mi; KIM, Song Ja. Simvastatin prevents articular chondrocyte dedifferentiation induced by nitric oxide by inhibiting the expression of matrix metalloproteinases 1 and 13. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 15-16, p. 1165-1172, 2018.