



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL

WALESKA VIDAL DE FREITAS CARVALHO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO CLORETO DE MAGNÉSIO EM MODELO DE
ARTRITE EXPERIMENTAL

FORTALEZA – CEARÁ

2023

WALESKA VIDAL DE FREITAS CARVALHO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO CLORETO DE MAGNÉSIO EM MODELO DE
ARTRITE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia. Área do conhecimento: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Pratas Regadas

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Carolina Matias Dinelly Pinto

Coorientador: Prof. Dr. Edilson Martins Rodrigues Neto

FORTALEZA – CEARÁ

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo SidUECE, mediante os dados fornecidos pelo(a)

Carvalho, Waleska Vidal de Freitas.

Efeito anti-inflamatório do cloreto de magnésio em modelo de Artrite experimental [recurso eletrônico] / Waleska Vidal de Freitas Carvalho. - 2023.

63 f. : il.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal Nível Mestrado, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Rommel Prata Regadas.

Coorientação: Prof^a. Dra. Ana Carolina Matias Dinelly Pinto, Prof. Dr. Edilson Martins Rodrigues Neto.

1. Magnésio. 2. Artrite. 3. Zymosan. I. Título.

WALESKA VIDAL DE FREITAS CARVALHO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO CLORETO DE MAGNÉSIO EM MODELO DE
ARTRITE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia. Área do conhecimento: Biotecnologia.


Aprovada em: 31 de agosto de 2023.

BANCA EXAMINADORA




Prof. Dr. Rommel Prata Regada (orientador)

Universidade Estadual do Ceará

Documento assinado digitalmente
 **FATIMA DE CASSIA EVANGELISTA DE OLIVEIRA**
Data: 31/08/2023 15:51:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dra. Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira

Centro Universitário Maurício de Nassau – UNINASSAU

Documento assinado digitalmente
 **MARIA FRANCILENE SOUZA SILVA**
Data: 31/08/2023 15:54:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Maria Francilene Souza Silva

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Documento assinado digitalmente
 **ANA CAROLINA MATIAS DINELLY PINTO**
Data: 31/08/2023 15:51:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Ana Carolina Matias Dinelly Pinto (Orientador)

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Aos meus filhos: Rodolfo Viana Carvalho
Filho e Benício de Freitas Carvalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, ele quem me sustenta, guia e protege.

Aos meu filhos Rodolfo e Benício, minha vida.

Aos meus pais, por toda ajuda e cuidado com os meninos.

Aos meus irmãos, por todo incentivo

À minha querida orientadora Dra. Ana Carolina Matias Dinelly Pinto, pela cumplicidade, compreensão, paciência, dedicação e ensinamentos, obrigada por não soltar minha mão.

Aos meus amigos e amigas, por compreenderem minha ausência.

As amigas e companheiras de luta Suely, Newlene e Dany pelo companheirismo nessa jornada.

Aos meus amigos Ramon, Mariana e Lilian pela torcida e incentivo de sempre.

A UNICATÓLICA pelo incentivo e apoio financeiro.

“Nenhuma grande descoberta foi feita
jamais sem um palpite ousado”.

(Isaac Newton)

RESUMO

As artropatias tem etiopatogenia multifatorial, envolvendo aspectos genéticos, ambientais, infecciosos e imunológicos. Tendo a dor como uma das principais queixas dos indivíduos acometidos por patologia nas articulações sinoviais, sendo uma das razões mais comuns de procura por atendimento médico. O uso de produtos naturais vem ganhando destaque para utilização em diversos tratamentos, sejam eles de formas caseiras ou industriais. Existe um crescente interesse na utilização desses produtos para modular respostas imunes e neutralizar processos inflamatórios, e um dos produtos que vem ganhando destaque, pelos seus benefícios clínicos, é o cloreto de magnésio, amplamente utilizado na medicina leiga para alívio da dor em doenças musculoesqueléticas. Os sais de Mg mostraram fornecer analgesia no pós-operatório em cirurgia ortopédica e baixos níveis de Mg foram associados ao desenvolvimento e gravidade da artrite. Determinamos a atividade anti-inflamatória do $MgCl_2$ em um modelo de artrite aguda. Após aprovação do CEUA sob o nº 05/2018, os camundongos receberam 0,1 mg/25 μ L de Zymosan (Zy) ou solução salina nos joelhos. A dor articular foi avaliada pelo teste de von Frey; influxo celular e nível de interleucina (IL)-1 foram avaliados em lavagem articular às 6h. As sinóvias foram excisadas para histopatologia e análise da imunoexpressão do fator nuclear kappa B (NF κ B) e do fator de necrose tumoral (TNF)- α . Grupos (n=6/grupo) receberam 90mg/kg de $MgCl_2$ /100 μ L ou soro fisiológico per os (sistêmico) ou 500 μ g/25 μ L de $MgCl_2$ ou soro fisiológico por via intra-articular (i.a.) 30 min antes de Zy. O $MgCl_2$ administrado sistemicamente ou localmente reduziu o influxo celular (p=0,0012 e p=0,0269, respectivamente), a dor (p=0,0005. ep=0,0038, respectivamente) e o nível intra-articular de IL-1 (p=00391), em comparação com a solução salina. O $MgCl_2$ sistêmico diminuiu a imunoexpressão de NF κ B (p<0,05), em comparação com a solução salina. Concluimos que o $MgCl_2$ administrado sistemicamente ou localmente apresentou atividade anti-inflamatória em um modelo de artrite aguda grave, reduzindo o influxo celular, a dor e a liberação de citocinas. $MgCl_2$ opera pelo menos parcialmente via inibição da ativação de NF κ B. Esta é a primeira demonstração in vivo de que o $MgCl_2$ diminui a liberação de citocinas na artrite, levando à redução da inflamação e alívio da dor.

Palavras-chave: Magnésio; Artrite; Zymosan;

ABSTRACT

Arthropathies have a multifactorial etiopathogenesis, involving genetic, environmental, infectious and immunological aspects. Having pain as one of the main complaints of individuals affected by pathology in the synovial joints, being one of the most common reasons for seeking medical care. The use of natural products has been gaining prominence for use in various treatments, whether homemade or industrial. There is a growing interest in the use of these products to modulate immune responses and neutralize inflammatory processes, and one of the products that has been gaining prominence, due to its clinical benefits, is magnesium chloride, widely used in lay medicine for pain relief in musculoskeletal diseases. Mg salts have been shown to provide postoperative analgesia in orthopedic surgery and low levels of Mg have been associated with the development and severity of arthritis. We determined the anti-inflammatory activity of MgCl₂ in an acute arthritis model. After CEUA approval under nº 05/2018, the mice received 0.1 mg/25µL of Zymosan (Zy) or saline solution in the knees. Joint pain was assessed using the von Frey test; cell influx and interleukin (IL)-1 level were evaluated in joint lavage at 6h. The synoviums were excised for histopathology and analysis of nuclear factor kappa B (NFκB) and tumor necrosis factor (TNF)-α immunoexpression. Groups (n=6/group) received 90mg/kg MgCl₂/100 µL or saline per os (systemic) or 500µg/25 µL MgCl₂ or saline intra-articularly (i.a.) 30 min before Zy. Systemically or locally administered MgCl₂ reduced cell influx (p=0.0012 and p=0.0269, respectively), pain (p=0.0005. and p=0.0038, respectively) and intra-articular IL level -1 (p=00391), compared to saline. Systemic MgCl₂ decreased NFκB immunoexpression (p<0.05) compared to saline. We conclude that systemically or locally administered MgCl₂ showed anti-inflammatory activity in a model of severe acute arthritis, reducing cell influx, pain and cytokine release. MgCl₂ operates at least partially via inhibition of NFκB activation. This is the first in vivo demonstration that MgCl₂ decreases cytokine release in arthritis, leading to reduced inflammation and pain relief.

Keywords: Magnesium; Arthritis; Zymosan;

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
CEUA	Comitê de ética em experimentação animal
IL	Interleucina
NFκB	Fator nuclear kappa B
TNF-α	Fator de necrose tumoral
i.a	Intra-articular
Zy	Zymosan
AR	Artrite reumatóide
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
CPPD	Doença de deposição de pirofosfato de cálcio
OA	Osteoartrite
FC	Febre Chikungunya
TGF-β	Fator de transformação do crescimento
IFN-γ	Interferon – γ
IMC	Índice de massa corporal
DMDOA	Drogas modificadoras da doença osteoartrite
VS	Viscossuplementação
AH	Ácido hialurônico
CD44	Receptor celular
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
DMARDs	Drogas antirreumáticas modificadoras da doença
EULAR	Liga europeia contra reumatismo
AZY	Artrite induzida por Zymosan
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
ERN's	Espécies reativas de nitrogênio
MMP	Metaloproteinase
TLRs	Receptor toll-like
CXCL-1	Citocina quimiotática
V.O	Via oral
i.p	Intraperitoneal

EDTA	Ácido etileno tetra-acético
PMN	Polimorfonucleares
mRNA	RNA-mensageiro
HE	Hematoxilina eosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	JUSTIFICATIVA.....	14
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	Artropatias.....	15
3.2	Inflamação.....	17
3.3	tratamentos de osteoartropatias.....	18
3.3.1	Osteoartrite.....	18
3.3.2	Artrite reumatóide.....	20
3.4	Cloreto de Magnésio (mgcl ₂)	21
3.5	Modelo experimental – artrite induzida por zymosan.....	23
4	OBJETIVOS.....	25
4.1	Objetivo geral.....	25
4.2	Objetivos específicos.....	25
5	METODOLOGIA.....	26
5.1	Animais.....	26
5.2	Modelo de artrite experimental.....	26
5.3	Tratamentos farmacológicos.....	27
5.4	Análise da hipernocicepção.....	27
5.5	Análise do influxo celular.....	28
5.6	Análise histopatológica.....	28
5.7	Determinação do nível de il-1 β em exsudatos articulares.....	29
5.8	Imuno-histoquímica.....	29
5.9	Análise estatística.....	30
6	RESULTADOS.....	31
7	DISCUSSÃO.....	36
8	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40
	APÊNCICE A – PARECER DO CEUA.....	47
	ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA ADVANCES IN RHEUMATOLOGY.....	48

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide (AR) é uma patologia inflamatória com predomínio de envolvimento articular, caracterizada por sinovite crônica que pode levar à destruição da cartilagem articular e do osso subcondral, resultando em deformidades e invalidez. Sua prevalência é de cerca de 1% da população, acometendo principalmente mulheres, e sua incidência aumenta com a idade. Os sintomas predominantes são dor, rigidez e inchaço nas articulações periféricas. (LEE & WEINBLATT, 2001).

Estruturalmente, a membrana sinovial, compõe-se normalmente de células residentes como os sinoviócitos, além de fibroblastos e raros mastócitos e dispõe de rica irrigação, com a presença de capilares fenestrados (SWEENEY & FIRESTEIN, 2004). A sinovite reumatóide é caracterizada por intenso infiltrado inflamatório, constituído predominantemente de linfócitos e macrófagos. No entanto, os neutrófilos estão presentes em fases agudas da patologia, participando da liberação de espécies reativas de oxigênio, hidrolases e proteinases, que contribuem para a destruição dos tecidos. As células endoteliais, por sua vez, exibem aumento da expressão de moléculas de adesão, que contribuem para a perpetuação da sinovite, promovendo a migração de células inflamatórias para o ambiente articular. Na avaliação histopatológica, a sinovite reumatóide invade as estruturas justa-sinoviais e o osso subcondral, caracterizando o *pannus* sinovial, onde se dá o início do processo de destruição articular (LEE & WEINBLATT, 2001).

Dados da literatura mostram que fatores genéticos, ambientais, infecciosos e imunológicos podem estar envolvidos no desencadeamento das artropatias (ZANELLI et al., 2000). Foi demonstrado o importante papel de alelos HLA-DRB1 no desencadeamento da artrite e que pacientes que exibem esse fenótipo, teriam maior propensão à AR, que seria mais agressiva (TEZENAS et al., 2005). Embora influências genéticas estejam ligadas à susceptibilidade a doenças ou à sua gravidade há um relativo baixo nível de concordância na incidência dessas doenças em gêmeos sugerindo que outros fatores podem também estar envolvidos na etiopatogenia dessa doença (DUNNE & COOKE, 2005).

Os microrganismos vêm sendo diretamente ligados ao desenvolvimento de artropatias. Um possível mecanismo sugere que antígenos derivados de vírus e

bactérias sejam processados no intestino e liberados na circulação, sendo posteriormente captados nas juntas, onde a ativação de sinoviócitos residentes imunocompetentes, em um indivíduo geneticamente susceptível, ativaria uma resposta inflamatória prolongada (TOIVANEN, 2003).

Entre os principais sintomas dos indivíduos portadores de artropatias, a dor ganha destaque, devido ao grande número de acometidos, as terapias populares vêm ganhando cada vez mais espaço, e a utilização de produtos naturais é cada vez mais comum. Existe um crescente interesse na utilização desses produtos para modular respostas imunes e neutralizar processos inflamatórios, e um dos produtos que vem ganhando destaque, pelos seus benefícios clínicos, é o cloreto de magnésio (NAM, 2006). Um mineral essencial para o funcionamento do corpo, atuando em mais de 300 reações metabólicas, sua deficiência está relacionada a várias doenças, como diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão (SEVERO, 2015).

O magnésio é um micronutriente envolvido na regulação das funções fisiológicas do organismo, sendo o quarto cátion entre os cátions presentes nos líquidos extracelulares, sendo mais frequente nos ossos, dentes e tecidos moles (Li, Yue, & Yang, 2016). Curiosamente, o sulfato de magnésio ($MgSO_4$) há muito é utilizado em anestesia como estratégia para reduzir a necessidade de opioides no pós-operatório, bem como substância para facilitar procedimentos anestésicos, inclusive intubação. O $MgSO_4$ também é uma primeira opção para tratar ou prevenir convulsões associadas à pré-eclâmpsia (Kutlesic et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

O magnésio é um micronutriente envolvido na regulação das funções fisiológicas do organismo, sendo o quarto cátion presente nos líquidos extracelulares, sendo mais frequente nos ossos, dentes e tecidos moles. A reposição deste mineral é defendida por profissionais da saúde e indivíduos portadores de processos inflamatórios, que afirmam a melhora de sintomas como a dor. Apesar da falta de evidências científicas, a suplementação de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) tornou-se evidente na medicina popular, inclusive no tratamento de osteoartrite (OA). As propriedades do magnésio também são muito utilizadas em outras aplicações, como coadjuvante em procedimentos anestésicos, na forma de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) para reduzir a necessidade de opioides no pós-operatório. O $MgSO_4$ também é uma primeira opção para tratar ou prevenir convulsões associadas à pré-eclâmpsia. Ainda, a injeção intra-articular de $MgSO_4$ demonstrou diminuir a dor em pacientes submetidos à artroscopia do joelho (Bondok &, El-Hady, 2006; Kutlesic et al., 2017)

Um estudo recente usando um modelo de OA mostrou que o $MgCl_2$ administrado por via intra-articular previne a progressão do dano articular, o que foi associado à diminuição da expressão dos genes da metaloproteinase da matriz e da interleucina-6 na sinóvia e explantes de cartilagem, sugerindo assim possível anti-inflamatório e poupador de cartilagem efeitos. Segundo dados da coorte da *Osteoarthritis Initiative*, baixos níveis séricos mais de magnésio foram associados a pior dor e função em indivíduos com OA de joelho (Shmagel et al., 2018; Yao et al., 2019).

A alta prevalência de doenças articulares, principalmente doenças crônicas com envolvimento de dores e incapacitação articular (Shahi et al., 2019), aumenta o interesse na compreensão de mecanismos anti-inflamatórios desenvolvidos pela ingestão de magnésio, um micronutriente de uso popular, de baixo custo e fácil acesso. Até agora, não se tem conhecimento de estudos investigando a eficácia anti-inflamatória da administração sistêmica, oral, de $MgCl_2$ em modelos de artrite. Dessa forma, é importante a determinação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do $MgCl_2$, sendo este administrado de forma local e sistêmica em um modelo de artrite aguda e o possível mecanismo de ação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Artropatias

Articulações são regiões de ligações entre os ossos, sendo classificadas como diartroses e sinartroses. Artropatia é qualquer patologia que acomete tais articulações, estas são frequentes e constituem uma das principais causas de incapacidade física, seja ela temporária ou permanente. (BOGLIOLO, 2011)

Segundo a American Rheumatism Association, existem mais de 100 entidades responsáveis por causar dor articular e de difícil diagnóstico, grande número dessas doenças pertencem a um dos seguintes grupos: doenças provocadas por microrganismos; doenças cuja causa está ligada a componentes do sistema imunitário; doenças degenerativas; afecções traumáticas; e doenças metabólicas.

Caracterizada por uma afecção crônica degenerativa, a osteoartrite (OA) é multifatorial e de lenta progressão, muito comum ao envelhecimento, como também ao desgaste mecânico da articulação. Assim como suas alterações patológicas, a inflamação ligada ao aumento dos níveis de citocinas pode gerar uma sensibilização periférica, caracterizando uma hiperalgesia primária que se manifesta com dor espontânea e ao movimento. Ou ainda, hiperalgesia secundária, caracterizando-se pelo aumento da sensibilidade a estímulos mecânicos fora da área lesionada. A OA representa cerca de 30 a 40% das consultas ambulatoriais de reumatologia, responsável por 7,5% dos afastamentos de trabalho, sendo a segunda entre as patologias que justificam o auxílio inicial, e a quarta a determinar aposentadoria por 6,2%. Tendo preferência pelo sexo feminino, sua incidência aumenta com o passar dos anos. (SBR, 2022).

A artrite reumatoide (AR) é uma condição inflamatória crônica sistêmica, de origem multifatorial, com envolvimento de fatores imunológicos, ambientais e genéticos. AR pode acometer o tecido conjuntivo de vários órgãos, mas principalmente a membrana sinovial das diartroses, provocando uma sinovite crônica, podendo resultar na destruição das articulações e anquilose. A dor é uma das principais queixas relatadas por indivíduos acometidos pela AR que procuram atendimento médico (KIPEL, 2004).

A gravidade da AR pode variar desde quadros limitados até crônicos, progressivos e irreversíveis. O seu curso clínico pode se estender de algumas semanas a meses de desconforto, até mesmo por anos de incapacitação, o que pode acarretar prejuízos pessoais e socioeconômicos, sendo causa importante de invalidez temporária e/ou definitiva (SWEENEY & FIRESTEIN, 2004; RASHID & EBRIENGER, 2007; SOKKA, 2010).

As alterações encontradas na artrite incluem a degradação da cartilagem articular, hiperplasia sinovial, infiltração de sinoviócitos e erosão do osso subcondral, essas são as características patológicas encontradas responsáveis pelas deformidades e invalidez dos pacientes (ROCKEL & KAPOOR, 2016). Estudos epidemiológicos estimam a prevalência de AR em 1% da população adulta, afetando três vezes mais mulheres do que homens e com maior incidência entre os 35-65 anos de idade (JÚNIOR, 2007).

Diante da dificuldade de um diagnóstico preciso, a American Rheumatism Association estabeleceu em 1987 que alguns dos critérios a seguir devem permanecer por no mínimo 6 semanas: rigidez matinal; artrite em três ou mais articulações; artrite nas articulações das mãos; artrite simétrica; alterações radiológicas; fator reumatóide no soro; nódulos reumatoides.

Entre os principais sintomas e queixas de pacientes com febre Chikungunya (FC), por exemplo, estar dores articulares que perduram por longos períodos, caracterizadas como artropatias, as quais podem estar presente em 87,2%, após a infecção pelo CHIKV (MARQUES et al., 2017)..A FC tem se tornado um grande problema de saúde pública nos países onde ocorrem as epidemias, como é o caso do Brasil, com registro de 271.824 casos prováveis, representando uma taxa de incidência de 113,0 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2017).

Em modelos experimentais de artrite induzida por alfavírus, constatou-se que as alterações histopatológicas sinoviais observadas após a infecção pelo CHIKV, são semelhantes às encontradas em pacientes com AR, caracterizando um processo inflamatório infeccioso (MARQUES et al., 2017).

A dor é uma das principais queixas dos indivíduos acometidos por patologia nas articulações sinoviais, sendo uma das razões mais comuns de procura por atendimento médico, é o principal sintoma de uma série de patologias, sendo frequentemente incapacitante e reduzindo a qualidade de vida de milhões de pessoas no mundo (KIPEL, 2004).

3.2 Inflamação

A inflamação é uma reação tecidual a um agente agressor, caracterizada morfológicamente pelo extravasamento de líquidos e células sanguíneas para o interstício. A resposta inflamatória é um dos componentes mais importantes da resposta imune inata e adaptativa e, embora sua habilidade para ficar livre de inúmeras agressões, em muitos casos pode causar danos ao corpo (BOGLIOLO, 2011).

O organismo está suscetível a diferentes agressões sejam elas físicas, químicas ou biológicas, que constituem os agentes inflamatórios, com o envolvimento de moléculas sinalizadoras e liberação de mediadores inflamatórios; estes resultam em modificações necessárias para saída de plasma e leucócitos dos vasos e em estímulos para reparar os danos resultantes das agressões (BOGLIOLO, 2011).

A reação inflamatória é um processo regulado: enquanto algumas moléculas de alarme induzem mediadores pró-inflamatórios, outras estimulam mediadores anti-inflamatórios, responsáveis por limitar e terminar o processo (ROBBINS & COTRAN, 2010). O desequilíbrio e superprodução desses mediadores estão envolvidos no desenvolvimento de várias patologias inflamatórias e autoimunes, como a artrite reumatoide (RAO, 2007).

A inflamação desencadeia uma série de fenômenos, dentre eles o aumento do influxo celular. Os neutrófilos fornecem uma resposta imediata diante de um processo inflamatório ou infeccioso. Em uma inflamação aguda eles migram para o local rapidamente, sendo as células de defesa em maior quantidade e permanecendo no local por algumas horas, fagocitando patógenos e/ou células danificadas. Outra célula importante para a imunidade inata é o monócito, que dá origem ao macrófago, que processa e exibe antígenos induzindo a resposta mediada por linfócitos T, e podem permanecer por meses ou anos nos tecidos (SCHMIDT et al., 2011).

Pesquisas mostram que uma cascata de citocinas é liberada, e que esses mediadores são classificados de acordo com a sua funcionalidade na contribuição para a inflamação em citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-18 e IFN- γ ou anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13, e ainda fator de transformação do crescimento (TGF- β) (CUNHA et al., 2005; VERRI JR. et al., 2006).

Várias células, dentre elas, macrófagos e linfócitos, são capazes de sintetizar IL-1 β , que está envolvida no recrutamento dos leucócitos, no aumento da permeabilidade dos vasos, no aumento da temperatura corporal, e na liberação de prostaglandinas, que são processos característicos da inflamação (VERRI JR. Et al., 2006). A TNF- α é uma potente citocina, tem a capacidade de induzir a inflamação atuando como estimulador de outras citocinas, tais como, IL-8, IL-6 e IL-1 (CHOY, 2001).

Outra citocina pró-inflamatória que desempenha um importante papel regulador na inflamação é a IL-17, sintetizada pelas células Th17. A IL-17 está envolvida na patogênese da artrite reumatóide e de outras patologias inflamatórias, por estimular fatores de crescimento ligados a inflamação, IL-6, IL-8, e aumentar a expressão de proteínas do sistema complemento (KARMAKAR, 2010)

Uma das principais citocinas responsável por inibir a inflamação é a IL-10, sintetizada por macrófagos, monócitos, células B e T. É capaz de inibir a síntese de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , e diminuir a expressão de IL-17 e IL-22. A IL-10 ainda aumenta a expressão de seus antagonistas naturais (CHOY, 2001; GU et al., 2008).

A dor é um clássico sinal de inflamação, e células residentes, após reconhecerem os estímulos inflamatórios, desencadeiam uma cascata de citocinas, responsáveis pelo desenvolvimento da dor na inflamação. As primeiras envolvidas nesse processo foram a IL-1 β , TNF- α , quimiocinas IL-8 e quimiocinas de queratinócitos (VERRI JR. et al., 2006).

3.3 Tratamentos de osteoartropatias

3.3.1 Osteoartrite

Por se tratar de uma patologia crônica multifatorial, que pode evoluir para uma incapacidade progressiva, o tratamento deve ser multidisciplinar para uma melhora mecânica, funcional e clínica. Ao longo das décadas, muitas diretrizes, tanto nacionais quanto internacionais foram criadas com o intuito de colaborar com os profissionais da saúde e pacientes, quanto a melhor escolha terapêutica, em 2003, a

Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR), elaborou um consenso para o tratamento da OA (COIMBRA et al., 2004).

. A melhor escolha terapêutica propõe uma combinação de estratégias medicamentosas e não medicamentosas. Os pacientes devem ter acesso à informação e educação acerca dos objetivos terapêuticos. A necessidade de mudanças no estilo de vida, prática de exercícios, adaptação das atividades e diminuição de peso, são algumas medidas que devem ser adotadas para diminuir os danos sobre as articulações (ZHANG et al., 2010). Um recente estudo sistemático observou risco positivo do IMC para OA, a perda do excesso de peso reduz a dor e melhora a função física dos portadores de OA (BLAGOJEVIC et al., 2010).

A utilização de fármacos complementa as ações não farmacológicas. Temos disponíveis os anti-inflamatórios, questionáveis por seus efeitos adversos, os analgésicos, essenciais para o controle da dor, no entanto ambos não interferem no curso da patologia, e finalmente as drogas modificadoras da doença osteoartrite (DMDOA), que são capazes de estabilizar, retardar e/ou reverter o progresso da doença (REZENDE et al., 2009).

Os medicamentos para tratar a OA, podem ser administrados por via intra-articular, tópica ou sistêmica. A condroitina, glicosamina, diacereína, cloroquina, a combinação de condroitina com glicosamina, e extratos insaponificáveis de soja e abacate destacam-se entre as DMDOA de uso sistêmico (FIDELIX, 2006; TOWHEED et al., 2005; HOCHBERG et al., 2008; CLEGG et al., 2006).

A viscosuplementação (VS) é utilizada para recuperação reológica do líquido sinovial, melhora da função, analgesia e até mesmo para tentativa de regeneração da cartilagem articular. Como DMDOA intra-articular utilizada na VS podemos citar o ácido hialurônico (AH), com importante ação moduladora, através da interação com receptores CD44 nos sinoviócitos tipo B. o AH também age a nível bioquímico, reduzindo a expressão de citocinas e enzimas ligadas a AO (REZENDE et al., 2012; WANG et al., 2006). Para potencializar os benefícios da VS faz-se uso de 1ml do corticoide triancinolona, resultando em uma melhora precoce e mais intensa da dor e da função, sem prejudicar os resultados a longo prazo. Caso haja falha nos tratamentos, a cirurgia de substituição articular deve ser cogitada (CAMPOS et al., 2013).

3.3.2 Artrite reumatóide

Reverter a inflamação é um dos principais objetivos terapêutico, visto que a redução do processo inflamatório diminui os danos articulares ou a progressão da patologia. uma vez que ela está diretamente associada ao dano articular, comorbidades e incapacitação encontrados na artrite reumatóide. (SMOLEN & ALETAHA, 2015; SMOLEN, 2016).

Geralmente o tratamento para artrite reumatóide utiliza anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs - disease modifying antirheumatic drugs) sintéticas ou biológicas e glicocorticoides (MAJITHIA & GERACI, 2007). Os AINEs e os glicocorticoides são utilizados com o objetivo de aliviar os sinais e sintomas da AR, pois demonstram grande efeito anti-inflamatório, inibindo a fosfolipase A2, e conseqüentemente reduzindo a liberação de eicosanoides, assim como a inibição da ativação de NF- κ B, impedindo a síntese e liberação de citocinas, como IL-6, IL-1 β e TNF- α (MAJITHIA & GERACI, 2007). No entanto, o uso a longo prazo, está associado a problemas sérios a nível cardíaco e gastrointestinais, entretanto podem ser indicados em doses pequenas ou intermediárias, associados com DMARDs (SCOTT, 2010; SMOLEN, 2016).

Os DMARDs são utilizados para o controle da patologia e diminuição do dano articular, e estão divididos em duas classes, biológicas e sintéticas. Segundo as recomendações do EULAR, o tratamento da artrite reumatóide deve-se iniciar com um DMARD sintético convencional, como por exemplo o metotrexato, e pequenas doses de glicocorticoides. Entretanto, os glicocorticoides orais devem ser reduzidos gradativamente até que sejam interrompidos dentro de seis meses, dando prosseguimento com a monoterapia (SMOLEN, 2016).

A utilização precoce de DMARDs se deve ao fato que os danos articulares ocorrem precocemente na AR, antes que sejam detectados clinicamente. Pacientes que utilizaram precocemente DMARDs, apresentaram diminuição na progressão do dano radiológico (SCOTT, 2010). Na falta de respostas, objetivando resultados no controle da AR, recomenda-se o uso em conjunto de metotrexato à DMARDs biológicos (FURST et al., 2010).

Atualmente a terapia biológica para artrite reumatoide abrange quatro mecanismos de ação, são eles: inibidores de IL-6 (Tocilizumab), inibidores de TNF

(Certolizumab, Adalimumab, Etanercept, Infliximab), inibidor de células B (Rituximab) e inibidores de células T (Abatacept). Apesar de terem alvos terapêuticos diferentes, os quatro modificadores biológicos principais mostram maior eficiência quando associados com DMARD sintético, o metotrexato principalmente (SMOLEN, 2016; BURMESTER et al, 2007).

As chances de efeitos colaterais, oriundos dos fármacos imunobiológicos, ganharam grande significância, devido ao fato das moléculas inibidas pelos medicamentos participarem de vários processos fisiológicos no organismo. Particularmente, o aumento de infecções graves em pacientes utilizando DMARDs biológicos, como infecções de pele, partes moles, trato urinário e trato respiratório (MOTA et al, 2015).

3.4 Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$)

Existe uma ingestão ineficiente de vários nutrientes importantes para o bom funcionamento do organismo, principalmente em países ocidentais, onde a cultura do consumo de alimentos processados ainda é crescente. Em particular podemos destacar o magnésio (Mg), um mineral pouco consumido na dieta pela população e essencial para o corpo, pois atua em mais de 300 reações metabólicas, das quais podemos citar: regulação da função hormonal e imunológica, homeostase insulínica e glicêmica, estabilidade da membrana cardiovascular e neuromuscular (SEVERO, 2015)

O magnésio pode ser encontrado facilmente em uma gama de alimentos, principalmente nos cereais integrais, espinafre, frutas, nozes, vegetais folhosos verdes, tubérculos e legumes. É recomendado uma ingestão diária de 310 a 320mg para mulheres e de 410 a 420mg para homens. Uma dieta com alimentos ricos em lactose, carboidratos, fosfatos, oxalatos e fitatos, podem inibir o processo de absorção do magnésio. Assim, como o alto teor de cálcio, sódio, álcool e cafeína aumentam a excreção renal de Mg (NAITHANI et al., 2014).

Têm-se em média de 21g a 28g de magnésio em um adulto saudável, distribuídos e armazenados da seguinte forma: cerca de 65% encontram-se nos ossos, 34% nos músculos e 1% no plasma e fluido intersticial. O valor basal plasmático

é mantido entre 1,7mg/dL e 2,4mg/dL, desses, 60% encontram-se biologicamente ativo e o restante circulando ligados as proteínas como a albumina ou complexados a ânions como o fosfato (KOLTE et al., 2014).

A deficiência dos níveis de magnésio no organismo pode acontecer pela baixa ingestão na dieta, má absorção ou pela excreção aumentada. Aumentando o risco de desenvolver vários problemas de saúde, como, diabetes mellitus tipo 2, resistência insulínica, desordens neuromusculares, desordens no metabolismo ósseo, problemas cardiovasculares, eclâmpsia e aterogênese (HATA et al., 2013).

Sendo o Mg um mediador do metabolismo muscular e ósseo, da inflamação e da sinalização da dor, uma menor ingestão está associada a piora da dor e função em pacientes com OA de joelho radiográfica basal (SHMAGEL et al., 2018). Um estudo *in vitro*, utilizando explantes de cartilagem humana e sinóvia retiradas de cirurgias de substituição total de joelhos, e incubados com cloreto de magnésio, mostraram que marcadores osteoartríticos foram inibidos pelo $MgCl_2$ (H. YAO et al., 2019)

Segundo Roman et al., (2013), o $MgCl_2$ administrado durante a gestação diminui as chances do retardo de crescimento intrauterino e redução significativa de interleucinas, fator de necrose tumoral e proteína quimiotática de monócitos, apresentando efeito anti-inflamatório.

O magnésio vem sendo utilizado em anestesia obstétrica e cuidados intensivos, atenuando a resposta ao estresse à intubação endotraqueal e diminuindo as necessidades de anestésicos intraoperatórios, prolongando a anestesia e reduzindo o consumo total de analgésicos pós-operatórios sem riscos materno ou neonatal (KUTLESIC et al., 2016)

Estudos mostram a melhora do efeito antinociceptivo com a administração combinada do $MgCl_2$, com analgésicos não opióides, como a dipirona, em camundongos submetidos à um modelo de câncer de pulmão, reduzindo também a tolerância antinociceptiva, observada após o uso de doses repetidas de diferentes analgésicos (BRITO, 2017). Dessa forma, nos permite sugerir um possível adicional ao tratamento medicamentoso com $MgCl_2$, em pacientes com doenças articulares crônicas, as quais induz o uso excessivo de analgésicos.

3.5 Modelo experimental – artrite induzida por zymosan

Os modelos experimentais em camundongos, exprimem uma certa similaridade com os aspectos da patogênese da AR em seres humanos, para ser considerado ideal, um modelo de artrite deve seguir alguns requisitos, tais como, achados histopatológicos, radiológicos e clínicos similares aos vistos na artrite reumatóide. Ainda não foi descrito um modelo que englobe todos os requisitos, apesar que se aproximam consideravelmente (SILVA JR. & ROCHA, 2006; BOLON et al., 2011).

Podemos citar como modelo experimental de artrite reumatoide, a artrite induzida por zymosan (AZy), com uma rápida inflamação, e de baixo custo. Relatado pela primeira vez, em 1977, por Keystone et al. Através da administração intra-articular de partículas de zymosan, um polissacarídeo derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, promove-se uma intensa reação inflamatória com aumento do influxo celular, edema e distúrbios na marcha (GADÓ, 1991; ROCHA, 1999).

O uso do zymosan induz a liberação de enzimas lisossomais presentes nos macrófagos e ativa o sistema complemento, pela via alternativa, possibilitando uma reação inflamatória aguda, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e infiltração de neutrófilos. No modelo de artrite induzida pelo Zymosan, a migração de neutrófilos tem um pico de seis horas que persiste por até três dias. Estas células liberam mediadores inflamatórios, tais como, eicosanoides, citocinas, MMP e espécies reativas de oxigênio (ERO's) e nitrogênio (ERN's) (SCHORLEMMER, 1977; HAMPTON, 1998).

A hipernocicepção observada na AZy, origina-se da sensibilização aguda de nociceptores presentes no tecido periarticular (ROCHA, 1999, da SILVA, 2006). Os neutrófilos, liberaram prostaglandinas, que são compostos hiperalgésicos, bem como outros mediadores envolvidos na dor inflamatória, como o leucotrieno B4 (BEZERRA et al, 2007).

A resposta inflamatória que o Zymosan desencadeia, está ligada a um conjunto de receptores, entre eles, o dectin-1, um receptor de membrana expresso pelos macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (BROWN et al., 2003). Uma das vias de sinalização pró-inflamatória para AZy são os TLRs, essencial para que ocorra

uma resposta imune. A ativação desses receptores ocasiona a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , CXCL-1, leucotrienos e prostaglandinas (FRASNELLI et al., 2005; CORREA et al, 2016). A degradação dos componentes da matriz cartilaginosa, é promovida pelos osteoclastos, condrócitos e fibroblastos que liberam MMP, ocasionando a lesão da cartilagem encontrada na AZy (STOOP et al., 1999).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-inflamatória e imunomoduladora do Cloreto de Magnésio em um modelo de artrite experimental.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do cloreto de magnésio migração, em camundongos submetidos AZy.

Avaliar o efeito do cloreto de magnésio sobre a hipernocicepção em camundongos submetidos AZy.

Avaliar o efeito do cloreto de magnésio sobre a liberação de interleucina-1 na cavidade articular, em camundongos submetidos ao modelo AZy.

Analisar o efeito do cloreto de magnésio sobre a imunoexpressão de TNF- α , NFkB em camundongos submetidos ao modelo AZy.

Avaliar o efeito do cloreto de magnésio sobre a sinovite desenvolvida pelo modelo de AZy.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando 20-25g (n=6/grupo), obtidos do Biotério do Centro Universitário Católica de Quixadá (Unicatólica), Ceará, Brasil. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento, com um total de 48 animais alojados em salas com temperatura controlada, ciclos claro/escuro de 12 horas e livre acesso a água e comida. O monitoramento e a manutenção cuidadosos foram conduzidos de acordo com as recomendações éticas do Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária (CMV), Diretrizes para o Uso de Animais em Pesquisa da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) e o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Publicação dos Institutos Nacionais de Saúde). Além disso, os protocolos empregados foram aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação animal local (Reg. Nº 05/2018).

5.2 Modelo de artrite experimental

Camundongos receberam injeção intra-articular (i.a.) de 0,1 mg/25 µL de Zymosan (Zy; Sigma, St. Louis, MO) ou solução salina (controle) nas articulações do joelho direito sob anestesia com xilazina (10 mg/kg) / cetamina (80 mg/kg) anestesia intraperitoneal (i.p.) (ROCHA et al, 2008).

5.3 Tratamentos farmacológicos

Grupos (n=6/grupo) receberam 90mg/kg de MgCl₂ ou solução salina (100 µL de volume total) por via oral (v.o.; gavagem; intervenção sistêmica) ou 500µg de solução de MgCl₂ ou solução salina (25 µL de volume total) i.a. (intervenção local) 30 min antes da injeção de Zy. A dosagem intra-articular de MgCl₂ foi baseada em um estudo anterior mostrando que 500µg de MgSO₄ administrado intra-articularmente a ratos submetidos a osteoartrite experimental reduziu tanto a dor quanto o dano articular (Lee et al., 2009). A dosagem oral de Mg foi baseada em um estudo anterior mostrando que ratos que receberam 50-200mg de Mg por litro na água potável (bebendo cerca de 10mL/d) tiveram menos inflamação quando submetidos à artrite experimental (Nagai et al., 2007). Nesse caso, cada rato receberia 0,5 -2 mg de Mg diariamente. No presente estudo, camundongos Swiss receberam 90 mg/kg de MgCl₂ v.o., o que significa que cada camundongo recebeu uma dose única diária de 4 mg de MgCl₂, o que seria equivalente a cerca de 1 mg de Mg por dia.

5.4 Análise da hipernocicepção

Camundongos Swiss foram colocados em caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura), sobre uma tela de arame, por 30 minutos, para adaptação ambiental. A estimulação foi realizada quando os animais se apresentavam adaptados, sem movimentos exploratórios ou defecação e não estando descansando sobre as patas. A quantificação foi feita por um transdutor manual em cuja sonda foi adaptada uma ponta de polipropileno (Electronic von Frey anesthesiometer, Insight Equipamentos Científicos Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil). Uma força perpendicular e crescente foi aplicada na área central da superfície da pata para provocar a flexão da articulação do joelho, que recebeu o estímulo inflamatório, seguida da retirada da pata. Um espelho abaixo da grade permitiu a visão clara da pata. O aparato eletrônico registra automaticamente a intensidade da força aplicada quando o animal retira a pata. O

teste foi feito até a obtenção de três medidas consistentes (quando a diferença entre elas foi menor do que 1 g). O resultado foi expresso como limiar mecânico em gramas (g), e a análise da hipernocicepção realizada na fase aguda (3 e 5 horas) (PINTO et al., 2010).

5.5 Análise do influxo celular

Após 6 horas (fase aguda) da indução da artrite por zymosan, os animais foram anestesiados terminalmente e os exsudatos das articulações do joelho foram coletados por meio de duas lavagens seguidas de aspiração contendo 0,05 mL de salina estéril apirogênica com EDTA 10 mM. A contagem celular total e diferencial no lavado articular foi realizada na câmara de Neubauer, e kit de coloração Panoptic Instant Prov™ (Novo ProvBrasil™).

5.6 Análise histopatológica

Após o sacrifício, a membrana sinovial foi retirada cirurgicamente e processada para inclusão em parafina e coloração por hematoxilina - eosina (HE). Foram avaliadas por microscopia óptica, seguindo uma classificação semi-quantitativa realizada por um patologista cego para o tratamento efetuado nos grupos, baseando-se em um grau de escores para cada grupo de acordo com a presença de edema, proliferação sinovial, infiltração de células, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e estágio da doença, variando de 0 a 3 (0 ausente, 1 suave, 2 moderado e 3 grave) para cada parâmetro. A pontuação máxima total será de 18. Os resultados foram expressos como mediana (variação) para cada grupo de seis animais (ROCHA, 2008).

5.7 Determinação do nível de il-1 β em exsudatos articulares

Exsudatos articulares foram usados para determinar os níveis de IL-1 β seguindo as instruções do fabricante de um kit IL-1 β ELISA disponível comercialmente (R&D Systems, São Paulo, SP, Brasil). Resumidamente, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos policlonais anti-IL-1 β e incubadas overnight a 4 °C. Após bloqueio das placas (albumina 1% por 1h), os padrões da citocina e as amostras foram adicionados em duplicata por 2h (25 °C). Um anticorpo secundário biotilado foi adicionado, seguindo por uma incubação por 1 h (25 °C). Por último, 100ml de avidina-peroxidase (diluída a 1:5000; DAKO A/S, Dinamarca) foi adicionada a cada poço. Após 30 min, as placas foram lavadas e o reagente O-fenilenodiamina (OPD - 40 mg / poço) e H₂O₂ foram adicionados. A reação foi interrompida com H₂SO₄ (1M) e a leitura da densidade óptica (D.O.) foi realizada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL (SILVA JR., 2006).

5.8 Imuno-histoquímica

As membranas sinoviais foram utilizadas para avaliar a imunoexpressão do fator nuclear kappa B (NF κ B) e do fator de necrose tumoral (TNF)- α , utilizando kits disponíveis comercialmente (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Resumidamente, após a desparafinização, as seções de tecido foram incubadas com peróxido de hidrogênio e lavadas. Após incubação em tampão citrato, os espécimes foram submetidos a leve aquecimento em forno de micro-ondas. Após bloqueio inespecífico durante a noite com soro de coelho, as amostras foram incubadas com anticorpo de coelho anti-NF κ B ou anti-TNF α (diluído 1:200 em PBS mais 1% de BSA, 2 h). Após o enxágue, os cortes foram incubados com um anticorpo IgG anti-coelho biotilado secundário. O produto da reação foi detectado usando o complexo Envision™ System-HRP (AEC) (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) e a cor da reação foi desenvolvida com tetracloridrato de diaminobenzidina (DAKO, Carpinteria, CA, EUA). As lâminas foram contrastadas com hematoxilina de Mayer. A intensidade da coloração foi analisada em microscopia de luz usando o software Image J™ (Girão-Carmona et al., 2022).

5.9 Análise estatística

Os dados foram analisados usando GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados são relatados como média \pm desvio padrão (DP) ou mediana (intervalo), conforme apropriado. Para comparações múltiplas entre as médias, foi utilizado o teste “t” de Student, a análise de variância univariada (ANOVA) de uma via. Na presença de significância, foi aplicado o teste de Tukey, considerando significativo $p < 0,05$. Para a análise dos dados não-paramétricos, como histopatológico e escala de dor, os resultados foram expressos em mediana e comparados usando o teste de Mann-whitney, considerando significativo $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

MgCl₂ REDUZ O INFLUXO CELULAR, A HIPERNOCICEPÇÃO E A LIBERAÇÃO DE IL-1 NA ARTRITE AGUDA POR ZYMOSAN.

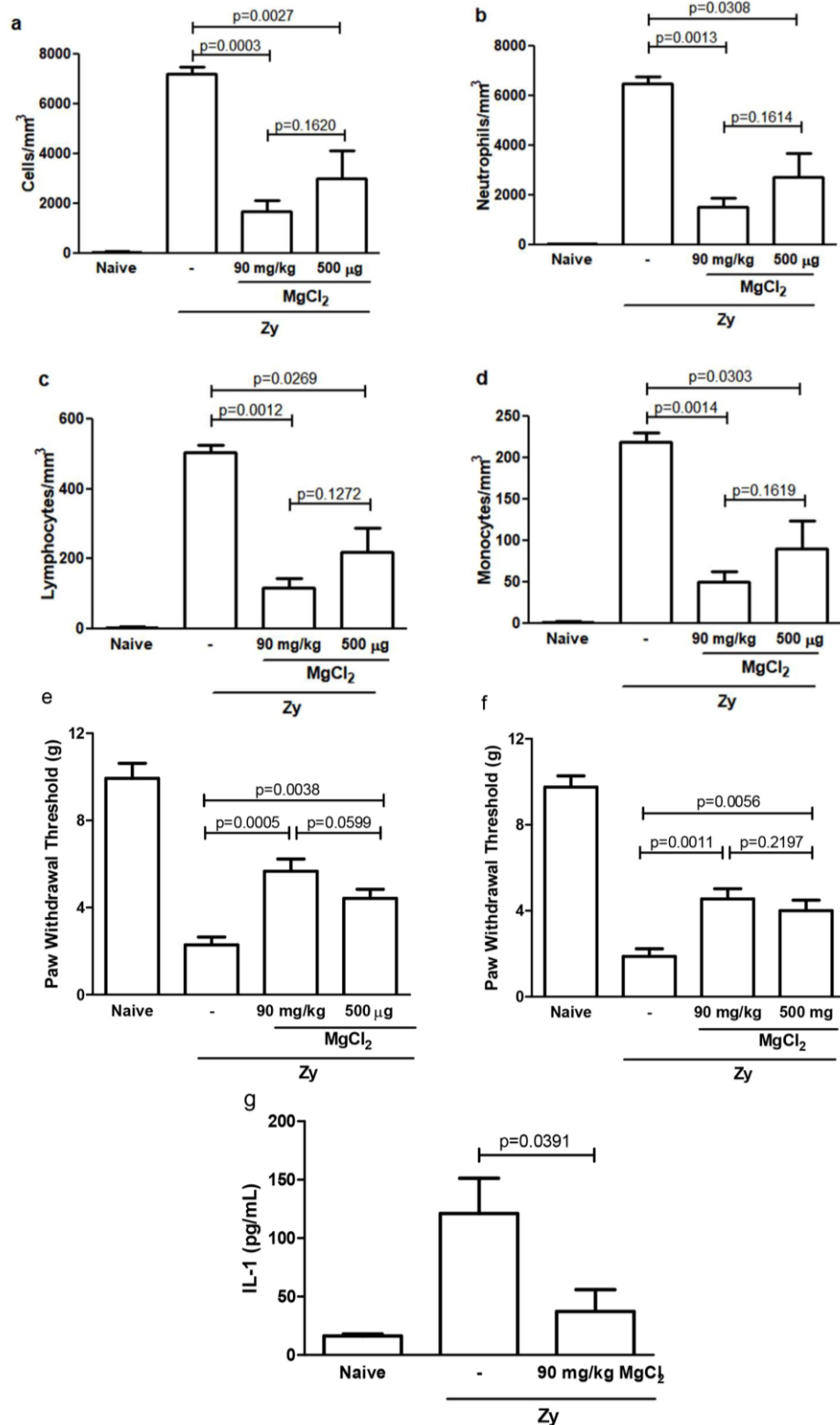
Como mostrado na Figura 1a, a injeção de Zy induziu uma migração proeminente de leucócitos, com predominância de células polimorfonucleares (PMN) (>85%), na articulação do joelho após 6 horas; o pré-tratamento via administração sistêmica ($p = 0,0003$) ou local (intra-articular) ($p=0,0027$) de MgCl₂ promoveu uma redução notável e significativa do influxo celular, como mostra a figura 1a. A redução na contagem de células foi principalmente de PMN ($p= 0,0013$ v.o. e $p=0.0308$ i.a.), embora o número de linfócitos ($p= 0,0012$ v.o. e $p=0.0269$ i.a.) e monócitos ($p= 0,0014$ v.o. e $p=0.0303$ i.a.), também foram reduzidos (figuras 1b-d).

Curiosamente, embora não atingindo significância estatística, a redução das contagens de células apareceu mais pronunciada após a administração sistêmica (oral) de MgCl₂ em comparação com a administração local por injeção intra-articular (figuras 1a-d). O que nos permite sugerir que o magnésio não é degradado pelas enzimas gástricas, alcançando seu local de ação em quantidades ideais para promover o efeito anti-inflamatório.

Em relação à dor, a resposta hipernociceptiva provocada pela injeção de Zy nas articulações do camundongo foi significativamente reduzida pela administração sistêmica e local de soluções de MgCl₂, ocorrendo já 3 horas com $p=0,005$ em v.o. e $p=0,0038$ em i.a. (figura 1e) após a injeção de Zy, e essa redução da hipernocicepção foi mantida até 5h com $p=0,011$ em v.o. e $p=0,0056$ em i.a. (figura 1f). A resposta antinociceptiva foi mais pronunciada em camundongos que receberam MgCl₂ sistêmico em comparação com a administração local ($p=0,0059$ em 3h e $p=0,2197$ em 5h), no entanto não houve diferença estatística.

Dada a redução aumentada do influxo celular e da hipernocicepção após a administração sistêmica de MgCl₂, outros estudos foram feitos usando essa dosagem. A redução da liberação da citocina inflamatória IL-1 β no exsudato articular foi observada, por ELISA, nos animais que receberam MgCl₂ sistemicamente ($p=0,0391$), em comparação aos animais tratados com veículo (solução salina) (figura 1g).

Figura 1. Efeito do MgCl₂ no influxo celular, hipernociceção e IL-1 na AZy em camundongos.



Camundongos receberam 500µg de MgCl₂ i.art., 90 mg/kg de MgCl₂ via oral (v.o.) ou solução salina (-) 30 min antes da injeção de Zy (0,1 mg/ 25 µL) intra-articular (i.art.) o influxo celular (a-d) do exsudato articular foi avaliado 6h após a injeção de Zy i.art. A hipernociceção foi 3h (e) e 5h (f) após desfoio com Zy. Níveis de interleucina (IL)-1 foi avaliado 6h após a injeção de Zy. Os dados foram expressos em média ± EPM (n=6/grupo). P<0.05 foram considerados resultados estatisticamente significantes. Para comparação foi usado ANOVA de uma via seguido pelo teste de Tukey.

Como esperado, a injeção de Zy induziu um aumento significativo do influxo celular na camada sinovial, além no espaço articular, bem como uma hiperplasia sinovial. Na análise semiquantitativa, baseada em escores, da histopatologia, mostrou que a solução de MgCl₂ quando administrado v.o. reverteu parcialmente a sinovite aguda em camundongos submetidos a AZy, reduzindo significativamente os parâmetros inflamatórios como proliferação sinovial (p=0,0488), fibrose (p=0,0417) e escores totais (p=0,0319), quando comparado com o grupo tratado com o veículo. A administração local não foi capaz de alterar os parâmetros histológicos na fase aguda (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação histopatológica do efeito do MgCl₂ na sinovite aguda, em camundongos com Azy

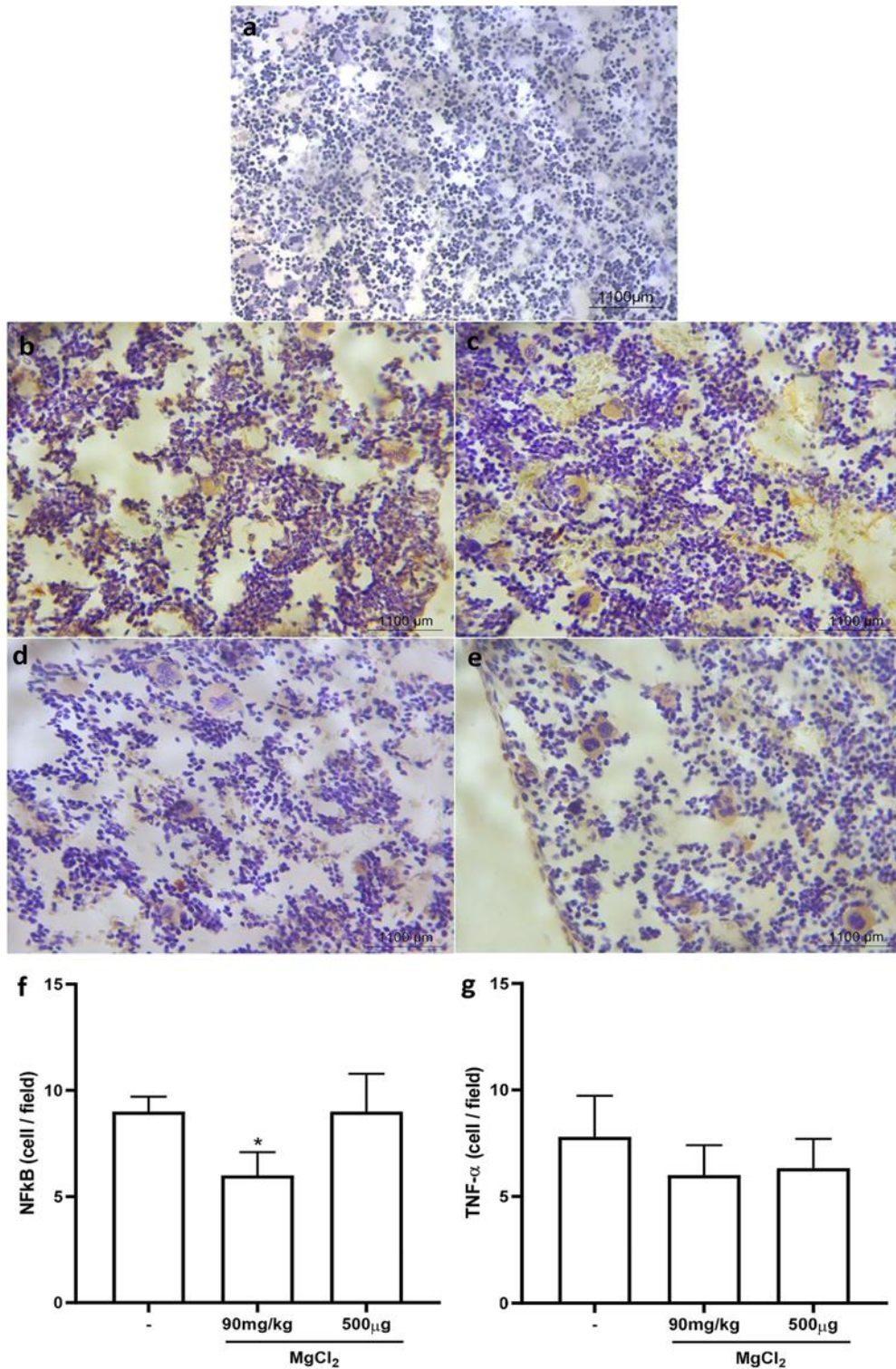
	Infiltrado	Estágio da doença	Proliferação da camada sinovial	Fibrose	Escore totais
Naive	0 (0,0-0,0)	0 (0,0-1,0)	0 (0,0-1,0)	0 (0,0-0,0)	0 (0,0-0,0)
-	2,0* (1,0-3,0)	2,0* (1,0-3,0)	1,0* (0,0-3,0)	1,0* (0,0-2,0)	6,0* (0,0-3,0)
MgCl₂ (v.o.)	1,5 (1,0-3,0)	1,5 (1,0-3,0)	0,5# (0,0-1,0)	0,5# (0-1,0)	4,0# (0,0-3,0)
MgCl₂ (i.a.)	2,0 (1,0-3,0)	1,5 (1,0-3,0)	0,5 (0,0-2,0)	1,0 (0,0-1,0)	5,0 (0,0-5,0)

Camundongos (n = 6/grupo) receberam (90 mg/kg v.o. ou 500 µg i.a) de MgCl₂ ou solução salina (-) 30 min antes de 0,1 mg/25 µL de zymosan i.a. Camundongos naive receberam solução salina i.art. Todos os animais foram sacrificados sob anestesia após 6 horas. Os resultados representam medianas dos escores histopatológicos sinoviais. * p< 0,05 em comparação com camundongos naive e # p< 0,05 em comparação com camundongos controle (-)

A Figura 2 ilustra fotomicrografias da imunocoloração para análise da expressão de NFκB e TNF-α na sinóvia de camundongos submetidos à AZy e tratados com solução de MgCl₂ v.o. Foi observado uma imunomarcagem intensa tanto para NFκB (2b) quanto para TNF-α (2c) em camundongos que receberam Zy e solução salina como tratamento (grupo controle), em comparação com camundongos naive (2a). O pré-tratamento sistêmico com MgCl₂ reduziu a imunocoloração para NFκB (2d), quando comparado com o grupo controle. A imunexpressão de TNFα também foi reduzida, no entanto, a redução foi leve (3e).

A análise quantitativa das imagens (figura 1g) mostrou que a administração sistêmica do $MgCl_2$ reduziu o número de células expressando NF κ B ($p=0,0053$) na membrana sinovial de camundongos com AZy (figura 1f), quando comparados com o grupo controle, tratado com o veículo. Embora tenha ocorrido uma redução na expressão de TNF- α na membrana sinovial, não houve diferença estatística entre os grupos ($p= 0,1742$). Enquanto a administração local não reduziu significativamente tanto NF κ B ($p>0,9999$) como TNF- α ($p=0,2983$).

Figura 2. Efeito do $MgCl_2$ na imunopressão de NF κ B e TNF- α na AZy em camundongos.



Camundongos receberam 500 μ g de $MgCl_2$ i.art., 90 mg/kg de $MgCl_2$ via oral (v.o.) ou solu \c o $\~$ o salina (-) 30 min antes da inje \c o $\~$ o de Zy (0,1 mg/ 25 μ L) intra-articular (i.art.). membranas sinoviais foram avaliadas por imunohistoqu $\~$ imica (ver texto para detalhes). Ilustra \c o $\~$ o representativa da imunopress $\~$ o de NF κ B (b,d) e TNF- α (c,e) em compara \c o $\~$ o com o controle (a). Os dados semiquantitativos da imunopress $\~$ o NF κ B (f) e TNF- α (g) s $\~$ o expressos como m $\~$ edia \pm (DP) (n=6/grupo) Para compara \c o $\~$ o foi usado ANOVA seguido pelo teste de Tukey. *P<0,05 comparado com grupo controle. Amplia \c o $\~$ o original das imagens x40.

7 DISCUSSÃO

Nossos dados atuais revelam que as soluções de $MgCl_2$, administradas sistemicamente (per os) ou localmente (intra-articular), diminuíram significativamente a migração celular inflamatória aguda e a resposta hipernociceptiva em um modelo clássico e grave de artrite aguda. Este efeito foi associado a uma expressão reduzida de NF κ B, um complexo proteico intracelular ligado à transcrição de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1 e TNF (LIU et al., 2017).

O fato de nossa estratégia de tratamento, sendo profilática, ter impedido o desenvolvimento da inflamação em um estágio muito precoce, tanto quando injetado sistematicamente quanto localmente, sugere que as células residentes da sinóvia foram provavelmente afetadas pela administração de $MgCl_2$. De fato, as células migratórias inflamatórias na artrite com zymosan são observadas cerca de 3 horas após a administração de Zy. Dado que os camundongos tratados com $MgCl_2$ tiveram alívio significativo da dor já 3h após a injeção de Zy, pode ser que o $MgCl_2$ estivesse agindo nos sinoviócitos residentes, antes do pico de infiltração celular neste modelo de artrite (ROCHA et al., 1999). O fato de $MgCl_2$ ter sido eficaz quando injetado localmente também sugere que é provável uma atividade anti-inflamatória por meio da interferência na ativação de células residentes.

Estudos anteriores associaram baixos níveis séricos de Mg com aumento da gravidade da artrite reumatóide. De fato, usando dados da Coorte do National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), mulheres com menor ingestão de Mg na dieta tiveram menor prevalência de artrite reumatóide, apontando para um possível efeito protetor desse micronutriente nas artropatias inflamatórias (HU et al., 2020). Também aludimos acima a um aumento da prevalência de CPPD em indivíduos com deficiência de Mg (ZENG et al., 2015) e níveis séricos mais baixos de Mg também foram associados ao aumento da gravidade em pacientes com OA (SHMAGEL et al., 2018). No contexto metabólico, uma maior ingestão dietética de Mg foi associada a um menor risco de fratura associada à osteoporose (VERONESE et al., 2017). Em conjunto, esses dados sugerem um efeito benéfico da administração de Mg ou, pelo menos, da manutenção de níveis séricos adequados de Mg em pacientes com doenças musculoesqueléticas.

Com relação à antinocicepção (alívio da dor), foi demonstrado que o Mg reduz a dor em pacientes com artrite e a administração intra-articular de Mg reduz a dor pós-operatória em pacientes submetidos à artroscopia do joelho (CHEN et al., 2012; KANAMORI et al., 2023). A analgesia fornecida pelo Mg foi associada à ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (LI Y et al., 2016). Nossos resultados avançaram na proposição de possíveis mecanismos para a atividade analgésica e anti-inflamatória da administração de $MgCl_2$, os quais seriam devidos à redução da liberação de citocinas inflamatórias, nomeadamente $IL-1\beta$ e possivelmente também $TNF-\alpha$. Estes são mediadores inflamatórios potentes ligados a mecanismos de dor e dano articular em vários modelos de artrite (LIU et al., 2017). Atualmente, a inibição do TNF por meio de anticorpos monoclonais ou um receptor solúvel do TNF é utilizada no tratamento da artrite reumatóide, espondiloartropatias e artrite psoriática, promovendo alívio da dor e estancando o dano articular em alguns pacientes (CAMPBELL et al., 2003; KALLIOLIAS et al., 2015). Em relação à $IL-1\beta$, uma análise post-hoc de um ensaio clínico mostrou que pacientes com doença cardiovascular secundária à aterosclerose tratados com canaquinumabe, um anticorpo anti- $IL-1\beta$, tiveram um risco reduzido de sofrer artroplastia de quadril ou joelho secundária a OA (SCHIEKER et al., 2020).

A diminuição da liberação de $IL-1\beta$ que obtivemos após administração de $MgCl_2$ foi associada à expressão reduzida de $NF-\kappa B$ na sinóvia inflamada, revelando assim um possível mecanismo de ação intracelular. Mantendo essa suposição, foi demonstrado que a exposição de condrócitos de pacientes com OA ao Mg incorporado ao sulfato de condroitina aumentou a viabilidade celular e inibiu a apoptose, além de estar associada à redução da expressão de genes relacionados à inflamação. Além disso, a administração de $MgSO_4$ demonstrou reduzir a liberação de $IL-1$ e a expressão de mRNA para $IL-1$ no tecido sinovial em um modelo animal de OA (LI Y et al., 2016; LI G et al., 2021).

Nosso estudo não é sem limitações. Embora in vivo, usamos um modelo experimental de artrite e nossos resultados devem ser reproduzidos em humanos. Outros mediadores importantes, incluindo os prostanoídes, que estão associados ao desenvolvimento da dor na artrite, não foram investigados. Também será importante desvendar os mecanismos de ação por meio de experimentos isolados com células articulares residentes, como sinoviócitos e condrócitos, bem como com células inflamatórias que migram para as articulações.

Em resumo, demonstramos que a administração sistêmica ou local de $MgCl_2$ apresenta atividade anti-inflamatória em um modelo de artrite aguda, que está associada à diminuição da expressão de NF- κ B e redução da liberação de citocinas inflamatórias. O $MgCl_2$ tem sido utilizado na medicina leiga para tratar dores musculoesqueléticas, principalmente secundárias à OA. Nossos dados agregam informações relevantes sobre a eficácia deste composto seguro. O uso de nutracêuticos e fitocompostos é uma iniciativa muito frequente de automedicação de pacientes que buscam benefícios para a saúde. Nossos resultados sugerem que a concepção de protocolos prospectivos bem desenhados para abordar a eficácia e segurança das preparações de $MgCl_2$ em pacientes com artrite crônica é garantida.

8 CONCLUSÃO

Com os dados obtidos, concluímos que a suplementação mineral à base de $MgCl_2$ apresentou um papel anti-inflamatório e imunomodulador em camundongos submetidos ao modelo AZY, com participação na redução da hipernocicepção, do influxo celular na cavidade articular, da sinovite. Uma parte do mecanismo desse papel anti-inflamatório pode estar relacionado com a redução de citocinas inflamatórias como visto com a redução de IL-1 no líquido sinovial. A caracterização do mecanismo de ação do $MgCl_2$, bem como a avaliação da sua atividade anti-inflamatória pode ser relevante para o auxílio no tratamento de artropatias, em um novo protocolo clínico, administrando-o como suplemento mineral, em combinação com a medicação tradicional, reduzindo ainda mais as limitações de movimentos causadas pela progressão desses tipos de lesões. Dessa forma, estudos envolvendo a administração prolongada e sua atuação em modelos de artrite crônica, se faz necessário, além de uma melhor caracterização do mecanismo responsável pelo papel imunomodulador do $MgCl_2$.

REFERÊNCIAS

- BEZERRA, M.M . et al. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **Nau-Schm's Arch Pharmacol**, v. 374, p. 265–273, 2007.
- BLAGOJEVIC M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(1):24-33.
- BOGLIOLO, patologia / [editor] Geraldo Brasileiro Filho. – 8.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- BOLON, B. et al, Rodent Preclinical Models for Developing Novel ntiarthritic Molecules: Comparative Biology and PreferredMethods for Evaluating Efficacy. **J Biomed Biotechnol**. 2011. doi:10.1155/2011/569068
- BONDOK RS, EI-Hady AMA. Intra-articular magnesium is effective for postoperative analgesia in arthroscopic knee surgery. *Br J Anaesth* 2006;97(3):389e92
- BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 04. In: Saúde Md, ed. Brasília 2017. Disponível em: http://combateaedes.saude.gov.br/images/pdf/2017-Dengue_Zika_Chikungunya_SE4.pdf. Acesso em 15 de NOV de 2017.
- SBR. Osteoartrite (artrose). Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2022. Disponível em: <https://www.reumatologia.org.br/doencas-reumaticas/osteoartrite-artrose/>. Acesso em 15 de OUT de 2022.
- BRITO B. E. et al. Antinociceptive effect of systemically administered dipyrone (metamizol), magnesium chloride or both in a murine model of câncer. *Eur J Pain* 21 (2017) 541—551.
- BROWN, G.D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. **J Exp Med**. 2003 v.197, n.9, p.1119-24, 2003.
- BURMESTER G.R., et al. Adalimumab alone and in combination with disease-modifying antirheumatic drugs for the treatment of rheumatoid arthritis in clinical practice: the Research in Active Rheumatoid Arthritis (ReAct) trial. **Ann Rheum Dis**. v.66, p.732–39. 2007.
- CAMPOS GC, Rezende MU, Pailo AF, Frucchi R, Camargo OP. Adding triamcinolone improves viscosupplementation: a randomized clinical trial. *Clin Orthop Relat Res*. 2013;471(2):613-20.
- CAMPBELL, I.K., L.J. Roberts, Wicks I.P. (2003) Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunol. Cell. Biol*. 81:354–366. <https://doi.org/10.1046/j.0818-9641.2003.01185.x>

- CHEN Y, Zhang Y, Zhu YL, Fu PL. Efficacy and safety of an intra-operative intra-articular magnesium/ropivacaine injection for pain control following total knee arthroplasty. *J Int Med Res*. 2012;40(5):2032-40. doi:10.1177/030006051204000548. PMID: 23206490.
- CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.
- CLEGG DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. **N Engl J Med**. 2006;354(8):795-808.
- COIMBRA IB, Pastor EH, Greve JMD, Puccinelli MLC, Fuller R, Cavancanti FS, et al. Osteoartrite (Artrose): Tratamento. **Rev Bras Reumatol**. 2004;44(6):450-3.
- CORREA L. B. et al. Anti-inflammatory Effect of Methyl Gallate on Experimental Arthritis: Inhibition of Neutrophil Recruitment, Production of Inflammatory Mediators, and Activation of Macrophages. **J. Nat. Prod.**, v.79, n.6, p.1554–1566, 2016.
- CUNHA, T. M. et. al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.
- DUNNE, D.W., COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune diseases. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 5, p. 420-426, 2005.
- FIDELIX TS, Soares BG, Trevisani VF. Diacerein for osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**. 2006;(1):CD005117.
- FRASNELLI, M.E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Res Ther**. v.7, n.2, p.370-9, 2005.
- FURST, D.E. et al. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2009. **An of the Rheum Dis**, v. 69, p. i2-i29, 2010.
- GADÓ, K.L.; GIGLER, G. Zymosan inflammation: A new method suitable for evaluating new inflammatory drugs. **Agents Actions**. v. 32, p.119–21, 1991.
- GIRÃO-CARMONA VCC, Bezerra MM, Porto FMAX, Pinto ACMD, de Melo Nunes R, Alves AMCV, Campello CC, de Melo Leite ACR, de Castro Brito GA, da Rocha FAC. Quantitative evaluation of very early cartilage damage in experimental osteoarthritis using scanning electron microscopy. **Adv Rheumatol**. 2022 Nov 12;62(1):42. doi: 10.1186/s42358-022-00277-w.
- GU, Y. et al. Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 1807-1813, 2008.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophilphagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007- 3017, 1998.

HATA A, Doi Y, Ninomiya T, Mukai N, Hirakawa Y, Hata J, et al. Magnesium intake decreases Type 2 diabetes risk through the improvement of insulin resistance and inflammation: the Hisayama Study. **Diabet Med**, 2013; 30(12):1487-94

HOCHBERG MC, Zhan M, Langenberg P. The rate of decline of joint space width in patients with osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta- -analysis of randomized placebo-controlled trials of chondroitin sulfate. **Curr Med Res Opin**. 2008;24(11):3029-35.

HU C, Zhu F, Liu L, Zhang M, Chen G. Relationship between dietary magnesium intake and rheumatoid arthritis in US women: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2020 Nov 9;10(11):e039640. doi: 10.1136/bmjopen-2020-039640. PMID: 33168559; PMCID: PMC7654130.

KALLIOLIAS G.D., Ivashkiv LB. (2015) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies **Nat Rev Rheumatol**. 12(1):49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169.

KARMAKAR, S.; KAY, J.; GRAVALLESE, E. M.; Bone Damage in rheumatoid arthritis – Mechanistic insights and approaches to prevention. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 385-404, 2010.

KANAMORI H, Fujita Y, Joko R, Ishihara R, Fujiwara Y. Effect of intraoperative systemic magnesium sulphate on postoperative Richmond Agitation-Sedation Scale score after endovascular repair of aortic aneurysm under general anesthesia: A double-blind, randomized, controlled trial. *PLoS One*. 2023 Feb 7;18(2):e0281457. doi: 10.1371/journal.pone.0281457. eCollection 2023.PMID: 36749742

KEYSTONE, E.C., SCHORLEMMER, H.U., POPE, C., ALLISON, A.C. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following action of the alternative pathway of complement. **Arth and Rheum**, v. 20, n.7, p. 1396-1401, 1977.

KIPEL, A. G. B. (2004). "Prevalência da dor: mitos, medos e desarcertos relacionados ao uso de analgésicos opiáceos." *Texto e Contexto Enfermagem* 13(002).

KOLTE D, Vijayaraghavan K, Khera S, Sica D, Frishman WH. Role of magnesium in cardiovascular diseases. **Cardiol Rev**, 2014; 22(4):182-92.

KUTLESIC MS, Kutlesic RM, Mostic-Ilic T. Magnesium in obstetric anesthesia and intensive care. *J Anesth* 2017; 31:127–39. doi: 10.1007/s00540-016-2257-3.

LEE, D.M.,WEINBLATT, M.E. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v.358, p. 903–11, 2001.

LEE CH, Wen ZH, Chang YC, Huang SY, Tang CC, Chen WF, Hsieh SP, Hsieh CS, Jean YH. Intra-articular magnesium sulfate (MgSO₄) reduces experimental osteoarthritis and nociception: association with attenuation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 1 phosphorylation and apoptosis in rat chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Nov;17(11):1485-93. doi: 10.1016/j.joca.2009.05.006. Epub 2009 May 19. PMID: 19490963.

LI Y, Yue J, Yang C. Unraveling the role of Mg(++) in osteoarthritis. *Life Sci*. 2016 Feb 15;147:24-9. doi: 10.1016/j.lfs.2016.01.029. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26800786.

LI G, Cheng T, Yu X. The Impact of Trace Elements on Osteoarthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 23;8: 771297. doi: 10.3389/fmed.2021.771297. PMID: 35004740; PMCID: PMC8732765.

LIU, T., Zhang, L., Joo, D. et al. NF-κB signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2, 17023 (2017). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

MAJITHIA, V. & GERACI, S.A. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. **Amer J of Med**, v. 120, 936-939, 2007.

MARQUES, Claudia Diniz Lopes et al., Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya. Parte 1 - Diagnóstico e situações especiais. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 57, supl. 2, p. 421-437, 2017.

MOTA, L.M.H. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Rev Bras de Reumatol**. v.52, n. 2, p.135–74, 2012.

NAGAI N, Fukuhata T, Ito Y, Tai H, Hataguchi Y, Nakagawa K. Preventive effect of water containing magnesium ion on paw edema in adjuvant-induced arthritis rat. *Biol Pharm Bull*. 2007 Oct;30(10):1934-7. doi: 10.1248/bpb.30.1934. PMID: 17917265.

Naithani M, Bharadwaji J, Darbari A. Magnesium: The fifth electrolyte. **J Med Nutr Nutraceut**, 2014; 3(2):186-92.

NAM, N.H. Naturally occurring NF- κ B inhibitors. **Mini Reviews of Medicinal Chemistry**, v.6, p. 945–951, 2006.

PINTO, L.G. et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **PAIN**. v.148, n.2, p.247-56, 2010.

RASHID, T., EBRINGER, A. Rheumatoid arthritis is linked to Proteus-the evidence. **J of Clin Rheumatol**, v. 26, n. 7, p. 1036-1043, 2007.

RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Evaluation of the anti-inflammatory and antiproliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*,

and Cinnamomum osmophloeum bark extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 78- 85, 2007.

Rezende MU, Campos GC. Viscosuplementação. **Rev Bras Ortop**. 2012;47(2):158-62

Rezende MU, Gobbi RG. Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. **Rev Bras Ortop**. 2009;44(1):14-9.

ROBBINS & COTRAN, bases patológicas das doenças / Vinay Kumar... [et al.]; [tradução de Patrícia Dias Fernandes... et al.]. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ROCHA, F.A.C.; et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflammation research*, v.48, p. 485–490, set., 1999.

ROCHA, F.A.C. et al. Protective Effect of an Extract from *Ascaris suum* in Experimental Arthritis Models. **Infection and Immunity**. v.76, n.6, p. 2736–2745, 2008.

ROCKEL, J.S. & KAPOOR, M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**. .v.12, n.9, p.517-31, 2016.

ROMAN, A et al. Maternal magnesium supplementation reduces intrauterine growth restriction and suppresses inflammation in a rat model. **American Journal of Obstetrics Gynecology**. v.208, 2013.

Schieker M, Conaghan PG, Mindeholm L, Praetgaard J, Solomon DH, Scotti C, Gram H, Thuren T, Roubenoff R, Ridker PM. Effects of Interleukin-1 β Inhibition on Incident Hip and Knee Replacement : Exploratory Analyses From a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann Intern Med*. 2020 Oct 6;173(7):509-515. doi: 10.7326/M20-0527.

SEVERO, Juliana Soares; Morais, Jennifer Beatriz Silva; Freitas, Taynáh Emannelle Coelho de; Cruz, Kyria Jayanne Clímaco; Oliveira, Ana Raquel Soares de; Poltronieri, Fabiana; Marreiro, Dilina do Nascimento. Aspectos Metabólicos e Nutricionais do Magnésio. *Nutr. clín. diet. hosp*. 2015; 35(2):67-74 DOI: 10.12873/352severo.

Shahi A, Aslani S, Ataollahi M, Mahmoudi M. The role of magnesium in different inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2019 Aug;27(4):649-661. doi: 10.1007/s10787-019-00603-7. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31172335.

SCHORLEMMER, H. U.; BITTER-SUERMAN, D.; ALLISON, A. C. Complement activation by the alternative pathway and macrophage enzyme secretion in the pathogenesis of chronic inflammation. **Immunology**, v. 32, p. 929-940, 1977.

Shmagel A, Onizuka N, Langsetmo L, Vo T, Foley R, Ensrud K, Valen P. Low magnesium intake is associated with increased knee pain in subjects with radiographic knee osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis*

Cartilage. 2018 May;26(5):651-658. doi: 10.1016/j.joca.2018.02.002. Epub 2018 Feb 15. PMID: 29454594.

SILVA, S.R. et al. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10- mediated mechanism. **Euro J of Immunol**, v. 36, p. 3227-3237, 2006.

SILVA JR. S.; ROCHA, F. A. C. Artrite induzida por zymosan – Mecanismos envolvidos na hipernocicepção e na lise da cartilagem articular. **Acta Reumatológica Portuguesa**, v. 31, p. 143-149, 2006.

SOKKA, T. et al. Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. **Arthritis Res Ther.** v.12, n.2, p.42, 2010.

SCOTT, D.L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T.W.J. Rheumatoid arthritis. **Lancet** v.376, p.1094– 1108, 2010.

SMOLEN J.S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. **Ann Rheum Dis.** v.75, p.3–15. 2016.

SMOLEN, J.S., & ALETAHA, D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. **Nat. Rev. Rheumatol.** v.11, p.276–289. 2015

SWEENEY, S.E., FIRESTEIN, G.S. Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Curr Op in Rheumatol.* v.16, n.3, p. 231-237, 2004.

STOOP, R. et al. Denaturation of type II collagen in articular cartilage in experimental murine arthritis: Evidence for collagen degradation in both reversible and irreversible cartilage damage. **J of Pathol**, v. 188, p. 329-337, 1999.

TEZENAS, D.U., MONTCEL, S., MICHOU, L., PETIT-TEIXEIRA, E., OSORIO, J., LEMAIRE, I., LASBLEIZ, S., PIERLOT, C., QUILLET, P., BARDIN, T., PRUM, B., COMELIS, F., CLERGET-DARPOUX, F. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. **Arthritis Rheumatism**, v. 52, n. 4, p. 1063-1068, 2005.

TOIVANEN, P. Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.62, n.9, p. 807-811, 2003.

Towheed TE, Maxwell L, Anastassiades TP, Shea B, Houpt J, Robinson V, et al. Glucosamine therapy for treating osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev.** 2005;(2):CD002946.

Veronese N, Stubbs B, Solmi M, Noale M, Vaona A, Demurtas J, Maggi S. Dietary magnesium intake and fracture risk: data from a large prospective study. *Br J Nutr.* 2017 Jun;117(11):1570-1576. doi: 10.1017/S0007114517001350. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28631583; PMCID: PMC5753403.

VERRI JR. W. A. et al. Nociceptive effect of subcutaneously injected interleukin-12 is mediated by Endothelin acting on ETB receptors in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 2, p. 609-615, 2005.

Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lin YH, Hou SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(12):1237-47.

Yao H, Xu JK, Zheng NY, Wang JL, Mok SW, Lee YW, Shi L, Wang JY, Yue J, Yung SH, Hu PJ, Ruan YC, Zhang YF, Ho KW, Qin L. Intra-articular injection of magnesium chloride attenuates osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2019 Dec;27(12):1811-1821. doi:10.1016/j.joca.2019.08.007.

ZANELLI, E., BREEDVELD, F.C., DE VRIES, R.R. Class II association with rheumatoid arthritis: facts and interpretations. **Human Immunology**, v. 61, p.1254–61, 2000.

Zeng C, Wei J, Li H, Yang T, Zhang FJ, Pan D, Xiao YB, Yang TB, Lei GH. Relationship between Serum Magnesium Concentration and Radiographic Knee Osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2015 Jul;42(7):1231-6. doi: 10.3899/jrheum.141414. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26034158.

.Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. **Osteoarthritis Cartilage**. 2010;18(4):476-99.

APÊNDICE A – PARECER DO CEUA



Quixadá, 20 de janeiro de 2018.

PARECER REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 05/2018

Responsável: Dra. Ana Carolina Matias Dinelly Pinto

I - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto “Efeito do cloreto de magnésio em modelo de artrite induzida por Zymosan”, submetido a esta Comissão como **APROVADO**.

Solicitamos aos pesquisadores:

- ✓ Providenciar relatório após término do projeto para ser apresentado a esta Comissão.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-UNICATÓLICA o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações e entrega de relatório até **20 de janeiro de 2019**.

II - Data da reunião de aprovação do projeto: 19/01/2018.

MICHEL BARBOSA DE ARAÚJO

Dr. Michel Barbosa de Araújo

Coordenador da CEUA/UNICATÓLICA

Prof. Dr. Michel Barbosa de Araújo
Coord. do Comitê de Ética
em Pesquisa Animal
Centro Universitário Católica de Quixadá

ANEXO A - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA ADVANCES IN RHEUMATOLOGY

Systemic and local antiinflammatory effect of magnesium chloride in experimental arthritis

Ana Carolina Matias Dinelly Pinto²; Rodolfo de Melo Nunes¹; Waleska Vidal de Freitas Carvalho⁴; Virgínia Claudia Carneiro Girão³; Francisco Airton Castro Rocha^{1*}

¹Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ceará - Brazil; ²Unicatólica – Universidade católica Rainha do Sertão, Quixadá – Ceará - Brazil, ³Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ceará – Brazil. 4 Mestrado profissional em biotecnologia em saúde humana e animal – Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza – Ceará - Brazil

*Address for correspondence:

Dr. Rocha, Francisco Airton C.
Instituto de Biomedicina – Laboratório de Investigação em Osteoartropatias
Rua Coronel Nunes de Melo, 1315 -1º. Andar
Rodolfo Teofilo – Fortaleza – CE - CEP: 60430-270
Phone: (55 85) 32446215; FAX (55 85) 32446215; E-mail: arocha@ufc.br

Acknowledgements

This work was partially supported by for Rocha FAC by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ grants 313860/2021-1 and 403767/2021-0). Authors are also grateful to Unicatólica, Quixadá-CE, Brazil.

Authors' contributions

RML, ACMDP, FACR conception of the protocol; RML, ACMDP, VCCG, FACR performed animal model, including histology reading (VCCG); RML, ACMDP, VCCG, FACR data analysis; all authors revised and approved the final version of the manuscript.

Abstract

Objective: Despite lack of scientific evidence, MgCl₂ is largely used in lay medicine for pain relief in musculoskeletal diseases. Mg salts were shown to provide analgesia postoperatively in orthopedic surgery and low Mg levels were linked to arthritis development and severity. We determined the anti-inflammatory activity of MgCl₂ in an acute arthritis model. Methods: Mice received 0.1 mg/25µL Zymosan (Zy) or saline into the knees. Joint pain was evaluated using von Frey test; cell influx, and interleukin (IL)-1 level were assessed in joint lavage at 6h. Synovia were excised for histopathology

and analysis of immunoeexpression of nuclear factor kappa B (NFκB) and tumor necrosis factor (TNF)-α. Groups (n=6/group) received either 90mg/kg MgCl₂/100 μL or saline *per os* (systemic) or 500μg/25 μL MgCl₂ or saline intra-articularly (i.a.) 30 min prior to Zy. Results: MgCl₂ given either systemically or locally significantly reduced cell influx (p=0.0012 and p=0.0269, respectively), pain (p=0.0005. and p=0.0038, respectively), and intra-articular IL-1 level (p=00391), as compared to saline. Systemic MgCl₂ significantly decreased NFκB (p<0.05) immunoeexpression, as compared to saline. Conclusion: MgCl₂ given systemically or locally displayed anti-inflammatory activity in a severe acute arthritis model reducing cell influx, pain and cytokine release. MgCl₂ operates at least partially via inhibiting NFκB activation. This is the first *in vivo* demonstration that MgCl₂ decreases cytokine release in arthritis, prompting reduction of inflammation and pain relief.

Keywords: Magnesium; inflammation; pain; arthritis; zymosan

Background

Despite of a lack of scientific evidence, magnesium chloride (MgCl_2) supplementation has become popular in lay medicine as a compound to treat osteoarthritis (OA). Curiously, magnesium sulfate (MgSO_4) has been for long time used in anesthesia as a strategy to reduce the need for opioids postoperatively as well as a substance to facilitate anesthetic procedures including intubation. MgSO_4 is also a first option to treat or prevent seizures linked to pre-eclampsia [1] (Kutlesic et al., 2017). Notwithstanding, intra-articular injection of MgSO_4 was shown to decrease pain in patients subjected to knee arthroscopy [2] (Bondok & El-Hady, 2006). Magnesium is a micronutrient involved in the regulation of physiological functions in the body, being the fourth among cations present in extracellular fluids, and it is more frequently present in bones, teeth and soft tissues [3](Li, Yue, & Yang, 2016). A recent study using an OA model has shown that MgCl_2 given intra-articularly prevents progression of joint damage, which was associated to decreased expression of matrix metalloproteinase and interleukin-6 genes in synovium and cartilage explants, thus suggesting possible anti-inflammatory and cartilage sparing effects [4](Yao et al., 2019). Also, lower serum magnesium levels, even within the normal range, were associated with higher prevalence of knee chondrocalcinosis, i.e. calcium pyrophosphate deposition disease (CPPD), in two large population based Chinese cohorts [5](Zeng et al.). Moreover, using data from the Osteoarthritis Initiative cohort, lower serum magnesium levels were associated with worse pain and function in individuals with knee OA [6](Shmagel et al., 2018). In keeping with these data, a narrative review approaching magnesium deficiency found association with development of diverse chronic inflammatory diseases, including atherosclerosis, diabetes, and rheumatoid arthritis [7] (Shahi et al., 2019). We are not aware of studies investigating anti-inflammatory efficacy of systemic, oral administration, of MgCl_2 in arthritis models. Given that patients with arthritis usually ingest MgCl_2 as a pain killer, our objective was to determine whether MgCl_2 displays anti-inflammatory and antinociceptive activity after local and systemic administration in an acute arthritis model, while unraveling a possible mechanism of action.

Methods

Animals

Male Swiss mice weighing 20-25g were obtained from the Central Animal Facility of the Faculty of Medicine of the Universidade Federal do Ceará, Brazil. All efforts were made to minimize suffering, with a total of 48 animals being housed in temperature-controlled rooms with 12 h light/dark cycles and free access to water and food. Careful monitoring and maintenance were conducted in accordance with the ethical recommendations of the Brazilian Veterinary Medicine Council (CMV), Guidelines for the Use of Animals in Research of the International Association for the Study of Pain (IASP), and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication). Additionally, protocols employed were approved by the local Ethics Committee on animal experimentation (Reg. N^o. 13307).

Zymosan Arthritis model – assessment of cell influx and joint nociception

Mice received either intra-articular (i.a.) injection of 0.1 mg/25 μ L Zymosan (Zy; Sigma, St. Louis, MO) or saline (control) into the right knee joints under xylazine (10mg/kg) / ketamine (80mg/kg) intra-peritoneal (i.p.) anesthesia. After 6 hours, mice were terminally anesthetized and the exudates of the knee joints were collected by aspiration for determination of total and differential cell counts using Neubauer chamber and Panoptic Instant ProvTM staining kit (New ProvBrasilTM), respectively. Nociceptive behavior was assessed using the electronic pressure-meter nociception paw test by an observer blinded to group allocation. Animals were placed in acrylic cages (12 x 10 x 17 cm high) with a wire grid floor, 15 min before the beginning of the tests, in a quiet room. Stimulations were performed only when animals were quiet, without exploratory, urination or defecation movements and not resting on their paws. The electronic pressure-meter consists of a hand-held force transducer fitted with a polypropylene tip (Electronic von Frey aesthesiometer, Insight Equipamentos Científicos Ltda., Brasil). The polypropylene tip was applied perpendicularly to one of the five distal footpads of the right hind paw. The intensity of the stimulus was

automatically recorded when the paw was withdrawn. The test was repeated three times, until less than a 1 g difference between measurements was obtained. Results were expressed as the mean value of three withdrawal threshold measurements (g) (de Melo Nunes, 2020)

Pharmacological treatments

Groups (n=6/group) received either 90mg/kg MgCl₂ or saline (100 µL total volume) *per os* (p.o.; gavage; systemic intervention) or 500µg MgCl₂ solution or saline (25 µL total volume) i.a. (local intervention) 30 min prior to Zy injection. The intraarticular dosage of MgCl₂ was based on a previous study showing that 500µg MgSO₄ given intra-articularly to rats subjected to experimental osteoarthritis reduced both pain and joint damage [8]. Oral dosage of Mg was based on a previous study showing that rats given 50-200mg of Mg per liter in drinking water (drinking roughly 10mL/d) had less inflammation when subjected to experimental arthritis [9 Nagai]. In that case, each rat would receive 0.5 -2 mg Mg daily. In the present study, Swiss mice received 90mg/Kg MgCl₂ *per os* meaning each mice received a single daily dosage of 4 mg MgCl₂ which would be equivalent to roughly 1mg Mg daily.

Synovial Histopathology

Mice were sacrificed six hours after the intra-articular challenge with Zy and had their knee joint tissues excised for the histological study. After fixation in 10% v/v formaldehyde solution and decalcification (5% v/v formic acid in 10% v/v formaldehyde solution), the whole joint, comprising the distal femoral and proximal tibial extremities, was processed for paraffin-embedding and staining with hematoxylin-eosin (HE). Analysis was expressed as one result/sample. Semi-quantitative histopathological evaluations were performed by an independent observer (VCCG) blinded to group allocation considering synovial proliferation and cell infiltration, ranging from 0 to 3 (0, absent; 1, mild; 2, moderate; 3, severe). Results are expressed as the median value for each group of at least four animals [10] (Rocha et al.).

Determination of IL-1 β level in joint exudates

Joint exudates were used to determine IL-1 β levels following the instructions of the manufacturer of a commercially available IL-1 β ELISA kit (R&D Systems, São Paulo, SP, Brazil).

Immunohistochemistry

Synovial membranes were used to assess the immunoexpression of the nuclear factor kappa B (NF κ B) and tumor necrosis factor (TNF)- α , using commercially available kits (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Briefly, after deparaffinization, tissue sections were incubated with hydrogen peroxide and washed. After incubation in citrate buffer, specimens were subjected to slight heating in a microwave oven. After overnight unspecific blocking with rabbit serum, the samples were incubated with the rabbit anti-NF κ B or anti-TNF α antibody (diluted 1:200 in PBS plus 1 % of BSA, 2 h). After rinsing, the sections were incubated with a secondary biotinylated anti-rabbit IgG antibody. The reaction product was detected using Envision™ System-HRP (AEC) complex (DAKO, Carpinteria, CA, USA), and the color of the reaction was developed with diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAKO, Carpinteria, CA, USA). The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. The intensity of the staining was analyzed under light microscopy using Image J™ software [11]

Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Results are reported as means \pm standard deviation (SD) or medians (range), as appropriate. Student's "t" test, one-way ANOVA followed by Tukey's test or Kruskal-Wallis were used to compare differences between means and medians, as appropriate.

Results

MgCl₂ reduces Cell Influx, Hypernociception, and IL-1 release in acute zymosan arthritis

As shown in Figure 1a, Zy injection induced a prominent leukocyte migration, with predominance of polymorphonuclear cells (>85%), into the knee joint after 6 hours; pretreatment via systemic ($p = 0.0003$) or local (intra-articular) ($p=0.0027$) administration of $MgCl_2$ promoted a remarkable and highly significant reduction of cell influx, as shown in figure 1a. The reduction in cell counts was mostly of PMN, although numbers of lymphocytes and monocytes were also reduced (figures 1b-d). Interestingly, though not reaching statistical significance, reduction of cell counts appeared more pronounced after systemic (oral) administration of $MgCl_2$ as compared to the intra-articular injection local administration (figures 1a-d).

Regarding pain, the hypernociceptive response provoked by injection of Zy into the mouse joints was significantly reduced by both systemic and local administration of $MgCl_2$ solutions, happening as early as 3 hours following Zy injection, being sustained until 5h (figures 1d-e). The antinociceptive response was more pronounced in mice that received systemic $MgCl_2$ as compared to local administration (figure 1e).

Given the increased reduction in cell influx and hypernociception following systemic administration of $MgCl_2$, further studies were done using this dosage. Reduction of the release of the inflammatory cytokine $IL-1\beta$ into joint exudates is seen in animals that received $MgCl_2$ systemically, as compared to animals treated with vehicle (saline) (figure 1g).

Histopathological evaluation

As expected, injection of Zy induced a significant increase in cell influx into the synovia as well as synovial hyperplasia. Such changes were significantly reduced after treatment of the mice with the $MgCl_2$ solution regardless of being a systemic or local administration (Table 1).

$MgCl_2$ decreases immunoexpression of NF κ B and TNF α in the Synovia.

Figure panel 2 illustrate photomicrographs of the immunostaining for analysis of the expression of NF κ B and TNF α in the synovia of mice subjected to Zy arthritis treated with a $MgCl_2$ solution.

There is intense immunostaining for both NFκB (2b) and TNFα (2c) in mice that received Zy and saline, as compared to naïve mice (2a). Systemic pretreatment with MgCl₂ significantly reduced immunostaining for NFκB (2d). Immunexpression of TNFα was also reduced, though not reaching statistical significance (3e).

Discussion

Our present data reveal that MgCl₂ solutions, given systemically (*per os*) or locally (intra-articularly), significantly decreased acute inflammatory cell migration and the hypernociceptive response in a classic and severe acute arthritis model. This effect was associated with a reduced expression of NFκB, an intracellular protein complex linked to transcription of inflammatory cytokines, including IL-1 and TNF [12]. The fact that our treatment strategy, being prophylactic, prevented inflammation from developing at a very early stage, both when injected systemically or locally, suggests that resident cells of the synovium were probably affected by MgCl₂ administration. Indeed, inflammatory migrating cells in zymosan arthritis are seen circa 3 hours following Zy administration. Given that mice treated with MgCl₂ had significant pain relief as early as 3h post Zy injection, it might well be that MgCl₂ was acting in local, resident synoviocytes, prior to the peak of cell infiltration in this arthritis model[13]. The fact that MgCl₂ was effective when injected locally does also suggest that an anti-inflammatory activity via interfering with the activation of resident cells is likely.

Previous studies associated low serum Mg levels with increased severity of rheumatoid arthritis. Indeed, using data from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) cohort, women with lower dietary Mg intake had decreased prevalence of rheumatoid arthritis, pointing to a possible protective effect of this micronutrient in inflammatory arthropathies [14](Ref). We have also alluded above to an increased prevalence of CPPD in individuals with Mg deficiency [5](Ref na intro) and lower serum Mg levels were also associated with increased severity in OA patients [6](Ref). In the metabolic context, higher dietary Mg intake was associated with a lower risk fracture associated with osteoporosis [15] (Veronese).

In conjunction, these data suggest a beneficial effect of either the administration of Mg or at least maintenance of appropriate serum Mg levels in patients with musculoskeletal diseases. Regarding antinociception (pain relief), it was shown that Mg reduces pain in arthritis patients and intra-articular administration of Mg reduces postoperative pain in patients undergoing knee arthroscopy [16,17]. [69]. The analgesia provided by Mg was linked to the activation of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors [3]. Our results advanced in proposing possible mechanisms for the analgesic and anti-inflammatory activity of MgCl₂ administration, which would be due to reduction of the release of inflammatory cytokines, namely IL-1β and possibly also TNF-α. These are potent inflammatory mediators linked to pain mechanisms and joint damage in various arthritis models [12]. Actually, inhibition of TNF by using monoclonal antibodies or a soluble TNF receptor are currently used to treat rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and psoriatic arthritis promoting pain relief and halting joint damage in some patients [18,19]. Regarding IL-1β, a *post-hoc* analysis of a clinical trial showed that patients with cardiovascular disease secondary to atherosclerosis treated with canakinumab, an anti-IL-1β antibody, had a reduced risk of undergoing hip or knee arthroplasty secondary to OA [20]. The decreased release of IL-1β that we obtained following MgCl₂ administration was associated with reduced expression of NF-κB in the inflamed synovium, thus revealing a possible intra-cellular mechanism of action. In keeping with this assumption, it was shown that exposure of chondrocytes from OA patients with Mg incorporated into chondroitin sulfate increased cell viability and inhibited apoptosis, while being associated with reduction of the expression of inflammation-related genes. Additionally, MgSO₄ administration was shown to reduce IL-1 release and mRNA expression for IL-1 in synovial tissue in an animal model of OA [3, 21]. Our study is not without limitations. Although *in vivo*, we used an experimental arthritis model and our results have to be reproduced in humans. Other important mediators, including prostanoids, which are associated with pain development in arthritis, were not investigated. It will also be important to uncover mechanisms of action using isolated experiments with resident joint cells, such as synoviocytes and chondrocytes, as well as with inflammatory cells that migrate to joints.

In summary, we demonstrate that systemic or local administration of $MgCl_2$ has anti-inflammatory activity in an acute arthritis model, which is associated to decreased expression of NF- κ B and reduction of inflammatory cytokine release. $MgCl_2$ has been used in lay medicine to treat musculoskeletal pain, particularly secondary to OA. Our data add relevant information regarding the efficacy of this safe compound. The use of nutraceuticals and phytocompounds is a very frequent initiative of automedication of patients seeking health benefit. Our results suggest that designing prospective well-designed protocols to address efficacy and safety of $MgCl_2$ preparations in patients with chronic arthritis is warranted.

List of Abbreviations:

Hematoxylin-eosin, HE

Interleukin-1, IL-1

Intra-articular, i.art.

N-methyl-D-aspartate (NMDA)

Nuclear factor kappa B (NF κ B)

OA, osteoarthritis

Tumor necrosis factor (TNF)- α

Zymosan, Zy

Declarations

Ethical approval and Consent to participate: The study was conducted in accordance with the guidelines from the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL) and the protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Faculdade de Medicina of the Universidade Federal Ceará.

Consent for publication: Not applicable

Availability of data and materials: All data generated or analysed during this study are included in this published article

Competing interests: Not applicable

Funding: No specific funding was obtained for this study. This work had partial support for Rocha FAC by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ grants 313860/2021-1 and 403767/2021-0). Authors are also grateful Unicatólica, Quixadá-CE, Brazil.

Authors' contributions: RML, ACMDP, FACR conception of the protocol; RML, ACMDP, VCCG, FACR performed animal model, including histology reading (VCCG); RML, ACMDP, VCCG, FACR data analysis; all authors revised and approved the final version of the manuscript.

References

1. Kutlesic MS, Kutlesic RM, Mostic-Ilic T. Magnesium in obstetric anesthesia and intensive care. *J Anesth* 2017; 31:127–39. doi: 10.1007/s00540-016-2257-3.
2. Bondok RS, El-Hady AMA. Intra-articular magnesium is effective for postoperative analgesia in arthroscopic knee surgery. *Br J Anaesth* 2006;97(3):389e92
3. Li Y, Yue J, Yang C. Unraveling the role of Mg(++) in osteoarthritis. *Life Sci.* 2016 Feb 15;147:24-9. doi: 10.1016/j.lfs.2016.01.029. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26800786.
4. Yao H, Xu JK, Zheng NY, Wang JL, Mok SW, Lee YW, Shi L, Wang JY, Yue J, Yung SH, Hu PJ, Ruan YC, Zhang YF, Ho KW, Qin L. Intra-articular injection of magnesium chloride attenuates osteoarthritis progression in rats. *Osteoarthritis Cartilage.* 2019 Dec;27(12):1811-1821. doi:10.1016/j.joca.2019.08.007.
5. Zeng C, Wei J, Li H, Yang T, Zhang FJ, Pan D, Xiao YB, Yang TB, Lei GH. Relationship between Serum Magnesium Concentration and Radiographic Knee Osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2015 Jul;42(7):1231-6. doi: 10.3899/jrheum.141414. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26034158.
6. Shmagel A, Onizuka N, Langsetmo L, Vo T, Foley R, Ensrud K, Valen P. Low magnesium intake is associated with increased knee pain in subjects with radiographic knee

- osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative. *Osteoarthritis Cartilage*. 2018 May;26(5):651-658. doi: 10.1016/j.joca.2018.02.002. Epub 2018 Feb 15. PMID: 29454594.
7. Shahi A, Aslani S, Ataollahi M, Mahmoudi M. The role of magnesium in different inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2019 Aug;27(4):649-661. doi: 10.1007/s10787-019-00603-7. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31172335.
 8. Lee CH, Wen ZH, Chang YC, Huang SY, Tang CC, Chen WF, Hsieh SP, Hsieh CS, Jean YH. Intra-articular magnesium sulfate (MgSO₄) reduces experimental osteoarthritis and nociception: association with attenuation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 1 phosphorylation and apoptosis in rat chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Nov;17(11):1485-93. doi: 10.1016/j.joca.2009.05.006. Epub 2009 May 19. PMID: 19490963.
 9. Nagai N, Fukuhata T, Ito Y, Tai H, Hataguchi Y, Nakagawa K. Preventive effect of water containing magnesium ion on paw edema in adjuvant-induced arthritis rat. *Biol Pharm Bull*. 2007 Oct;30(10):1934-7. doi: 10.1248/bpb.30.1934. PMID: 17917265.
 10. Pinto ACMD, Nunes RM, Nogueira IA, Fischer B, Lucas R, Girão-Carmona VCC, de Oliveira VLS, Amaral FA, Schett G, Rocha FAC. Potent anti-inflammatory activity of the lectin-like domain of TNF in joints. *Front Immunol*. 2022 Oct 31;13:1049368. doi: 10.3389/fimmu.2022.1049368.
 11. Girão-Carmona VCC, Bezerra MM, Porto FMAX, Pinto ACMD, de Melo Nunes R, Alves AMCV, Campello CC, de Melo Leite ACR, de Castro Brito GA, da Rocha FAC. Quantitative evaluation of very early cartilage damage in experimental osteoarthritis using scanning electron microscopy. *Adv Rheumatol*. 2022 Nov 12;62(1):42. doi: 10.1186/s42358-022-00277-w.
 12. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. et al. NF-κB signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther* 2, 17023 (2017). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
 13. Rocha FAC, Aragao AGM, Jr., Oliveira RC, Pompeu MML, Vale MR, Ribeiro RA. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflammation Research*. 1999;48(9):485–490.

14. Hu C, Zhu F, Liu L, Zhang M, Chen G. Relationship between dietary magnesium intake and rheumatoid arthritis in US women: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2020 Nov 9;10(11):e039640. doi: 10.1136/bmjopen-2020-039640. PMID: 33168559; PMCID: PMC7654130.
15. Veronese N, Stubbs B, Solmi M, Noale M, Vaona A, Demurtas J, Maggi S. Dietary magnesium intake and fracture risk: data from a large prospective study. *Br J Nutr*. 2017 Jun;117(11):1570-1576. doi: 10.1017/S0007114517001350. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28631583; PMCID: PMC5753403.
16. Chen Y, Zhang Y, Zhu YL, Fu PL. Efficacy and safety of an intra-operative intra-articular magnesium/ropivacaine injection for pain control following total knee arthroplasty. *J Int Med Res*. 2012;40(5):2032-40. doi: 10.1177/030006051204000548. PMID: 23206490.
17. Kanamori H, Fujita Y, Joko R, Ishihara R, Fujiwara Y. Effect of intraoperative systemic magnesium sulphate on postoperative Richmond Agitation-Sedation Scale score after endovascular repair of aortic aneurysm under general anesthesia: A double-blind, randomized, controlled trial. *PLoS One*. 2023 Feb 7;18(2):e0281457. doi: 10.1371/journal.pone.0281457. eCollection 2023. PMID: 36749742
18. Campbell, I.K., L.J. Roberts, Wicks I.P. (2003) Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunol. Cell. Biol*. 81:354–366. <https://doi.org/10.1046/j.0818-9641.2003.01185.x>
19. Kalliolias G.D., Ivashkiv LB. (2015) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies *Nat Rev Rheumatol*. 12(1):49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169.
20. Schieker M, Conaghan PG, Mindeholm L, Praestgaard J, Solomon DH, Scotti C, Gram H, Thuren T, Roubenoff R, Ridker PM. Effects of Interleukin-1 β Inhibition on Incident Hip and Knee Replacement : Exploratory Analyses From a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Ann Intern Med*. 2020 Oct 6;173(7):509-515. doi: 10.7326/M20-0527.

21. Li G, Cheng T, Yu X. The Impact of Trace Elements on Osteoarthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 23;8:771297. doi: 10.3389/fmed.2021.771297. PMID: 35004740; PMCID: PMC8732765.

Figures

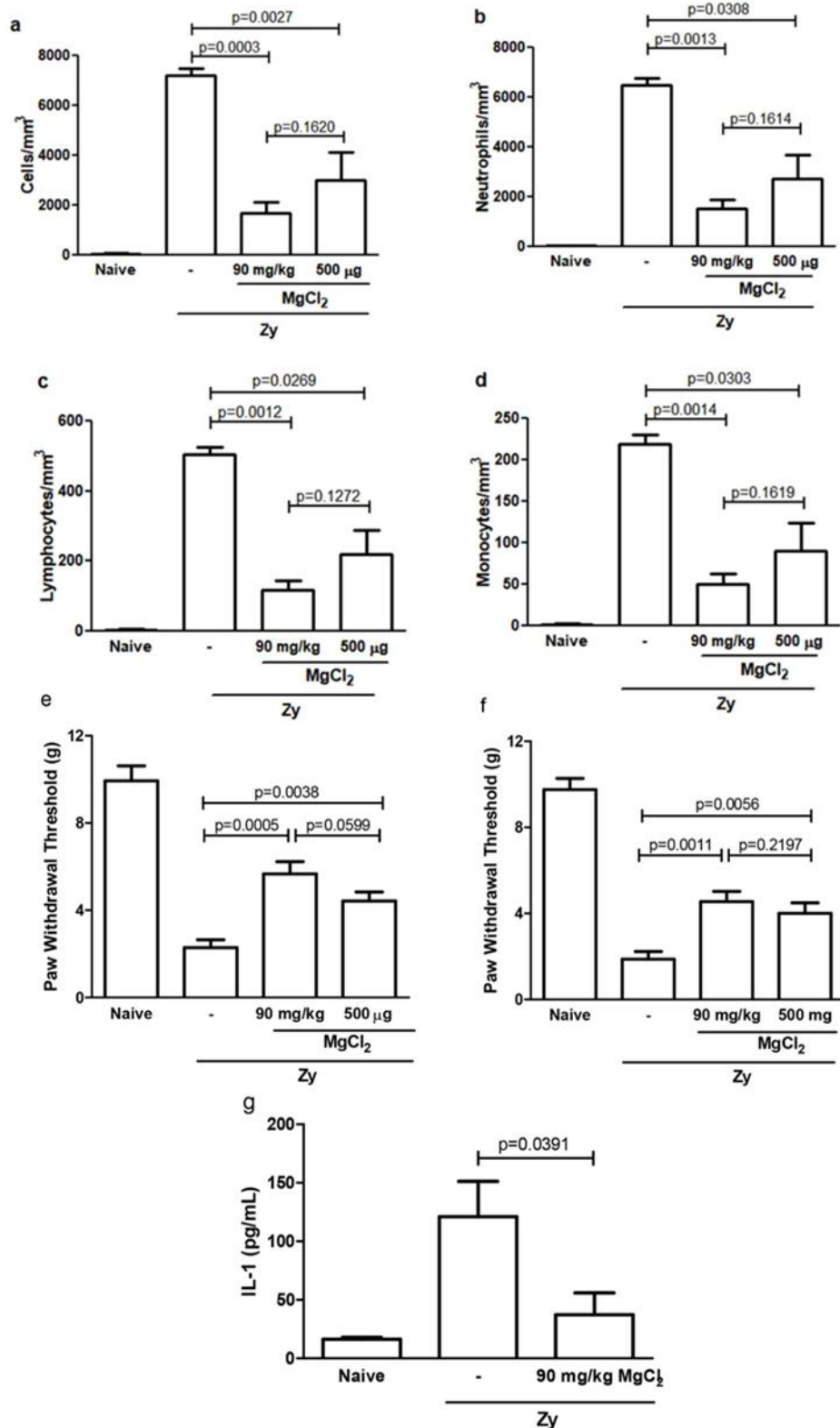


Figure 1. Mice that received 0.1mg Zymosan (Zy) intra-articular (i.art.) or saline were treated with 500μg MgCl₂ i.art. or 90mg/kg MgCl₂ *per os*. Cell counts (a-d) in joint exudates 6h after Zy injection. Hypernociception (paw withdrawal threshold) measured with von Frey filaments at 3h (open bars) and 5h (closed bars) (e-f). Interleukin(IL)-1 level in joint exudates 6h after Zy injection. Data are mean ± (SD) (n=6/group) compared using one-way ANOVA followed by Tukey's test.

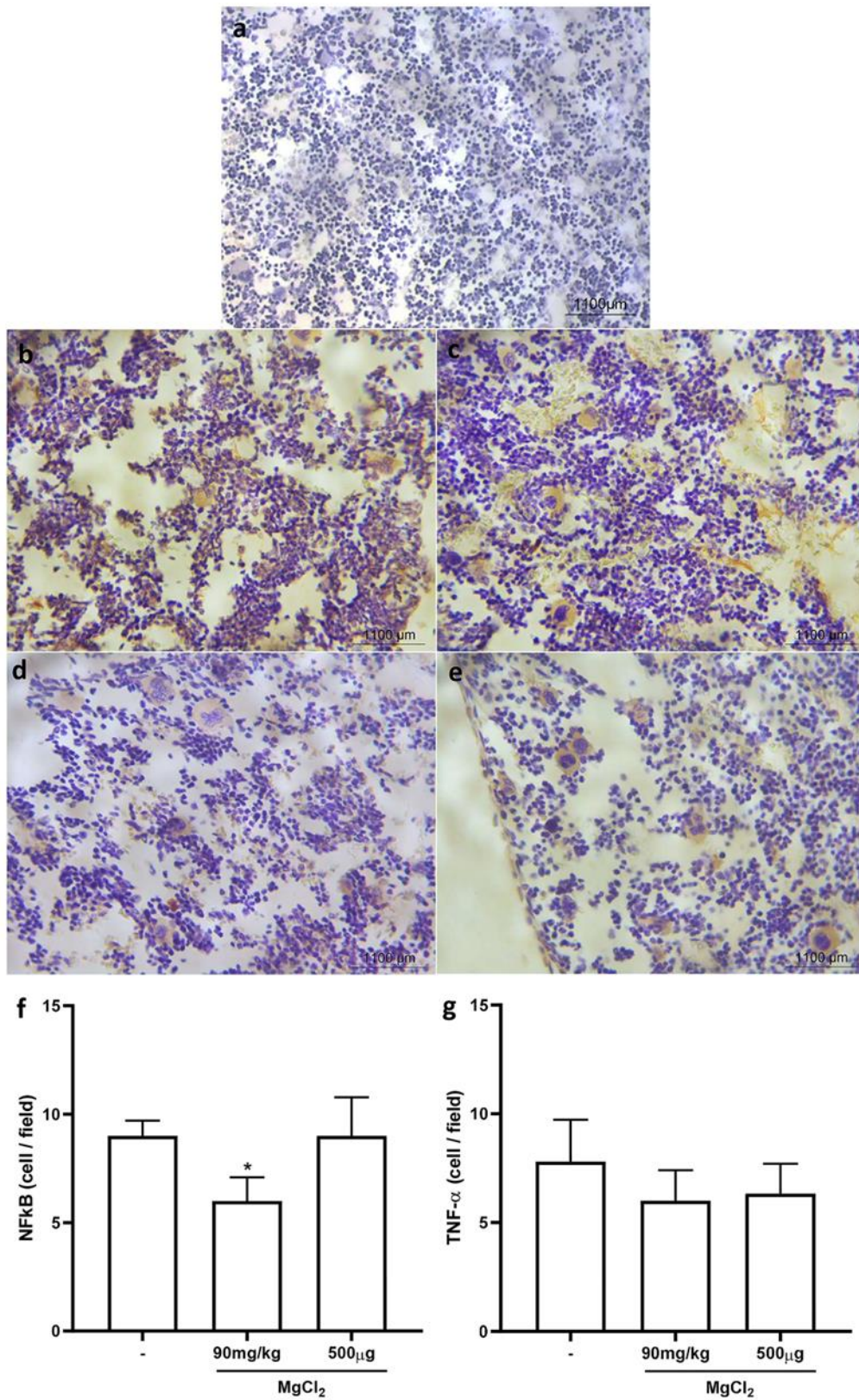


Figure 2. Mice that received intra-articular (i.art.) 0.1mg Zymosan (Zy) or saline into joints were treated with 90mg/kg MgCl₂ *per os*. Synovia collected 6h after Zy injection were processed for immunohistochemistry (see text for details). Representative illustration and semiquantitative data of the immunoexpression of NFκB (b,d,f) and TNF- α (c,e,g) as compared to control (a). Data are mean \pm (SD) (n=6/group) compared using Student's "t" test (Original magnification x40).