



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NAYARA ANITELLI ARTERO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-  
INFLAMATÓRIO DA HESPERIDINA METIL CHALCONA EM  
MODELO DE ARTRITE INDUZIDO POR DIÓXIDO DE  
TITÂNIO EM CAMUNDONGOS**

---

Londrina  
2018

NAYARA ANITELLI ARTERO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-  
INFLAMATÓRIO DA HESPERIDINA METIL CHALCONA EM  
MODELO DE ARTRITE INDUZIDO POR DIÓXIDO DE  
TITÂNIO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu A. Verri Jr.

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Artero, Nayara.

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA HESPERIDINA METIL CHALCONA EM MODELO DE ARTRITE INDUZIDO POR DIÓXIDO DE TITÂNIO EM CAMUNDONGOS / Nayara Artero. - Londrina, 2018.  
59 f. : il.

Orientador: Waldiceu Aparecido Verri Junior.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.  
Inclui bibliografia.

1. Inflamação - Tese. 2. Artrite - Tese. 3. Prótese - Tese. 4. Hesperidina metil chalcona - Tese. I. Verri Junior, Waldiceu Aparecido. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

NAYARA ANITELLI ARTERO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-INFLAMATÓRIO DA  
HESPERIDINA METIL CHALCONA EM MODELO DE ARTRITE  
INDUZIDO POR DIÓXIDO DE TITÂNIO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Waldiceu A. Verri Jr.  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Andressa de Freitas Mendes Dionísio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Fábio Henrique Kwasniewski  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de Fevereiro de 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois sem Ele, nada seria possível.

Aos meus pais, por todo suporte, confiança e amor inigualável. Meu eterno carinho e gratidão. Amo vocês.

Ao meu namorado Vitor, que se fez presente em todos os momentos, mesmo com a distância. Agradeço por toda paciência, amizade e amor.

À minha família, em especial meus irmãos Luis Eduardo e João Pedro, avós e tios, por estarem comigo mesmo distante, apoiando e acreditando em mim.

Agradeço em especial minhas primas, mas acima de tudo amigas, Mariana Artero Ferreira e Maria Tereza Artero Prado Dantas, por todas as conversas, risadas e lágrimas. Com a amizade e o amor, os obstáculos se tornam mais leves.

À minha amiga Milene Roldão de Souza, pelo apoio, amizade e carinho durante todos esses anos. Levarei nossa amizade para toda vida.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Waldiceu Aparecido Verri Junior, pela oportunidade, paciência e confiança. Serei eternamente grata.

À banca examinadora escolhida com carinho, pela dedicação e contribuição essencial para este trabalho.

A todos meus amigos de laboratório, que não mediram esforços para ajudar, tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Vocês são inexplicáveis.

Agradeço em especial minhas amigas de laboratório, Marília Manchope e Rafaela Vicentini, por toda disponibilidade, ajuda e amizade. Agradeço imensamente pela contribuição profissional e pessoal.

E por fim, porém não menos importante, agradeço a Universidade Estadual de Londrina e o Hospital Universitário, por todo suporte e contribuição.

*Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica esta informação.*

Carl Sagan

NAYARA, Anitelli Artero. **Avaliação do efeito analgésico e anti-inflamatório da hesperidina metil chalcona em modelo de artrite induzido por dióxido de titânio em camundongos.** 2018. 56 f. Dissertação ( Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

## RESUMO

Doenças auto-imunes, inflamatórias e infecciosas podem levar à destruição das superfícies ósseas que compõem as principais articulações, levando a artrite. Assim, muitos pacientes correm o risco de ter que substituir as articulações, através do procedimento de artroplastia (substituição de tecido por próteses), o que pode desencadear uma resposta inflamatória crônica. O dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) é destaque entre os biomateriais utilizados para a confecção de próteses. Infelizmente, os biomateriais utilizados podem desencadear uma resposta imune no tecido periprotético, levando a falência da artroplastia. Os flavonoides pertencem a uma grande classe de compostos polifenólicos naturais. A estrutura polifenólica confere atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Dentre eles, a hesperidina metil chalcona (HMC) demonstrou efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e antioxidantes na artrite crônica induzida por  $\text{TiO}_2$ . Os camundongos foram tratados com HMC (10, 30, 100 e 300 mg/ Kg, intraperitoneal [i.p.]), a partir de 24 h após injeção intra-articular de 3 mg/ articulação de  $\text{TiO}_2$  para induzir artrite crônica. Aqui, demonstramos que HMC inibiu a hiperalgesia e o edema articular induzido por  $\text{TiO}_2$ , o recrutamento de leucócitos, o estresse oxidativo ( $\text{gp91}^{\text{phox}}$ , redução de NBT, GSH e TBARS), a degradação de proteoglicanos da patela e modulou a expressão de mRNA de RANKL e OPG na artrite crônica. Estes efeitos foram alcançados sem induzir danos renais (níveis plasmáticos de uréia e creatinina), hepáticos (níveis plasmáticos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)), ou gástricos (atividade mieloperoxidase). Assim, o tratamento com HMC é uma abordagem farmacológica concebível para a resposta inflamatória asséptica desencadeada por prótese acompanhada de erosão da cartilagem. Esses resultados demonstram o potencial terapêutico da HMC na redução da dor e dano inflamatório associado ao modelo de artrite induzida por  $\text{TiO}_2$ .

**Palavras-chave:** Inflamação. Hesperidina metil chalcona. Dióxido de titânio. Próteses. Artrite.

NAYARA, Anitelli Artero. **Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effect of methyl chalcone hesperidin in titanium dioxide induced arthritis model in mice.** 2018. 56 pp. Dissertation (Master in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

## ABSTRACT

Inflammatory, autoimmune, and infectious diseases can lead to destruction of bone surfaces that make up the major joints, leading to arthritis. Thus, many patients are at risk of having to replace the joints, through the procedure of arthroplasty (tissue replacement by prostheses), which can trigger a chronic inflammatory response. Among the biomaterials used for prostheses, titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) has been highlighted. However, adverse responses to the biomaterials used in the composition of orthopedic prostheses can generate stimulation of cells in the peri-prosthetic tissue through particles that result from the wear of the prosthesis, causing an aseptic inflammatory response. Flavonoids belong to a large class of natural polyphenolic compounds and are recognized as having anti-inflammatory and antioxidant activities. Among them, hesperidin-methyl-chalcone (HMC) demonstrated antioxidant effects in *in vitro* studies and decreased NFκB expression. The mechanical hyperalgesia and edema were evaluated by a digital analgesimeter and pachymeter, respectively. Total leukocytes were counted in the Neubauer chamber and slides were made for the differential polymorphonuclear and mononuclear counts. Colorimetric assays were used to evaluate myeloperoxidase activity (MPO), oxidative stress (GSH, lipoperoxidation, and superoxide anion production), and toxicity. The mRNA expression was determined by RT-qPCR for the *gp91<sup>phox</sup>*, *Rankl* and *Opg* genes. The toxicity of HMC treatment in inducing gastric and renal damage was assessed by the activity of MPO in the stomach, Ast, Alt, urea and creatinine. On the first day after intra-articular stimulation with TiO<sub>2</sub>(3 mg/10μL/joint), the animals were treated with HMC (10, 30, 100 and 300mg/ Kg intraperitoneally [ip]). Mechanical hyperalgesia and edema were measured 1, 3, 5, 7, and 24 h after treatment, and every two days until the 30<sup>th</sup> day. The dose of 100 mg/Kg inhibited mechanical hyperalgesia, edema, migration of total leukocytes (polymorphonuclear and mononuclear), degradation of proteoglycans, oxidative stress (*gp91<sup>phox</sup>* mRNA expression, superoxide anion production and lipoperoxidation) and modulated the *Rankl/Opg* system. These results demonstrate the therapeutic potential of flavonoid HMC in reducing pain and inflammatory damage associated with TiO<sub>2</sub>-induced arthritis model.

**Key-words:** Inflammation. Hesperedin methyl chalcone. Titanium dioxide. Prosthesis. Arthritis

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
EROs	Espécies reativas do oxigênio
NO	Óxido nítrico
HMC	Hesperedina metil chalcona
TiO <sub>2</sub>	Dióxido de titânio
NPs	Nanopartículas
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
NF $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear $\kappa$ B
TNF	Fator de necrose tumoral $\alpha$
RANKL	Ligante receptor ativador do NF $\kappa$ B
OPG	Osteoprotegerina
SNC	Sistema nervoso central
EDTA	Etilenodiaminotetracético
NBT	Nitroblue tetrazolium
TBARS	Peroxidação lipídica
MPO	Mieloperoxidase
DMMB	Dimetilmetileno
GAG	Glucosaminoglicano
HTAB	Brometo de hexadecil trimetilamônio
DMSO	Dimeltisulfoxido
AST	Minotransferase de aspartate
ALT	Aminotransferase de alanina
GSH	Glutaciona reduzida

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	8
Inflamação .....	8
Dor inflamatória.....	9
Modelo de artrite crônica induzido por TiO <sub>2</sub> .....	10
Hesperidina Metil Chalcona .....	13
<b>2 Objetivos</b> .....	15
Objetivo geral .....	15
Objetivos específicos .....	15
<b>3 Materiais e métodos</b> .....	16
<b>4 Artigo para publicação</b> .....	22
<b>5 Conclusão</b> .....	49
<b>6 Referências</b> .....	50

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- Inflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica protetora do organismo, a partir da ativação do sistema imune em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo lesões teciduais e infecções (1), (2). O romano Aulus Cornelius Celsus no século I d.C. foi o primeiro a descrever os quatro principais sinais de inflamação: rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), calor e dor (3). O quinto sinal foi adicionado por Rudolf Virchow, conhecido como perda de função (*functio laesa*) (4). A resposta inflamatória controlada é um evento favorável (na proteção contra infecções, por exemplo), porém quando exacerbada pode tornar-se prejudicial ao organismo. Sendo assim, o estado inflamatório patológico é assumido como tendo uma contraparte fisiológica (5). As consequências associadas à inflamação tais como recrutamento de leucócitos, edema e dor são importantes para proteção dos tecidos, porém a inflamação excessiva e contínua leva a dano tecidual, dor crônica e disfunção orgânica. Sendo assim, o conhecimento dos mecanismos de inflamação é primordial para tratar doenças inflamatórias, promover a proteção do hospedeiro e a homeostase (6).

Quando a inflamação aguda é bem sucedida na eliminação do patógeno, a reação diminui. Porém, se a resposta não conseguir eliminar os invasores, ele pode avançar para uma fase crônica. A inflamação crônica é uma inflamação de duração prolongada (semanas ou meses) em que a inflamação, lesão tecidual e tentativas de reparo coexistem em diferentes combinações. Pode seguir a partir da inflamação aguda ou pode começar de forma insidiosa, como uma resposta de baixo grau sem qualquer manifestação de reação aguda cronologicamente anterior (7).

Geralmente, o processo inflamatório se inicia após o reconhecimento de DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos), ou PAMPs (Padrões Moleculares Associados à Patógenos) por PRRs (Receptores de Reconhecimento de Padrões) (como TLR, NLR e RLR, por exemplo) presentes em células residentes, principalmente macrófagos e mastócitos. Esse reconhecimento tem como resultado final a ativação do NF- $\kappa$ B, e consequente produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (5, 8). As aminas vasoativas, (mediadores como serotonina e histamina), são responsáveis pela elevação do calibre do leito vascular e consequente aumento no fluxo sanguíneo local. Logo após, ocorre aumento na permeabilidade vascular e extravasamento de líquidos ricos em proteínas que colaboram para formação do edema. Em consequência, ocorre a lentificação do fluxo sanguíneo (estase). A evolução do processo de estase modifica as condições hemodinâmicas e

promovem a marginação leucocitária, em especial de neutrófilos (4),(9),(10). O recrutamento de neutrófilos e a atividade das células durante a inflamação são importantes para a resposta do hospedeiro contra infecções e reparação tecidual (6). A resolução natural da inflamação abrange processos bioquímicos ativos e altamente regulados, evento que possibilita o retorno do tecido à homeostase (11). A transformação do padrão de mediadores lipídicos pró-inflamatórios para anti-inflamatórios, como por exemplo as lipoxinas (pertencentes a classe de mediadores lipídicos pró-resolução), é crucial para a transição do processo inflamatório para a resolução. As lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos e estimulam o recrutamento de macrófagos não flogísticos para o foco inflamatório, que atuam na eliminação dos corpos apoptóticos e dão início ao remodelamento tecidual, o que leva ao retorno da homeostase (12), (13).

Dentre os mediadores inflamatórios, existem aqueles que são produzidos por células e aqueles que são produzidos a partir de elementos presentes no plasma. Os mediadores derivados da atividade celular são: serotonina, histamina, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROs) e mediadores lipídicos (prostanóides, leucotrienos, fator de ativação plaquetária e lipoxinas)(6).Aqueles derivados de componentes presentes no plasma incluem bradicinina, membros do sistema complemento e da cascata de coagulação (4).

## 1.2- Dor inflamatória

A dor é um sintoma presente na maioria das doenças inflamatórias, podendo até mesmo levar ao desenvolvimento da depressão ou perda da função de tecidos ou órgãos afetados. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor é uma experiência emocional e sensorial desagradável que está relacionada a lesões potenciais ou reais. A dor crônica pode ser classificada como localizada, regional ou generalizada, e sua alta prevalência na população geral parece aumentar com a idade (15). A dor inflamatória, por exemplo, se origina quando ocorre interação entre o tecido lesado e os neurônios sensoriais periféricos (por exemplo, na dor aguda ou articular)(16),(17).De fato, a dor é um importante mecanismo adaptativo de alerta para o indivíduo sobre um risco potencial à integridade de seu organismo (18). Porém, esta pode exceder o seu papel de alertar o indivíduo e tornar-se crônica (19), levando a redução da qualidade de vida do paciente.

A nocicepção da dor inclui os mecanismos pelos quais os estímulos nocivos são detectados pelo sistema nervoso periférico, codificados, transferidos e

inconscientemente tratados pelo sistema nervoso. A detecção é realizada por transdutores moleculares específicos sustentados por neurônios nociceptivos, cujos corpos celulares estão agrupados na raiz dorsal ou nos gânglios trigeminais (21). Os nociceptores são conhecidos como um subconjunto de neurônios sensoriais que medeiam à dor e inervam densamente os tecidos periféricos, incluindo as articulações, a pele, o trato gastrointestinal e as vias respiratórias. Existem vários subconjuntos de nociceptores que podem responder a estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. Devido à capacidade do sistema nervoso para disseminar sinais dentro de milissegundos, os nociceptores estão situados idealmente para serem os primeiros a responderem a patógenos e lesões nos tecidos (22).

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabólitos reativos, os chamados oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (EROs), e sua eliminação é realizada através de mecanismos de proteção conhecidos como antioxidantes (23). As EROs são geradas durante o processo de fagocitose pelos neutrófilos e macrófagos. Esse processo ocorre quando há a ativação da NADPH oxidase, que ao reduzir o  $O_2$  dá origem  $O_2^{\cdot-}$ , e então, levando a geração de outras EROs pela dismutação espontânea, através da reação com espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou por meio da reação com enzimas presentes nos neutrófilos, (por exemplo, mieloperoxidase [MPO]). As EROs também são produzidas no local da inflamação, o que contribui para a manifestação da dor por interagirem diretamente com neurônios nociceptores (24).

### 1.3- Modelo de Artrite Crônica Induzido por $TiO_2$

Diversas condições de origem inflamatória, auto-imune, infecciosa ou traumática podem causar destruição das superfícies ósseas que compõem as principais articulações responsáveis pelos movimentos de grande amplitude do corpo, levando à artrite. Seguindo este raciocínio, é de se esperar que muitos pacientes no mundo necessitem de procedimentos que realizem a substituição total ou parcial da articulação (25).

Devido ao avanço tecnológico, foi possível a realização de intervenções médicas para possibilitar uma melhora na qualidade de vida de pacientes afetados com diversas doenças; dentre elas o uso de próteses para substituir completamente

ou parcialmente algum componente do corpo. Em relação às articulações, encontramos um procedimento conhecido como artroplastia – substituição total ou parcial da articulação por próteses (26), necessária quando ocorre destruição nas articulações acometidas. As condições clínicas que conduzem a artroplastia incluem osteoartrite, artrite inflamatória (como artrite reumatóide), osteonecrose, displasia articular, artrite pós-traumática e tumores(27). Sendo assim, é necessário que os materiais protéticos suportem as forças aplicadas na prótese(28). Quando um implante é colocado em um ambiente fisiológico, os íons metálicos são liberados, exercendo efeitos locais e sistêmicos que podem vir a se tornar nocivos (29). Um exemplo de efeito nocivo, derivado deste procedimento ocorre no ambiente pró-inflamatório, onde essas partículas metálicas estimulam a osteoclastogênese - que ocorre em resposta à liberação de RANKL (membro da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral – TNF), bem como pronunciada ativação de osteoclastos. Em conjunto, estes fatores promovem a reabsorção óssea e consequente progressão do processo de osteólise (25), (30), (31). Com relação à reabsorção óssea, ela é realizada através de uma sequência de eventos que se resume em: migração de osteoclastos para o local de reabsorção, seguida da sua ligação às superfícies ósseas, da polarização e formação de um vacúolo extracelular selado, na qual os prótons (íons H) e as enzimas (principalmente a catepsina K) são secretados pelos osteoclastos para dissolver o mineral ósseo e degradar a matriz orgânica de colágeno (32). Deste modo, a osteólise pode interferir na artroplastia e de fato é a causada 10-15% de falha nas substituições articulares, sendo então a osteólise a maior causa de insucesso (33). A incidência de osteólise pode chegar a alcançar até 40%, segundo estudos prévios (33), (34).

Um aspecto crítico de respostas adversas aos biomateriais usados na construção de componentes protéticos ortopédicos é a estimulação de células no tecido periprotético por partículas resultantes do desgaste das próteses, o que leva a uma resposta inflamatória asséptica. O tecido periprotético serve como uma interface entre a prótese e o osso e contém células da linhagem monócito/macrófago (31), (25). Assim, pequenas partículas são rapidamente fagocitadas por células residentes da membrana periprotética. Substâncias como plásticos e metais são resistentes à destruição enzimática, e essas partículas provenientes do desgaste das próteses perturbam a função biológica de degradação da fagocitose, que é responsável por ingerir os restos celulares e outros detritos dos tecidos (35). Estudos *in vitro* indicaram que uma forte ativação de osteoclastos, macrófagos, monócitos e células dendríticas são observadas após a incubação com restos de desgaste (25).

O dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) é um pó branco inodoro (36), comumente usado em uma diversidade de produtos como pinturas, revestimentos, cerâmicas, protetores

solares e também como aditivos em produtos farmacêuticos, corantes alimentares(37)e por fim em próteses (39). O  $\text{TiO}_2$  é altamente insolúvel, termicamente estável e não inflamável. Devido ao seu excelente desempenho óptico e propriedades elétricas, o  $\text{TiO}_2$  possui uma ampla gama de aplicações. Considerado fisiologicamente inerte, também representa pouco risco para os seres humanos (40).

Por outro lado, pesquisadores demonstraram os efeitos pró-inflamatórios de nanopartículas (NPs) de  $\text{TiO}_2$  *in vitro* em células pulmonares e *in vivo* após instilação pulmonar, revelando que as NP de  $\text{TiO}_2$  também podem penetrar nos tecidos humanos através da ingestão ou por vias dermais (41), (42). Wang e colaboradores(43) mostraram que  $\text{TiO}_2$  pode ser transportado para outros tecidos e órgãos após a absorção pelo trato gastrointestinal como fígado, baço, rins e tecidos pulmonares.

Com relação aos estudos feitos com sensibilidade ao metal, a ativação do sistema imune após a implantação foi observada em resposta ao próprio implante metálico ou a detritos particularmente gerados pelo implante (44). Gonçalves e Girard,mostraram que as NP de  $\text{TiO}_2$  são capazes de atrair e conseqüentemente gerar influxo de neutrófilos, assim como levar à produção local de diversos mediadores pró-inflamatórios, incluindo diversas quimiocinas, como a MIP-1 $\beta$ , no modelo *in vivo* de bolsa de ar murino (36). Reforçando estes dados, a administração de NP de  $\text{TiO}_2$  induziu inflamação crônica com conseqüente aumento dose-dependente da concentração de citocinas do padrão Th1, quimiocinas e aumento dos níveis de proteínas inflamatórias como MIP e MCP, associado a formação de granuloma (45). A exposição às NP de  $\text{TiO}_2$  pode instigar o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). O excesso de estresse oxidativo pode atacar macromoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos, conduzindo uma interferência nos caminhos de transdução de sinal e modulação de fatores de transcrição (por exemplo, fator nuclear  $\kappa\text{B}$  e proteína ativadora-1) (37). A comprovação de que as NP de  $\text{TiO}_2$  de fato geram artrite, ocorreu em um caso clínico mostrado por Dorner e colaboradores(44) em 2006, onde uma paciente sem histórico de artrite familiar desenvolveu artrite relacionada a uma prótese de  $\text{TiO}_2$  e vanádio.

De acordo com os dados acima, as NP de  $\text{TiO}_2$  podem levar a indução de estresse oxidativo, citotoxicidade, influxo de neutrófilos, inflamação crônica, necrose e formação de artrite. Recentemente em nosso laboratório foi padronizado o modelo de artrite induzido por  $\text{TiO}_2$ , que mostrou induzir hiperalgesia articular, edema, estresse oxidativo, liberação de citocinas pró-inflamatórias – como  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6 – e ativação da via de sinalização RANKL/OPG. Neste caso, pode ocorrer a destruição da cartilagem e o aumento na reabsorção óssea, levando à destruição articular (46).

Portanto, a artrite crônica induzida por  $TiO_2$  é um modelo promissor para a medicina, proporcionando a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares relacionado ao processo inflamatório asséptico mediado por partículas liberadas no espaço periprotético.

#### 1.4- Hesperidina metil chalcona

Em 1930 foi isolada uma substância da laranja, que acreditavam ser uma classe nova de vitaminas (vitamina P). Mais tarde, ficou claro que aquela substância (rutina) era na verdade um flavonoide. Hoje em dia já são mais de 4000 variedades de flavonoides identificados (47). Os flavonoides são amplamente encontrados na natureza e pertencem ao maior grupo de produtos naturais já conhecidos. Além de seus papéis nas plantas, os flavonoides são componentes importantes na dieta humana, sendo encontrados em frutas, vegetais, sementes, nozes, grãos, especiarias e bebidas como vinho ou cerveja (48). Diferente de outros flavonoides, que são encontrados em uma ampla gama de alimentos, a sua subclasse conhecida como flavanonas, está presente em nossa dieta quase que exclusivamente em frutas cítricas e em algumas ervas aromáticas como a hortelã. As frutas cítricas ou sucos cítricos são produtos consumidos no mundo todo, contendo uma grande quantidade de flavanonas (49).

O sistema imunológico pode ser modificado tanto por dieta quanto por agentes farmacológicos, poluentes ambientais e produtos químicos que ocorrem naturalmente. Certos componentes pertencentes aos flavonoides afetam significativamente a função do sistema imunológico e células inflamatórias(50). A solubilidade pode desempenhar um papel importante na eficácia terapêutica dos flavonóides. A baixa solubilidade dos flavonóides em água muitas vezes apresenta um problema para suas aplicações medicinais. Assim, o desenvolvimento de flavonoides semi-sintéticos, solúveis em água, por exemplo, se tornou necessário (51).

Dentre os flavonoides, encontra-se a hesperidina metil chalcona (HMC). A Hesperidina foi descoberta pela primeira vez em 1827, por Lebreton, mas não em um estado puro e tem estado em contínua investigação desde então (59). A HMC ( $C_{29}H_{36}O_{15}$ ) é um composto derivado da hesperidina, metilado e de alta solubilidade e foi descrita como efetiva no tratamento de doenças vasculares quando aliada a outros compostos, tais como a vitamina C e extrato de *Ruscus aculeatus*(52). Garg e colaboradores demonstraram em 2001 que a Hesperidina possui atividade semelhante à vitamina e pôde diminuir a permeabilidade capilar (Vitamina P), vazamento e

fragilidade. Também demonstrou propriedades antioxidantes, antiinflamatórios, anticancerígenas e antialérgicas (61). Devido a essas propriedades e sua significativa atividade *in vivo*, os flavonoides têm sido considerados como promissores candidatos a uma nova categoria de drogas anti-inflamatórias.

A aplicação tópica desta molécula (HMC) em camundongos sem pelo, promove efeitos protetores contra radiação UVB, que incluem reduzir o edema da pele, migração de neutrófilos, produção de citocinas ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  e  $\text{IL-10}$ ), e estresse oxidativo (55). Também mostrou propriedades anticancerígenas e antialérgicas(56). A HMC desempenha um papel importante na proteção de DNA, proteínas e tecidos contra danos causados por fatores intrínsecos (como oncogênese) e extrínsecos (como radiação, inflamação e toxinas) (54). Sieve em 1952 demonstrou em um experimento com camundongos machos e fêmeas que a hesperidina na forma fosforilada (PH) não apresentou toxicidade, tanto para o organismo quanto para os tecidos, sendo facilmente assimilada (60). Devido às características relacionadas aos mecanismos de ação aqui apresentados, e devido ao fato de que não existem dados na literatura que demonstrem os efeitos da HMC no processo inflamatório induzido por  $\text{TiO}_2$ , avaliar os efeitos da HMC no modelo de artrite induzida por  $\text{TiO}_2$  foi o objetivo do presente trabalho.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo geral:

Analisar o efeito analgésico e anti-inflamatório da Hesperidina metil chalcona (HMC) em modelo de artrite induzido por  $\text{TiO}_2$ .

### 2.2- Objetivos específicos:

- Analisar o efeito da HMC na hiperalgesia mecânica e edema induzidos por  $\text{TiO}_2$  em modelo de artrite crônica;
- Avaliar o efeito da HMC no recrutamento de leucócitos para a cavidade articular do joelho induzido por  $\text{TiO}_2$  em modelo de artrite crônica;
- Investigar o efeito da HMC no ensaio quantitativo de proteoglicanos;
- Avaliar o efeito da HMC no estresse oxidativo induzido por  $\text{TiO}_2$  em modelo de artrite crônica;
- Analisar o efeito do tratamento crônico com HMC em modelo de artrite crônica induzido por  $\text{TiO}_2$ ;
- Investigar o efeito da HMC no sistema RANKL/OPG em modelo de artrite crônica induzido por  $\text{TiO}_2$ .

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

Na primeira parte dos experimentos, os animais (n = 6 por grupo de experimento) foram submetidos a uma curva de dose-resposta do tratamento com HMC. Os animais foram estimulados com injeção intra-articular (i.a) com 3 mg de TiO<sub>2</sub> (suspensão em 10 µL de solução salina estéril 0,9%) por joelho de acordo com padronização de Borghi e colaboradores(46). A hiperalgesia mecânica e edema foram avaliados 24 h após injeção de TiO<sub>2</sub> para avaliar a indução do modelo de artrite. Posteriormente, após 24 h, os animais foram tratados com HMC (10, 30, 100 e 300 mg/Kg via i.p) e a hiperalgesia mecânica e o edema foi avaliado a partir de 1, 3, 5, 7 e 24 horas após o tratamento com HMC no primeiro dia (46). Depois disso, a hiperalgesia mecânica e o edema foram avaliados a cada 2 dias após o tratamento com HMC até o 30º dia. Imediatamente após as medidas no 30º dia, os animais foram anestesiados e eutanasiados, e lavou-se as cavidades articulares do joelho. Essas amostras foram colhidas para a avaliação da migração de leucócitos. A dose de HMC de 100 mg/Kg foi escolhida com base nos resultados de recrutamento de leucócitos e hiperalgesia mecânica. As amostras de estômago e sangue foram coletadas para avaliar a atividade da mieloperoxidase do estômago (MPO) e o sangue foi coletado para a dosagem de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e uréia e creatinina. A articulação do joelho foi colhida para avaliar o estresse oxidativo (anion superóxido), níveis de recuação de nitroblue tetrazolium (NBT), peroxidação lipídica (TBARS), glutatona reduzida (GSH), expressão de mRNA de gp91<sup>phox</sup> [RT-qPCR] e via de sinalização RANKL/OPG (RT-qPCR). As patelas foram coletadas para avaliação quantitativa de proteoglicanos.

#### 3.2- Animais

Foram utilizados camundongos da raça Swiss machos pesando entre 20-25 g do biotério da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico padrão com água e comida *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12/12h e temperatura controlada (21°C). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia da Universidade Estadual de Londrina por pelo menos dois dias antes dos experimentos. Os métodos de manipulação e cuidado dos animais estavam de acordo com as diretrizes da Associação Internacional de Estudos sobre Dor (IASP) e foram aprovados pelo Comitê de Pesquisa e Ética da Universidade Estadual de Londrina (nº 20466.2015.58). Todos os experimentos foram realizados duas vezes, o que foi essencial para demonstrar a reprodutibilidade e replicabilidade

dos dados.

### 3.3- Compostos do teste

Os compostos utilizados neste estudo foram solução salina (NaCl 0,9%, Frenesius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brasil), sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Synth, Diadema, SP, Brasil) e hesperidina metil chalcona (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). O dióxido de titânio foi adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil) e o tamanho da partícula foi  $<1 \mu\text{m}$  com uma média de 862,2 nm, conforme determinado pela análise de distribuição de tamanho (Malvern Instruments Ltd, UK). Imediatamente antes das injeções, o  $\text{TiO}_2$  foi suspenso em solução salina estéril (10  $\mu\text{L}$ ) e a hesperidina metil chalcona foi diluída em solução salina estéril. A HMC (10, 30, 100 e 300 mg/kg) e a solução salina foram administradas por via intra-peritoneal (i.p) num volume de 200  $\mu\text{L}$  por animal.

### 3.4- Seção Experimental

**Avaliação da Hiperalgisia Mecânica Articular:** A hiperalgisia mecânica articular da articulação femorotibial foi avaliada como já descrito pela literatura(57). Resumidamente, em uma sala silenciosa, os animais foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico (12 x 10 x 17 cm) com um piso de grade de arame, 15 a 30 minutos antes do teste de adaptação ambiental. A aplicação de força foi realizada apenas quando os animais estavam com as quatro patas na grade, não exibiam movimentos exploratórios ou defecação, e não estavam descansando sobre as patas. Um teste eletrônico de medição de pressão constituído por um transdutor de força de mão equipado com uma ponta de polipropileno (Anestesiômetro eletrônico von Frey; Insight, Ribeirão Preto, SP) foi utilizado para avaliar a nocicepção articular mecânica. Para este modelo, uma ponta grande (4,15  $\text{mm}^2$ ) foi adaptada à sonda. Uma força perpendicular crescente foi aplicada na área central da superfície plantar da pata traseira para induzir um movimento de flexão da articulação femorotibial seguida de retirada da pata. Um espelho inclinado abaixo da grade forneceu uma visão clara da pata traseira. O aparelho eletrônico de medição de pressão registrou automaticamente a intensidade da força aplicada quando a pata foi retirada. O teste foi repetido até as

medidas consistentes subsequentes (isto é, a variação entre essas medidas foi inferior a 1 g). O limiar mecânico induzido pela flexão foi expresso em gramas(g).

**Avaliação do edema articular:** O edema articular da articulação femorotibial foi avaliado através de medições dos diâmetros transversais utilizando um calibre (Digimatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japão). Os valores de espessura da articulação femorotibial foram expressos como a diferença entre os diâmetros medidos antes (valor basal) e após a injeção intra-articular  $\text{TiO}_2$  em milímetros (mm).

**Avaliação da migração de leucócitos:** As contagens total e diferencial de leucócitos recrutados para o espaço intra-articular foram determinadas como descrito na literatura (27). Resumidamente, as cavidades da articulação do joelho foram lavadas com solução salina contendo ácido etilendiaminotetracético (EDTA), que foi recuperada para avaliar a contagem de células total e diferencial. As contagens de células totais foram realizadas na câmara de Neubauer utilizando a solução Turk e as contagens de células diferenciais (100 células por campo) foram coradas com o kit panoptic (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) sob microscopia óptica (Olympus CX31RTSF, Tóquio, Japão). Os resultados foram expressos como leucócitos totais, células polimorfonucleares e mononucleares (células  $\times 10^3$ /joelho).

**Ensaio de Toxicidade no estômago (mieloperoxidase):** Realizado através da atividade de mieloperoxidase (MPO), usando um ensaio colorimétrico, considerando-se um marcador confiável da migração de neutrófilos para os tecidos. As amostras do estômago foram coletadas em tampão  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadecil trimetilamônio (HTAB) e mantidos a  $-86^\circ\text{C}$  até o uso. As amostras congeladas foram homogeneizadas usando um tecido turrax (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK, EUA), centrifugado (2 min, 16,000g,  $4^\circ\text{C}$ ) e o sobrenadante resultante foi analisado usando um espectrofotômetro (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finlândia) para determinação da atividade MPO a 450 nm. A atividade MPO das amostras foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos. Em resumo, 15  $\mu\text{L}$  de amostra foram misturados com 200  $\mu\text{L}$  de tampão de fosfato 50 mM (pH 6,0), contendo 0,167 mg / mL de dicloridrato de O-dianisidina e 0,0005% de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram apresentados como atividade MPO (número de neutrófilos  $\times 10^6$ /mg de tecido).

**Ensaio de Toxicidade hepática e renal:** O sangue foi colhido em microtubos contendo 50  $\mu\text{L}$  de EDTA anticoagulante (5.000 UI / mL) e centrifugados (200 g, 10

min, 4°C) e o plasma foi separado. Para determinar as atividades enzimáticas de AST e ALT como indicadores de hepatotoxicidade e níveis de ureia e creatinina como indicadores de nefrotoxicidade, as amostras de plasma foram processadas de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstico S. A., Brasil). Os resultados foram apresentados como U/mL (AST e ALT) ou mg/dL (ureia e creatinina) do plasma.

**Ensaio da Glutathiona Reduzida (GSH):** Amostras de articulação foram coletadas e imediatamente homogeneizadas com Tissue-Tearor (Biospec®) em tampão EDTA (4 mL, 0,02 M). Homogenato (2,5 mL) foi tratado com 2 mL de H<sub>2</sub>O Milli Q com 0,5 mL ácido tricloroacético 50%. Após 15 min, o homogenato foi centrifugado (1500 g, 15 min, 4°C), e 1 mL do sobrenadante foi adicionado 2 mL de solução contendo 0,4 M Tris (pH 8,9) e 50 µL de DTNB. Após 5 min, foi feita a leitura (Multiskan GO Espectrofotômetro de microplaca, ThermoScientific, Vantaa, Finland) em 412 nm. Resultados foram apresentados como nmol de GSH por mg de proteína (61).

**Redução de nitrogênio do tetrazolium:** A produção de anion superóxido foi determinada pela redução do corante redox Nitroblue tetrazolium (NBT) . O tecido congelado da articulação do joelho de camundongos foi homogeneizado com 500 µL de solução salina com ultra-turrax (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK , EUA), centrifugados (10 min, 3.300g, 4°C) e 50 µL do homogeneizado foi colocado em placa de 96 poços, seguido da adição de 100 µL de solução nitro-azul de tetrazólio (1 mg/ mL) (NBT , Sigma) e mantida a 37°C em banho quente durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o formatano precipitado foi então solubilizado e adicionando 120 µL de KOH 2 M e 120 µL de dimeltisulfoxido (DMSO). A densidade óptica foi medida usando um leitor de espectrofotômetro de 96 microplacas (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermoscientific, Vantaa, Finlândia) a 600 nm. Os níveis de redução de NBT foram corrigidos pela concentração total de proteína e os resultados foram apresentados como redução de NBT (OD / mg de proteína).

**Avaliação da peroxidação lipídica:**A peroxidação lipídica da articulação do joelho foi avaliada pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) . Para este ensaio, adicionou-se 10% de TCA ao homogeneizado e centrifugou-se a mistura (3 min, 1000 g, 4 ° C) para precipitar as proteínas. O sobrenadante livre de proteína foi então separado e misturado com TBA (0,67%). A mistura foi mantida em banho-maria (15 min, 100 ° C). O malondialdeído (MDA), um produto intermediário da peroxidação lipídica, foi determinado pela diferença entre a absorvância a 535 e 572 nm usando um

leitor de espectrofotômetro de microplacas. Os TBARS foram corrigidos pela concentração total de proteína e os resultados foram apresentados como TBARS ( $\mu\text{mol}$  de MDA / mg de proteína).

**Determinação quantitativa de proteoglicanos:** As concentrações de proteoglicanos foram determinadas de acordo com HOHMANN e colaboradores (58). Resumidamente, a patela foi cuidadosamente coletada de camundongos e fixada com formaldeído (4%) durante a noite usando um agitador. Posteriormente, a patela foi transferida para uma solução de ácido fórmico (5%) e incubada durante 4 h usando um agitador para descalcificação. Cada amostra de patela foi então colocada em 100  $\mu\text{L}$  de tampão de digestão de papaína constituído por uma suspensão de papaína (5 mg / mL) em PBS isento de cálcio e magnésio, com cisteína 5 mM e EDTA 10 mM, pH 7,4. As amostras foram seladas e incubadas em um recipiente humidificado a 60 ° C durante 16 h. Depois de atingir a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 1000 x g para coletar as gotículas de condensação. Em seguida, colocou-se 50  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes e de soluções de sulfato de condroitina em série (curva padrão, 50-1000 mg / mL) em placas de 96 poços. A solução padrão de sulfato de condroitina também foi incubada com tampão de digestão com papaína. Em seguida, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de uma solução de azul 1,9 dimetilmetileno (DMMB; 50 mg / l, Polysciences, Inc.) a cada poço e o conteúdo de proteoglicano foi determinado por leitura de espectrofotômetro a 525 nm (Espectrofotômetro de microplacas Multiskan GO, ThermoScientific, Vantaa, Finlândia). O sal de sódio de condroitina 6-sulfato da cartilagem de tubarão, um teor de glucosaminoglicano (GAG) foi calculado a partir da curva padrão. A solução de DMMB foi preparada dissolvendo 50 mg de DMMB em 5 ml de etanol e diluindo para um volume de 1000 mL com 0,2% (p / v) de sal de sódio de ácido fórmico (tampão de formiato de sódio, HCOONa), pH 3,5. Todos os reagentes foram adquiridos de Sigma-Aldrich, e os resultados foram apresentados como proteoglicano por miligrama (mg) de tecido.

**RT-qPCR:** As amostras da articulação do joelho foram homogeneizadas no reagente de TRIzol, e o ARN total foi extraído usando o Sistema de Isolamento de RNA Total SV (Promega). A pureza do ARN total foi medida usando um espectrofotômetro (Espectrofotômetro de microplacas Multiskan GO, ThermoScientific, Vantaa, Finlândia) e a razão de absorção de comprimento de onda (260/280) foi entre 1,8 e 2,0 para todas as preparações. A transcrição reversa do ARN total para o cDNA e o qPCR foram realizadas usando o sistema RT-qPCR de Etapa GoTaq® (Promega) e primers

específicos (gp91phox, RANKL e OPG). A reação qPCR foi realizada no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems®). A expressão relativa do gene foi medida utilizando o método comparativo 2- ( $\Delta\Delta Cq$ ). Os iniciadores utilizados foram: gp91phox, sentido: 5'-AGCTATGAGGTGG TGATGTTAGTGG-3', anti-sentido: 5'-CACAATATTTGTACCAGACAGACTTGAG-3'; RANKL, sentido: 5'-CAGAAGATGGCACTCACTGCA-3', anti-sentido: 5'-CACCATCGCTT TCTCTGCTCT-3'; OPG, sentido: 5'-GGAACCCCAGAGCGAAATACA-3', anti-sentido: 5'-CCTGAAGAATGCCTCCTCACA-3'. A expressão do mRNA de Gapdh foi utilizada como gene de referência e os resultados foram expressos como expressão de mRNA (normalizada para Gapdh ).

#### **4- ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO (FOOD AND FUNCTION )**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Dor, Inflamação Neuropatia E Câncer, da Universidade Estadual de Londrina, seguindo as normas da revista Food and Function.

**THE FLAVONOID HESPERIDIN METHYL CHALCONE  
REDUCES TITANIUM DIOXIDE-INDUCED ARTHRITIS  
IN MICE.**

Nayara A. Artero<sup>1</sup>, Marília F. Manchope<sup>2</sup>, Rafaela V. Lone<sup>1</sup>, Ana Carolina Rossaneis<sup>1</sup>,  
Rubia Casagrande<sup>1</sup>, Waldiceu A. Verri Jr<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Ciências de Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina,

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade  
Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

**\*Author for correspondence: Prof. Waldiceu A. Verri Jr, Ph.D.**

Present address: Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de  
Londrina, Rod. Celso Garcia Cid Km480 PR445, CEP 86057-970, Cx Postal 10.011,  
Londrina, Paraná, Brasil. Tel: +55 43 3371 4979. Fax: +55 43 3371 4387. E-mails:  
waverri@uel.br or waldiceujr@yahoo.com.br

## ABSTRACT

Arthritis is induced by inflammatory, autoimmune, and infectious diseases leading to bone surfaced struction at major joints. Arthroplasty is an orthopedic procedure forreplacing a dysfunctional joint with an orthopedic prosthesis restoring joint function. Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is highlight among the biomaterials used for designing prostheses. Unfortunately, biomaterials used might trigger an immune response in the periprosthetic tissue leading arthroplasty failure. Flavonoids belong to a large class of natural polyphenolic compounds. The polyphenolic structure confers antioxidant and anti-inflammatory activities. Among them, hesperidin methyl chalcone (HMC) demonstrated analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant effects inhibited TiO<sub>2</sub>-induced chronic arthritis. Mice were treated with HMC (10, 30, 100 e 300 mg/kg, intraperitoneal [i.p.] ), treatment starting 24 h after intra-articular injection of 3 mg/joint of TiO<sub>2</sub> to induce chronic arthritis. Herein, we demonstrated that HMC treated inhibited TiO<sub>2</sub>-induced articular mechanical hyperalgesia and edema, leukocyte recruitment, oxidative stress (gp91<sup>phox</sup>, Reduced glutathione (GSH),NBT reduction, TBARS), patella proteoglycan degradation, and modulates the mRNA expression of RANKL and OPG in chronic arthritis. These effects were achieved without induced renal (urea and creatinine plasma levels), hepatic (AST/ ALT) and gastric damage (myeloperoxidase activity). Thus, HMC treatment is a conceivable pharmacological approach to prosthesis-trigger and aseptic inflammatory response accompanied to cartilage erosion. These results demonstrate the therapeutic potential of flavonoid HMC in reducing pain and inflammatory damage associated with TiO<sub>2</sub>-induced arthritis model.

Key-words:Inflammation, Hesperedin methyl chalcone, titanium dioxide, prosthesis, arthritis.

## 1- Introduction

Arthritis is induced by inflammatory, autoimmune, and infectious diseases leading to bone surfaces destruction at major joints. Arthroplasty is a surgical procedure that performs totally or partial a dysfunctional joint replaces to prosthesis.<sup>1</sup> It is expected that many patients' suffering from osteoarthritis, inflammatory arthritis (such as rheumatoid arthritis (AR), post-traumatic arthritis and tumors<sup>2</sup> might need performing joint replacement.<sup>3</sup> Thus, arthroplasty is an important procedure for terminal stages of arthritis.<sup>4</sup> Despite arthroplasty importance, about 10-15% of joint replacement failure and might reach up to 40% according to previous studies.<sup>5,6</sup> Arthroplasty failure can be caused by infection and aseptic loosening.<sup>7</sup> Regarding on aseptic loosening, debris released by prosthesis biomaterials inducing osteolysis causing arthroplasty failure.<sup>7,8,9</sup> The periprosthetic tissue is an interface between the prosthesis and bone containing cells from the monocyte/ macrophage lineage.<sup>10,8</sup> Wear debris released from prostheses activated immune cells in periprosthetic tissue leading to an aseptic inflammatory response. Wear debris are rapidly phagocytosed by resident cells producing receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL),<sup>8</sup> tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6<sup>11</sup>, and reactive oxygen species (ROS).<sup>12,13</sup> Osteoclast activation and differentiation are induced by this microenvironment activate inducing bone resorption in periprosthetic tissue.<sup>8,14</sup> This scenario of bone resorption culminates with prosthesis rejection requiring a surgery revision.<sup>15</sup>

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is a white powder<sup>16</sup> commonly used in several products such as additives in pharmaceuticals, dyes, and orthopedic prostheses.<sup>17</sup> Despite the variety of applicability of TiO<sub>2</sub>, such as sunscreen, nanoparticles (NPs) penetrated the stratum corneum of the skin causing damage.<sup>18</sup> In agreement, TiO<sub>2</sub>-induced reactive oxygen species (ROS) and cytotoxic in human epiderm cells.<sup>19</sup> Moreover, TiO<sub>2</sub> induced a leukocyte recruitment in mice lungs with MIP-1 $\alpha$ , KC, TNF $\alpha$  and IL- $\beta$ <sup>20</sup>. In addition, TiO<sub>2</sub>-induced a prolonged and immediate reactive oxygen species (ROS) in microglia *in vitro*.<sup>21</sup> Regarding on role of TiO<sub>2</sub> in prostheses, Borghi et al in 2017<sup>22</sup> showed that intra-articular injection of TiO<sub>2</sub> NPs induced chronic arthritis inducing neutrophil influx, oxidative stress, cytokine production. This scenario induces cartilage damage and bone resorption.

Flavonoids possess significant *in vivo* activity and are being considered promising candidates for a new category of anti-inflammatory drugs.<sup>23</sup> In fact, the

flavonoid hesperidin methyl chalcone (HMC) is used to treat vascular diseases combined with vitamin C and extract of *Ruscusaculeatus*.<sup>24</sup> In addition, HMC inhibits MSU-induced experimental gout inhibiting oxidative stress, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 production, and NF $\kappa$ B activation (Ruiz-Miyazawa, submitted). Considering, the importance of arthroplasty procedure to improving patients' life quality, HMC could be a conceivable approach to inhibit prosthesis-related joint inflammation. Thus, we evaluated the effect and mechanisms of HMC treatment in the pathogenesis of TiO<sub>2</sub>-induced chronic arthritis.

## 2- Materials and methods

### General experimental procedures

In the first series of experiments, mice ( $n = 6$  per group per experiment) were submitted to a dose-response experiment of hesperidin methyl chalcone (HMC) treatment. Mice were stimulated with an intra-articular (i.a.) injection with 3 mg of TiO<sub>2</sub> (suspended in 10  $\mu$ L of sterile saline solution 0.9%NaCl) per knee joint.<sup>22</sup> Mechanical hyperalgesia and edema were evaluated 24 h after i.a. administration of TiO<sub>2</sub> to assess the arthritis model induction. Subsequently, after 24h, mice were treated with HMC (10, 30, 100 or 300 mg/kg, intraperitoneal [i.p.]) and mechanical hyperalgesia and edema were evaluated 1, 3, 5, 7, and 24h hours after HMC treatment in the first day. After that, mechanical hyperalgesia and edema were evaluated every other day 1h after HMC treatment until the 30<sup>th</sup> day. Immediately after the measurements on the 30<sup>th</sup> day, mice were anesthetized and euthanized, and washes knee joint cavities samples were harvested for leukocytes migration evaluation. The 100 mg/kg dose of HMC was chosen based on the results mechanical hyperalgesia. Blood and stomach samples were harvested to evaluate plasmatic levels of AST, ALT, urea, creatinine and the stomach for myeloperoxidase (MPO) activity. The knee joint was harvested to evaluate oxidative stress (gp91<sup>phox</sup> mRNA expression [RT-qPCR], superoxide anion [nitroblue tetrazoliumreduction levels], reduced glutathione [GSH] and lipid peroxidation [TBARS] and mRNA expression for RANKL and OPG (RT-qPCR). Also on the 30<sup>th</sup> day, patella samples were harvested for quantification of proteoglycan levels by colorimetric assay.

- 1- Animals.** Male Swiss mice weighing between 20-25 g from the Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil, were used in this study. Mice were housed in standard clear plastic cages with water and food *ad libitum*, light/dark cycle of 12/12h and controlled temperature (21°C). Mice were maintained in the vivarium of the Department of Pathology of Londrina State University for at least two days before experiments. Mice were used only once and were acclimatized to the testing room at least 1 hour before the experiments, which were conducted during the light cycle. Animal care and handling procedures were in accordance with the International Association for Study of Pain (IASP) guidelines and approved by the Londrina State University Ethics Committee on Animal Research and Welfare (process number 20466.2015.58). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.
- 2- Test compounds.** The compounds used in this study were saline solution (NaCl 0.9%; Frenesius Kabi Brasil Ltda, Aquiraz, CE, Brazil), Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA; Synth, Diadema, SP, Brazil) and hesperidin methyl chalcone (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Titanium dioxide was purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil) and particle size was  $< 1\mu\text{m}$  with an average of 862,2 nm as determined by size distribution analysis (Malvern Instruments Ltd, UK). Immediately before the injections,  $\text{TiO}_2$  was suspended in sterile saline (10  $\mu\text{L}$ ) and hesperidin methyl chalcone was diluted in sterile saline solution. Hesperidin methyl chalcone (10, 30, 100 or 300mg/kg) and saline were administrated by i.p.in a volume of 200  $\mu\text{L}$ .
- 3- Evaluation of articular mechanical hyperalgesia.** The articular mechanical hyperalgesia of the femorotibial joint was evaluated as previously described.<sup>25</sup> Briefly, in a quiet room, mice were placed individually in acrylic cages (12 x 10 x 17 cm) with a wire grid floor 15-30 minutes before the test for environmental adaption. Force application was performed only when animals were quiet, did not display exploratory movements or defecation and were not resting on the paws. An electronic pressure-meter test consisting of a hand-held force transducer fitted with a polypropylene tip (electronic von Frey Anesthesiometer;

Insight, Ribeirão Preto, SP, Brazil) was used to evaluate mechanical articular nociception. For this model, a large tip (4.15 mm<sup>2</sup>) was adapted to the probe. An increasing perpendicular force was applied to the central area of the plantar surface of the hind paw to induce a flexion movement of the femorotibial joint followed by paw withdrawal. A tilted mirror below the grid provided a clear view of the hind paw. The electronic pressure-meter apparatus automatically recorded the intensity of the force applied when the paw was withdrawn. The test was repeated until the subsequent consistent measurements (i.e. the variation among these measurements was less than 1g) were obtained. The flexion-elicited mechanical threshold was expressed in grams (g).<sup>25</sup>

- 4- Articular edema measurements.** Articular edema of the femorotibial joint was assessed through measurements of the transverse diameters using a caliper (Digimatic Caliper, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan). Thickness values of the femorotibial joint were expressed as the difference between the diameters measured before (basal value) and after TiO<sub>2</sub> intra-articular injection in millimeters (mm).<sup>26</sup>
- 5- Leukocyte migration evaluation.** The total and differential counts of recruited leukocytes to the intra-articular space were determined as previously described.<sup>27</sup> Briefly, knee joint cavities were washed with saline containing Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), which was recovered to evaluate total and differential cell counts. Total cell counts were performed in Neubauer chamber using Turk solution, and differential cell counts (100 cells per slide) were performed in slides stained with the panoptic kit (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil) under a light microscope (Olympus CX31RTSF, Tokyo, Japan). Results were expressed as total leukocytes, polymorphonuclear, and mononuclear cells (cells x 10<sup>3</sup>/ knee joint).
- 6- Stomach Toxicity Assay (Myeloperoxidase).** Trough of Myeloperoxidase (MPO) activity was determined the stomach toxicity assay using a colorimetric assay, considering it is a reliable marker for neutrophil migration to the tissues.<sup>28,29</sup> Samples of the stomach were collected in 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 6.0) containing 0.5% hexadecyl trimethylammonium bromide (HTAB) and

kept at  $-86^{\circ}\text{C}$  until use. Frozen samples were homogenized using a tissue turrax (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA), centrifuged (2 min,  $16,000g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) and the resulting supernatant assayed using a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Scientific, Vantaa, Finland) for MPO activity determination at 450 nm. The MPO activity of samples was compared to a standard curve of neutrophils. Briefly,  $15\ \mu\text{L}$  of sample was mixed with  $200\ \mu\text{L}$  of 50 mM phosphate buffer (pH 6.0), containing 0.167 mg/mL O-dianisidinedihydrochloride and 0.0005% hydrogen peroxide. The results were presented as MPO activity (number of neutrophils  $\times 10^6$  / mg of tissue).

- 7- Liver and Kidney Toxicity Assays.** Blood was harvested into microtubes containing  $50\ \mu\text{L}$  of the anticoagulant EDTA (5,000 IU/mL) and centrifuged ( $200\ g$ , 10 min,  $4\ ^{\circ}\text{C}$ ), and the plasma was separated. In order to determine enzymatic activities of AST and ALT as indicators of hepatotoxicity, and urea and creatinine levels as indicators of nephrotoxicity, plasma samples were processed according to the manufacturer's instructions (Labtest Diagnóstico S. A., Brazil). Results were presented as U/mL (AST and ALT) or mg/dL (urea and creatinine) of plasma.
- 8- Reduced glutathione (GSH) levels measurement:** Sample of knee joint was collected and maintained at  $-80\ ^{\circ}\text{C}$  for at least 48 h, and afterwards was homogenized with  $200\ \mu\text{L}$  of 0.02 M EDTA. The homogenate was mixed with  $25\ \mu\text{L}$  of trichloroacetic acid 50% and was homogenized three times over 15 min. The mixture was centrifuged ( $15\ \text{min} \times 1500\ g \times 4\ ^{\circ}\text{C}$ ). The supernatant was added to  $200\ \mu\text{L}$  of 0.2 M TRIS buffer, pH 8.2, and  $10\ \mu\text{L}$  of 0.01M DTNB. After 5 min, the absorbance was measured at 412 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific) against a blank reagent with no supernatant. A standard GSH curve was formed. The results are expressed as GSH per mg of protein (61).
- 9- Nitrobluetetrazolium reduction.** The superoxide anion production was determined by the reduction of the redox dye Nitroblue tetrazolium (NBT).<sup>30</sup> Knee joint frozen tissue from mice were homogenized with  $500\ \mu\text{L}$  of saline

using an ultra-turrax (Tissue-Tearor 985370, BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA), centrifuged (10 min, 3,300 g, 4 °C) and 50  $\mu$ L of the homogenate was placed in 96-well plate, followed by the addition of 100  $\mu$ L of nitro blue tetrazolium solution (1 mg/mL) (NBT, Sigma) and maintained at 37°C in a warm bath for 5 minutes. The supernatant was removed, and the formazan precipitated was then solubilized by adding 120  $\mu$ L of 2 M KOH and 120  $\mu$ L of dimethylsulfoxide (DMSO). The optical density was measured using a microplate spectrophotometer reader (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland) at 600 nm. The NBT reduction levels were corrected per the total protein concentration and the results were presented as NBT reduction (OD/mg of protein).

**10-Lipid peroxidation.** Tissue lipid peroxidation was assessed by the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS).<sup>31</sup> For this assay, TCA 10% was added to the homogenate and the mixture was centrifuged (3 min, 1000 g, 4°C) to precipitate proteins. The protein-free supernatant was then separated and mixed with TBA (0.67%). The mixture was kept in a water bath (15 min, 100°C). Malondialdehyde (MDA), an intermediate product of lipid peroxidation, was determined by the difference between absorbance at 535 and 572 nm using a microplate spectrophotometer reader. The TBARS were corrected per the total protein concentration and results were presented as TBARS ( $\mu$ mol of MDA/mg of protein).<sup>31</sup>

**11-Proteoglycan assays.** Proteoglycan concentrations were determined as previously described<sup>32</sup>, the patella was carefully collected from mice and fixed with formaldehyde (4%) overnight using a shaker. Subsequently, the patella was transferred into a solution of formic acid (5%) and incubated for 4 h using a shaker for decalcification. Each patella sample was then placed into 100  $\mu$ l of papain digestion buffer consisting of a papain suspension (5 mg/mL) in calcium and magnesium-free PBS with 5 mM cysteine and 10 mM EDTA, pH 7.4. The samples were sealed and incubated in a humidified container in a 60°C for 16 h. After reaching room temperature, samples were centrifuged for 10 min at 1,000 x g to collect the condensation droplets. Next, 50  $\mu$ l of the supernatants and of serial chondroitin sulfate solutions (standard curve; 50-1000 mg/mL) was placed

into 96-well plates. The chondroitin sulfate standard solution was also incubated with papain digestion buffer. Then, 300  $\mu$ L of a 1,9-dimethylmethyleneblue (DMMB; 50 mg/l, Polysciences, Inc.) solution was added to each well, and proteoglycan contents were determined by spectrophotometer reading at 525 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland). The chondroitin 6-sulfate sodium salt from shark cartilage, a glucosaminoglycan (GAG) content was calculated from the standard curve. The DMMB solution was prepared by dissolving 50 mg of DMMB in 5 ml ethanol and diluting to a volume of 1000 mL with 0.2% (w/v) the sodium salt of formic acid (sodium formate buffer, HCOONa), pH 3.5. The results were presented as proteoglycan in microgram.

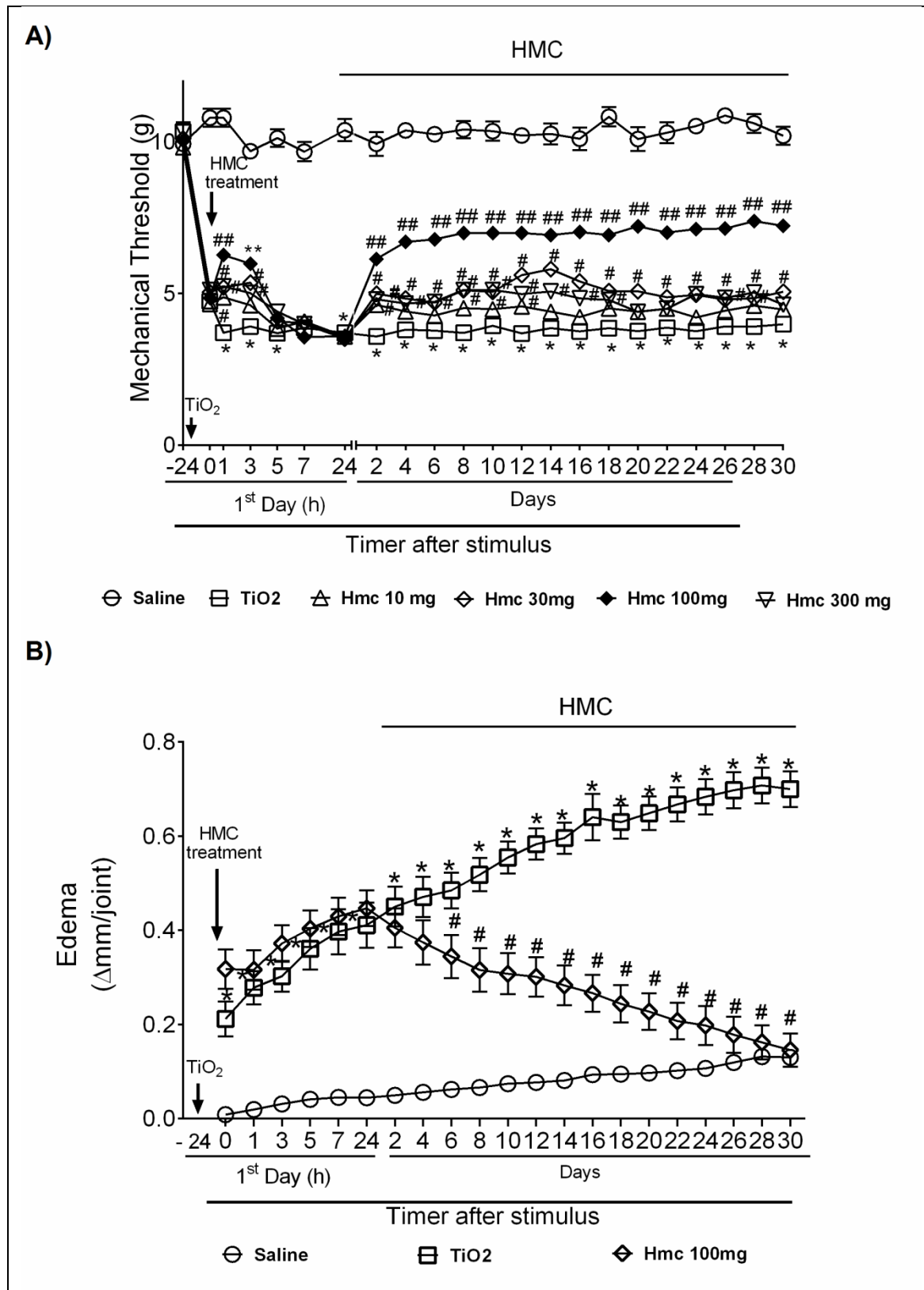
**12- RT-qPCR.** Samples were homogenized in TRIzol reagent, and total RNA was extracted by using the SV Total RNA Isolation System (Promega). The purity of total RNA was measured using a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland) and the wavelength absorption ratio (260/280) was between 1.8 and 2.0 for all preparations. Reverse transcription of total RNA to cDNA and qPCR were carried out using GoTaq<sup>®</sup> 2-Step RT-qPCR System (Promega) and specific primers (gp91<sup>phox</sup>, RANKL, and OPG). qPCR reaction was performed in StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Applied Biosystems<sup>®</sup>). The relative gene expression was measured using the comparative  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  method. The primers used were: gp91<sup>phox</sup>, sense: 5'-AGCTATGAGGTGGTGTAGTGG-3', antisense: 5'-CACAATATTTGTACCAGACAGACTTGAG-3'; RANKL, sense: 5'-CAGAAGATGGCACTCACTGCA-3', antisense: 5'-CACCATCGCTTTCTCTGCTCT-3'; OPG, sense: 5'-GGAACCCAGAGCGAAATACA-3', antisense: 5'-CCTGAAGAATGCCTCCTCACA-3'. GAPDH sense: 5'-CATAACCAGGAAATGAGCTTG-3', antisense: 5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTG, the expression of GAPDH mRNA was used as a reference gene, and the results were expressed as mRNA expression (normalized to GAPDH).

**13- Statistical analysis.** Results are presented as means  $\pm$  SEM of measurements made on six mice in each group per experiment and are representative of two separate experiments. Two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* was used to compare all groups and doses at all times when responses were measured at different times after the stimulus injection. Differences between responses were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* for data of single time point. Statistical differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 3- Results

**Hesperidin methyl chalcone (HMC) inhibits TiO<sub>2</sub>-induced mechanical hyperalgesia and edema.** Mice were treated with HMC (10, 30, 100 or 300 mg/kg, intraperitoneally[i.p]), starting 24 h after the intra-articular (i.a.) injection of 3 mg/joint of TiO<sub>2</sub>. HMC was administrated daily for 30 days, 1 h before the measurements of articular mechanical hyperalgesia and edema. The saline group did not present articular mechanical hyperalgesia (Figure 1A) and edema (Figure 1B). The i.a. injection of TiO<sub>2</sub> induced articular mechanical hyperalgesia (Figure 1A) and edema (Figure 1B) from 1-24 h on the first day and subsequently from the 2<sup>nd</sup> to 30<sup>th</sup> day. The doses of 30 and 100 mg/kg of HMC inhibited TiO<sub>2</sub>-induced articular mechanical hyperalgesia 1 and 3 h in the first day and subsequently until the 30<sup>th</sup> day. In addition, the dose of 100 mg/kg of HMC was statistically different from the other doses. According to the results of mechanical hyperalgesia, the dose of 100 mg/kg of HMC was chosen to perform the next experiments. The dose of 100mg/kg of HMC inhibited TiO<sub>2</sub>-induced articular edema after 3 days of the treatment until to 30<sup>th</sup> day.

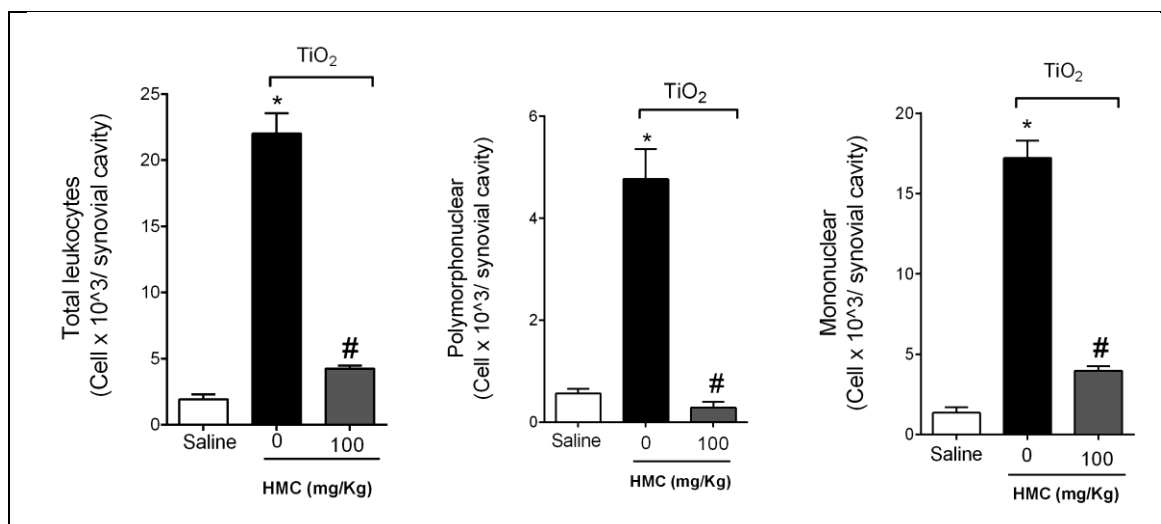
Figure 1:



**Figure 1.** Hesperidin-methyl-chalcone (HMC) inhibits mechanical hyperalgesia and edema in the titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) induced arthritis model. Mice were treated 30 days daily with HMC (10, 30, 100 and 300 mg/kg, intraperitoneal [i.p.]) starting 24 h after intra-articular (i.a.) injection of TiO<sub>2</sub> (3 mg/joint). Mechanical hyperalgesia (Panel A) and edema (Panel B) were evaluated 1, 3, 5 and 7 h after HMC treatment, and every other day until the end of the 30<sup>th</sup> day. The results were presented as a mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of 6 mice per experimental group, were performed 2 times separately. \* p <0.05 compared to the saline group, # p <0.05 compared to the TiO<sub>2</sub> group, \*\*p<0.05 compared to the TiO<sub>2</sub> groups and doses of 10 and 300mg/Kg HMC, ## p<0.05 compared TiO<sub>2</sub> groups and all other doses of HMC. (Two-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

**HMC inhibits TiO<sub>2</sub>-induced recruitment of leukocytes.** Mice were treated with HMC (100 mg/kg, i.p.) starting 24 h after i.a. injection of 3 mg/joint of TiO<sub>2</sub>. Mice were treated daily during 30 days. 30 days after TiO<sub>2</sub> injection, the knee joint wash was harvested for counts of total leukocytes (Figure 2A), polymorphonuclear (Figure 2B), and mononuclear (Figure 2C). HMC at the dose of 100 mg/kg inhibited TiO<sub>2</sub>-induced recruitment of total leukocytes, polymorphonuclear (Figure 2B) and mononuclear (Figure 2C) recruitment to the knee joint.

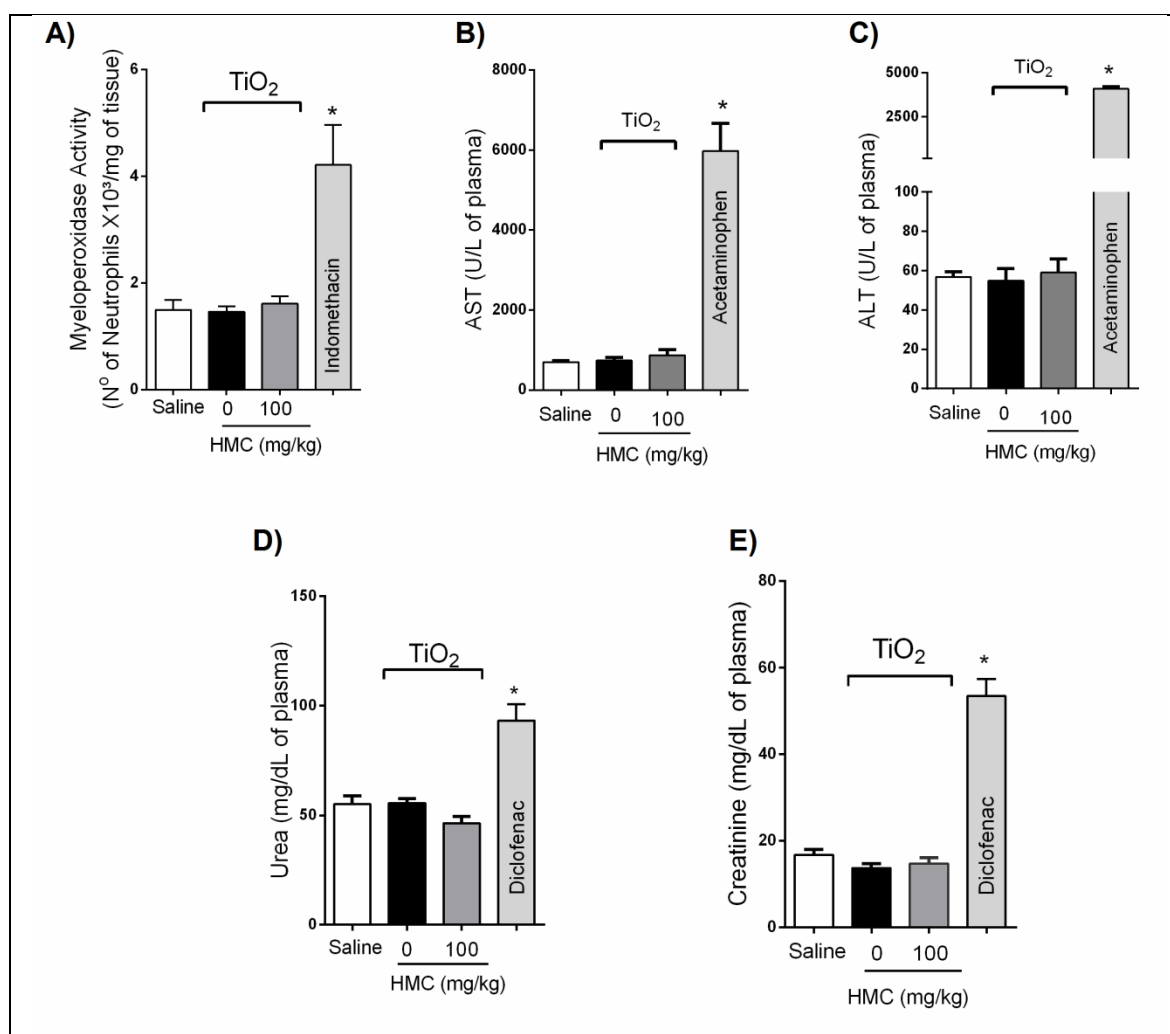
**Figure 2:**



**Figure 2.** HMC inhibits the recruitment of total, polymorphonuclear, and mononuclear leukocytes in the TiO<sub>2</sub>-induced arthritis model. The animals were treated 30 days daily with HMC (100 mg/kg, i.p.) after 24 h after the injection of TiO<sub>2</sub> (3 mg/joint). Recruitment of Total leukocytes (Panel A), polymorphonuclear (Panel B) and mononuclear (Panel C) was evaluated in the joint wash 30 days after the injection of TiO<sub>2</sub>. The results were presented as mean  $\pm$  SEM of 6 mice per experimental group, were performed 2 times separately. \* p <0.05 compared to the saline group, # p <0.05 compared to the TiO<sub>2</sub> group (One-way ANOVA followed by Tukey post-test).

**HMC does not induce kidney, liver or stomach damage.** Mice were treated daily during 30 days with the dose of 100 mg/Kg of HMC by i.p. route starting 24 h after the i.a. injection of 3 mg/joint of TiO<sub>2</sub>. Stomach and plasma samples were harvested to determine myeloperoxidase (MPO) activity in stomach samples and the plasma concentration of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine (Figure 3) as previously described (HOHMMAM et al., 2013, HICKEY et al. 2001). Indomethacin-treated mice (2.5 mg/kg, i.p., diluted in tris/HCl buffer, for 7 days) were used as positive control for stomach injury. Acetaminophen-treated mice were used as positive control for liver injury (650 mg/kg, orally, diluted in sterile saline, 200 mg/mL, once). Diclofenac-treated mice (200 mg/kg, orally, diluted in sterile saline, once) were used as positive control for kidney injury. The treatment with the dose of 100 mg/kg of HMC did not alter gastric MPO activity (Figure 3A), plasma concentration of AST (Figure 3B) and ALT (Figure 3C), urea (Figure 3D), and creatinine (Figure 3E).

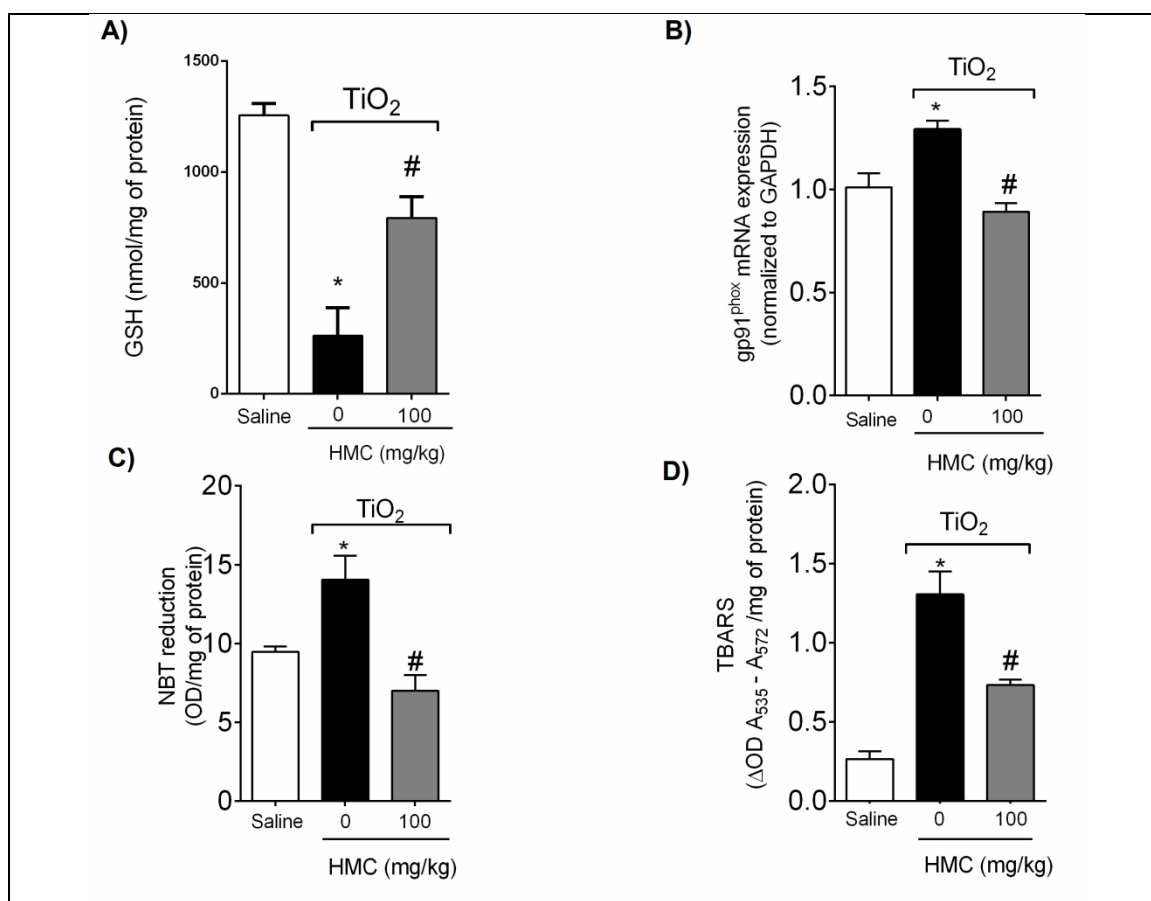
**Figure 3:**



**Figure 3.** The daily treatment with HMC does not induce liver, renal and gastric damage. The animals were treated 30 days daily with HMC (100 mg/kg, i.p.) during 30 days, or indomethacin (2.5 mg/kg, i.p., diluted in tris/HCl buffer) during 7 days; or acetaminophen (650 mg/kg, ip, diluted in saline, 200 mg/mL); or diclofenac (200 mg/kg, p.o., diluted in saline) were administrated only once. (A) MPO activity in the stomach; (B) AST and (C) ALT plasmatic levels; (D) urea and (E) creatinine plasmatic levels were determined. The results were presented as mean  $\pm$  SEM of 6 mice per experimental group, were performed 2 times separately. \*  $p < 0.05$  compared to the saline group. (One-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

**HMC inhibits TiO<sub>2</sub>-induced oxidative stress.** Mice were treated daily during 30 days with the dose of 100 mg/kg of HMC by i.p route starting 24 h after the i.a. injection of 3 mg/joint of TiO<sub>2</sub>. Joint was harvested 30 days after stimulus for determination of GSH (4A), gp91<sup>phox</sup> (Figure 4B), superoxide anion production (NBT reduction) (Figure 4C), and lipid peroxidation (TBARS) (Figure 4D). TiO<sub>2</sub> increased expression of gp91<sup>phox</sup> (Figure 4B), a NOX2 subunit involved in superoxide anion production.<sup>33</sup> The treatment with HMC inhibited TiO<sub>2</sub>-increased gp91<sup>phox</sup> expression (Figure 4B). In agreement, HMC treatment inhibited TiO<sub>2</sub>-induced GSH production (Figure 4A), superoxide anion production (Figure 4C) and lipid peroxidation (Figure 4D).

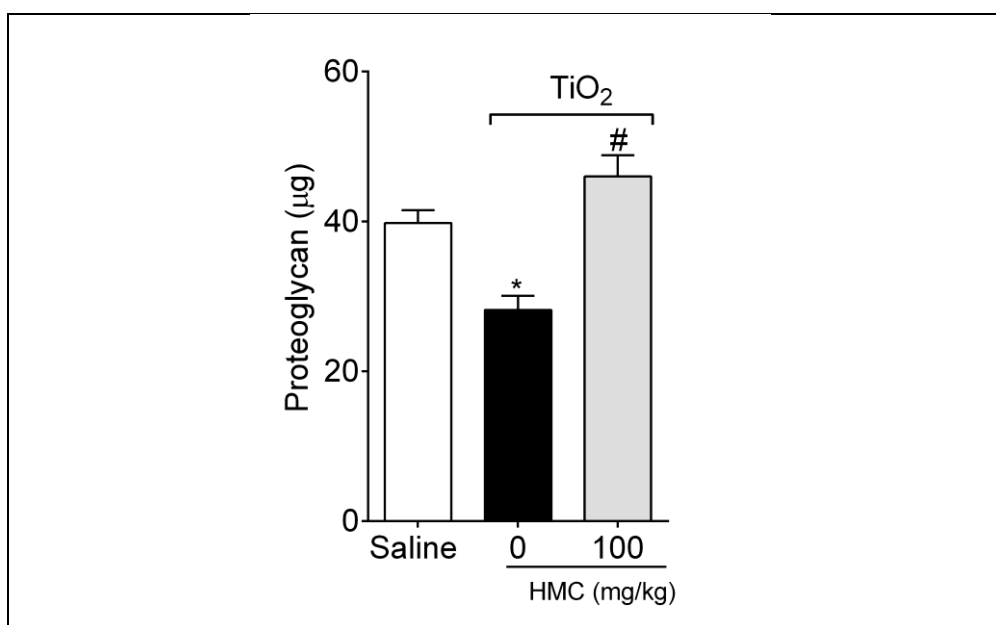
**Figure 4:**



**Figure 4.** HMC inhibits oxidative stress in the TiO<sub>2</sub>-induced arthritis model. The animals were treated 30 days daily with HMC (100 mg/kg, i.p.) starting 24 h after i.a. injection of TiO<sub>2</sub> (3 mg/joint). On the 30<sup>th</sup> day, the joint was harvested for presence of GSH's level (Panel A), expression of mRNA for gp91<sup>phox</sup> (Panel B), production of superoxide anion (NBT reduction) (Panel C) and lipid peroxidation (TBARS) (Panel D). The results were presented as a mean ± SEM of 6 mice per experimental group, were performed 2 times separately. \* p <0.05 compared to the saline group, # p <0.05 compared to the TiO<sub>2</sub> group (One-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

**HMC inhibits TiO<sub>2</sub>-induced cartilage erosion in the knee joint.** To determine the intensity of TiO<sub>2</sub>- induced proteoglycan degradation in the knee joint, mice were treated with 100mg/kg of HMC i.p. route starting 24 h after i.a. injection of 3 mg/joint of TiO<sub>2</sub>. Mice were treated daily for 30 days. On the 30<sup>th</sup> day, patella was harvested to quantify proteoglycan levels. TiO<sub>2</sub> decreased proteoglycan levels in patella after stimulus injection. The treatment with 100 mg/kg of HMC inhibited TiO<sub>2</sub>-decreased proteoglycan levels (Figure 5).

**Figure 5:**

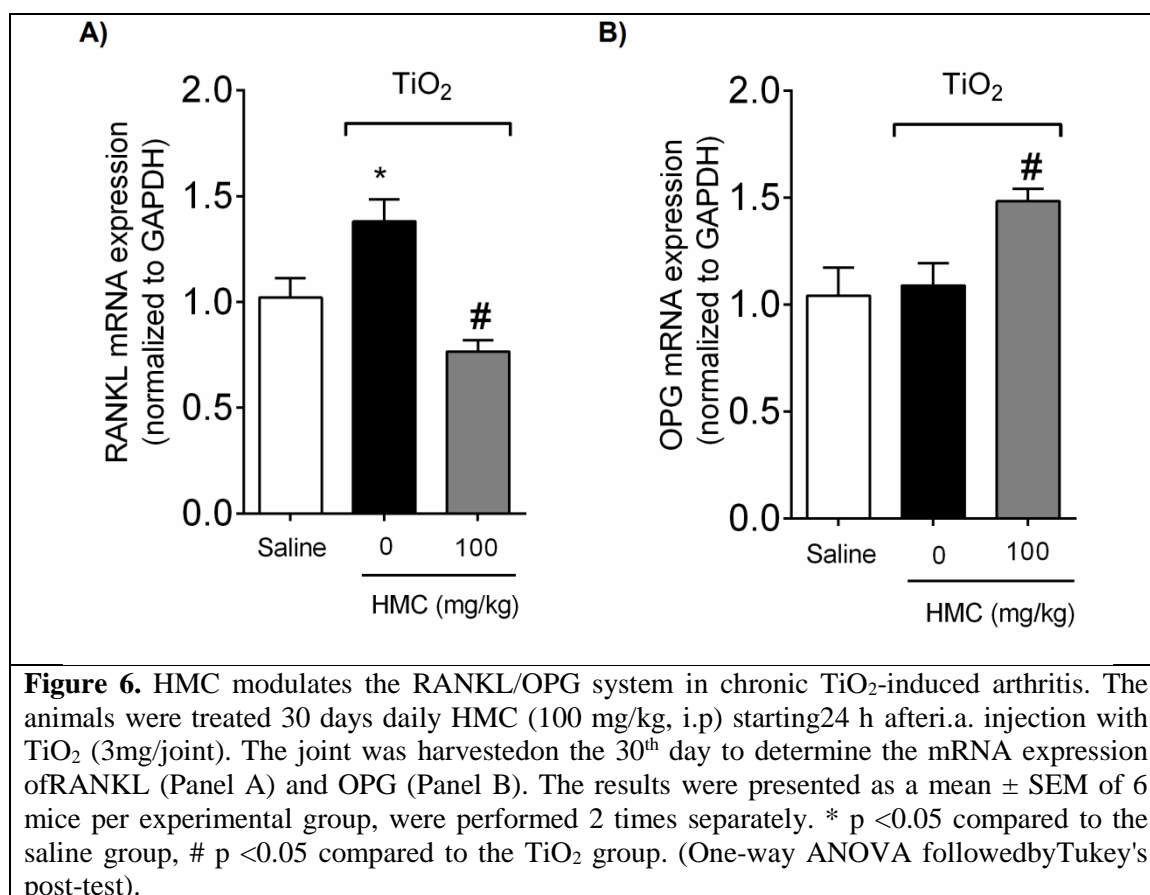


**Figure 5.** HMC inhibits the degradation of proteoglycans in the TiO<sub>2</sub>-induced arthritis model. The animals were treated daily with HMC (100 mg/kg, i.p.) for 30 days starting 24 h after i.a. injection of TiO<sub>2</sub> (3 mg/joint). On the 30<sup>th</sup> day, the patella was harvested for evaluation of proteoglycan levels. The results were presented as mean ± SEM of 6 mice per experimental group, were performed 2 times separately. \* p <0.05 compared to saline group, #p <0.05 compared to TiO<sub>2</sub> (One-way ANOVA followed by Tukey's post-test).

**HMC modulates RANKL/OPG system in TiO<sub>2</sub>-induced chronic arthritis.** Mice were treated daily during 30 days with the dose of 100 mg/kg of HMC by i.p. route starting

24 h after the i.a. injection of 3 mg/joint of TiO<sub>2</sub>. Joint samples were harvested 30 days after stimulus for determination of RANKL and OPG mRNA expression by RT-qPCR (Figure 6). Stimulus with TiO<sub>2</sub> increased RANKL expression (Figure 6A) and HMC treatment inhibited TiO<sub>2</sub>-increased RANKL expression (Figure 6A). TiO<sub>2</sub> did not alter OPG expression. On the other hand, HMC induced OPG expression (Figure 5B) in TiO<sub>2</sub>-induced chronic arthritis.

**Figure 6:**



#### 4- Discussion

Arthroplasty is a surgical procedure to replace totally or partially a dysfunctional joint. This procedure is important to give back patients' life quality, soften the pain and reestablishing joint function. Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) is highlighted among the biomaterials used for designing prostheses. Despite arthroplasty importance, this procedure might failure in 15% of the cases reaching up to 40% according to previous

studies.<sup>5,6</sup> In that case, prostheses-induced an aseptic inflammation inducing bone resorption through the immune system senses TiO<sub>2</sub> wear-released inducing arthroplasty failure.<sup>8</sup> Herein, we demonstrated that hesperidin methyl chalcone (HMC) inhibited TiO<sub>2</sub>-induced chronic arthritis in mice by inhibiting articular mechanical hyperalgesia and edema, leukocyte recruitment (polymorphonuclear and mononuclear), oxidative stress (gp91<sup>phox</sup> mRNA expression, reduced glutathione (GSH), NBT reduction, and lipid peroxidation [TBARS]), restoring proteoglycan depletion of the patella, and modulating the system RANKL/OPG. The treatment with HMC did not induce renal, hepatic and gastric damage in 30 days of treatment.

An aseptic loosening causes arthroplasty failure reducing patients' life quality given back pain and edema. TiO<sub>2</sub> nanoparticles (NPs) induces inflammation with leukocytes recruitment. In fact, TiO<sub>2</sub> NPs pulmonary instillation-increased the recruitment of leukocytes to mice lungs.<sup>20</sup> Increased leukocyte recruitment, in especial neutrophils, is related to chronic arthritis severity, increasing pain and edema, and tissue local damage.<sup>34</sup> Rheumatoid arthritis, for example, is characterized as a debilitating autoimmune disease, containing chronic inflammation of the joints, which present increased synovial fluid volume, large cell infiltrates of various cell types (such as neutrophils, macrophages and dendritic cells) in the synovial, high levels of pro-inflammatory cytokines and eventual erosion and remodeling of cartilage and bone.<sup>35</sup> TiO<sub>2</sub>-induced chronic increasing articular mechanical hyperalgesia, edema, and leukocytes recruitment.<sup>22</sup> Of note, about 80% of TiO<sub>2</sub>-induced leukocyte recruitment are neutrophils. Herein, HMC treatment inhibited TiO<sub>2</sub>-induced articular mechanical hyperalgesia, edema, and leukocyte recruitment (polymorphonuclear and mononuclear). In agreement, HMC inhibited zymosan- and MSU-induced articular mechanical hyperalgesia, edema and leukocyte recruitment (Oliveira-Rasquel, et al, under preparation; Ruiz-Miyazawa et al., in progress). Interestingly, mice with neutrophils depletion by monoclonal antibody were resistant to arthritogenic serum K/BxN-induced arthritis.<sup>36</sup> Neutrophil survivor (i.e. inhibition of neutrophil apoptosis) is increased in arthritis through Foxo3a suppression of FasL gene expression.<sup>37</sup> Neutrophil recruitment is related to increased mechanical hyperalgesia<sup>38</sup> and edema<sup>39</sup> by increasing IL-1 $\beta$  and PGE<sub>2</sub><sup>38</sup>, which result in neuronal sensitization.<sup>40</sup>

In chronic arthritis, oxidative stress is increased playing an important role.<sup>41,42</sup> The presence of neutrophils has been linked with tissue destruction in rheumatoid

arthritis through the release of various pro-inflammatory mediators such as oxygen reactive species (ROS).<sup>43</sup> TiO<sub>2</sub>-increased oxidative stress in chronic arthritis increasing superoxide anion production, lipid peroxidation and decreasing endogenous antioxidant GSH<sup>22</sup>, activated-neutrophils produced ROS and hypochlorous acid in joint<sup>34</sup> that are correlated with synovial inflammation and tissue joint damage.<sup>44</sup> Indeed, myeloperoxidase is increased in the arthritic synovial fluid of patients with carbonylated proteins increased.<sup>45</sup> Activated neutrophils exposed to TiO<sub>2</sub> NPs produced increased 140% NADPH oxidase production of superoxide production.<sup>46</sup> Thus, TiO<sub>2</sub>-induced oxidative stress in chronic arthritis through increasing neutrophils recruitment.<sup>22,47</sup>

Polyphenolic structure of flavonoids confers antioxidant effect by scavenging ROS through electrons donation.<sup>23</sup> Herein, HMC daily treatment inhibited TiO<sub>2</sub>-increased gp91<sup>phox</sup> (NADPH oxidase subunit), superoxide producing, reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation in chronic arthritis. In agreement, HMC inhibited oxidative stress in UVB-induced oxidative stress inhibiting superoxide anion production.<sup>48</sup> In addition, the analgesic effect of HMC seems to be related to its antioxidant effect since ROS-induced pain.<sup>26,49,50</sup> In fact, HMC inhibited mechanical hyperalgesia inhibiting oxidative stress in zymosan- and MSU-induced arthritis (OLIVEIRA et al., 2017 under preparation; Ruiz-Miyazawa et al., 2017 in progress). Cartilage and bone resorption are features in chronic arthritis contributing to joint dysfunctional and pain.<sup>51</sup> Joint cartilage is composed of cells embedded in a fibrous matrix of collagen with concentrated water proteoglycan gel,<sup>52</sup> and its integrity is essential to biomechanical properties of joint.<sup>53</sup> Cartilage explants of patients with chronic arthritis showed degenerating regions with lower antioxidant capacity and stronger staining of nitrotyrosine compared to intact regions from the same explant<sup>54</sup>. Oxidative stress induced cartilage damage<sup>55</sup> inhibiting matrix formation and inducing extracellular matrix degradation.<sup>56</sup> In fact, cartilage degradation and oxidative stress are increased in antigen induced-arthritis in Nrf-2 KO mice.<sup>55</sup> Thus, high levels of ROS inhibited chondrocyte-produced proteoglycan.<sup>57</sup> Of note, TiO<sub>2</sub>-depleted proteoglycan levels with cartilage damage in chronic arthritis.<sup>22</sup> Polyphenolic compounds such as quercetin (flavonoid) and curcumin (curcuminoid) inhibited TiO<sub>2</sub>-depleted proteoglycan in chronic arthritis inhibiting cartilage damage.<sup>22,44</sup> For instance, HMC inhibited TiO<sub>2</sub>-depleted proteoglycan in chronic arthritis.

Regarding on bone resorption, inflammatory milieu activated osteoclast<sup>8,10</sup> inducing osteoclastogenesis in a dependent<sup>8</sup> and independent-manner<sup>14</sup> of RANKL. In fact, RANKL/RANK signaling induced osteoclast progenitor differentiated to a multinucleated activated osteoclast.<sup>58</sup> In agreement, RANK KO mice showed less bone resorption and osteoclast activation.<sup>12</sup> In addition, the ratio between RANKL and OPG is an important determinant of bone mass.<sup>59</sup> In fact, OPG is a negative regulator of bone resorption binding to RANKL inhibiting the signaling pathway RANKL/RANK.<sup>59</sup> TiO<sub>2</sub>-induced osteoclast activation with increased levels of RANKL mRNA expression; whereas HMC inhibited TiO<sub>2</sub>-increased RANKL mRNA expression. In accordance, the conjugate of hesperetin-7-O-glucuronide (a main circulating metabolite of hesperidin) decreased RANKL mRNA expression in osteoblasts from rats calvaria.<sup>60</sup> Also, HMC treatment increased OPG mRNA expression. Thus, HMC treatment might improve bone mass in TiO<sub>2</sub>-induced chronic arthritis.

## **5- Conclusion**

In conclusion, hesperidin methyl chalcone (HMC) presented analgesic, anti-inflammatory and antioxidant effect in TiO<sub>2</sub>-induced chronic arthritis. HMC treatment inhibited articular mechanical hyperalgesia and edema, leukocyte recruitment, oxidative stress, proteoglycan depletion, and modulated RANKL/OPG system in TiO<sub>2</sub>-induced chronic arthritis. In addition, HMC prolonged treatment did not induce renal, hepatic or gastric damage. Therefore, suggesting that HMC treatment might be a conceivable therapeutic approach in prostheses wear released-induced chronic arthritis.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), São Paulo research Foundation (FAPESP) undergrant agreements number 2011/19670-0 (Thematic project) and 2013/08216-2 (Center for Research in Inflammatory Disease-CRID), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), PPSUS Grant funded by Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI), Secretaria da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), intermediated by CNPq and support of Fundação Araucária and Parana State Government grants supported this study (Brazil) undergrant agreements number: 041/2017

## 6- References

1. K. Lee and S. B. Goodman, Current state and future of joint replacements in the hip and knee, *Expert review of medical devices*, 2008, **5**, 383-393.
2. S. D. Ulrich, T. M. Seyler, D. Bennett, R. E. Delanois, K. J. Saleh, I. Thongtrangan, M. Kuskowski, E. Y. Cheng, P. F. Sharkey, J. Parvizi, J. B. Stiehl and M. A. Mont, Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision?, *International orthopaedics*, 2008, **32**, 597-604.
3. L. J. Soever, C. Mackay, T. Saryeddine, A. M. Davis, J. F. Flannery, S. B. Jaglal, C. Levy and N. Mahomed, Educational needs of patients undergoing total joint arthroplasty, *Physiotherapy Canada. Physiotherapie Canada*, 2010, **62**, 206-214.
4. A. J. Carr, O. Robertsson, S. Graves, A. J. Price, N. K. Arden, A. Judge and D. J. Beard, Knee replacement, *Lancet*, 2012, **379**, 1331-1340.
5. W. H. Harris, Wear and periprosthetic osteolysis: the problem, *Clinical orthopaedics and related research*, 2001, 66-70.
6. P. E. Purdue, P. Koulouvaris, B. J. Nestor and T. P. Sculco, The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis, *HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*, 2006, **2**, 102-113.
7. R. Narkbunnam and K. Chareancholvanich, Causes of failure in total knee arthroplasty, *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet*, 2012, **95**, 667-673.
8. N. Cobelli, B. Scharf, G. M. Crisi, J. Hardin and L. Santambrogio, Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices, *Nature reviews. Rheumatology*, 2011, **7**, 600-608.
9. D. R. Haynes, T. N. Crotti, A. E. Potter, M. Loric, G. J. Atkins, D. W. Howie and D. M. Findlay, The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis, *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 2001, **83**, 902-911.
10. P. H. Wooley, R. Morren, J. Andary, S. Sud, S. Y. Yang, L. Mayton, D. Markel, A. Sieving and S. Nasser, Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch, *Biomaterials*, 2002, **23**, 517-526.
11. A. G. Cobb and T. P. Schmalzreid, The clinical significance of metal ion release from cobalt-chromium metal-on-metal hip joint arthroplasty, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine*, 2006, **220**, 385-398.

12. T. A. Freeman, J. Parvizi, C. J. Della Valle and M. J. Steinbeck, Reactive oxygen and nitrogen species induce protein and DNA modifications driving arthrofibrosis following total knee arthroplasty, *Fibrogenesis & tissue repair*, 2009, **2**, 5.
13. P. H. Wooley, S. Nasser and R. H. Fitzgerald, Jr., The immune response to implant materials in humans, *Clinical orthopaedics and related research*, 1996, 63-70.
14. C. A. St Pierre, M. Chan, Y. Iwakura, D. C. Ayers, E. A. Kurt-Jones and R. W. Finberg, Periprosthetic osteolysis: characterizing the innate immune response to titanium wear-particles, *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2010, **28**, 1418-1424.
15. L. Danks, N. Komatsu, M. M. Guerrini, S. Sawa, M. Armaka, G. Kollias, T. Nakashima and H. Takayanagi, RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation, *Annals of the rheumatic diseases*, 2016, **75**, 1187-1195.
16. D. M. Goncalves and D. Girard, Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo, *International immunopharmacology*, 2011, **11**, 1109-1115.
17. J. R. Gurr, A. S. Wang, C. H. Chen and K. Y. Jan, Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells, *Toxicology*, 2005, **213**, 66-73.
18. J. Wu, W. Liu, C. Xue, S. Zhou, F. Lan, L. Bi, H. Xu, X. Yang and F. D. Zeng, Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure, *Toxicology letters*, 2009, **191**, 1-8.
19. R. K. Shukla, V. Sharma, A. K. Pandey, S. Singh, S. Sultana and A. Dhawan, ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 2011, **25**, 231-241.
20. N. Ambalavanan, A. Stanishevsky, A. Bulger, B. Halloran, C. Steele, Y. Vohra and S. Matalon, Titanium oxide nanoparticle instillation induces inflammation and inhibits lung development in mice, *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 2013, **304**, L152-161.
21. T. C. Long, J. Tajuba, P. Sama, N. Saleh, C. Swartz, J. Parker, S. Hester, G. V. Lowry and B. Veronesi, Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro, *Environmental health perspectives*, 2007, **115**, 1631-1637.
22. S. M. Borghi, S. S. Mizokami, F. A. Pinho-Ribeiro, V. Fattori, J. Crespigio, J. T. Clemente-Napimoga, M. H. Napimoga, D. L. Pitol, J. P. M. Issa, S. Y. Fukada, R. Casagrande and W. A. Verri, Jr., The flavonoid quercetin inhibits titanium

- dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced chronic arthritis in mice, *The Journal of nutritional biochemistry*, 2017, **53**, 81-95.
23. W. A. Verri, F. T. M. C. Vicentini, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, R. D. R. Cardoso, T. M. Cunha, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, M. J. V. Fonseca and R. Casagrande, 2012, vol. 36, pp. 297-330.
  24. A. Jawien, E. Bouskela, F. A. Allaert and A. N. Nicolaides, The place of Ruscus extract, hesperidin methyl chalcone, and vitamin C in the management of chronic venous disease, *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*, 2017, **36**, 31-41.
  25. A. T. Guerrero, W. A. Verri, Jr., T. M. Cunha, T. A. Silva, F. A. Rocha, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha and C. A. Parada, Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening, *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 2006, **84**, 244-251.
  26. N. A. Maioli, A. C. Zarpelon, S. S. Mizokami, C. Calixto-Campos, C. F. Guazelli, M. S. Hohmann, F. A. Pinho-Ribeiro, T. T. Carvalho, M. F. Manchope, C. R. Ferraz, R. Casagrande and W. A. Verri, Jr., The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2, *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 2015, **48**, 321-331.
  27. W. A. Verri, Jr., F. O. Souto, S. M. Vieira, S. C. Almeida, S. Y. Fukada, D. Xu, J. C. Alves-Filho, T. M. Cunha, A. T. Guerrero, R. B. Mattos-Guimaraes, F. R. Oliveira, M. M. Teixeira, J. S. Silva, I. B. McInnes, S. H. Ferreira, P. Louzada-Junior, F. Y. Liew and F. Q. Cunha, IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy, *Annals of the rheumatic diseases*, 2010, **69**, 1697-1703.
  28. C. F. Guazelli, V. Fattori, B. B. Colombo, S. R. Georgetti, F. T. Vicentini, R. Casagrande, M. M. Baracat and W. A. Verri, Jr., Quercetin-loaded microcapsules ameliorate experimental colitis in mice by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms, *Journal of natural products*, 2013, **76**, 200-208.
  29. R. Casagrande, S. R. Georgetti, W. A. Verri, Jr., D. J. Dorta, A. C. dos Santos and M. J. Fonseca, Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice, *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 2006, **84**, 21-27.
  30. M. S. Hohmann, R. D. Cardoso, F. A. Pinho-Ribeiro, J. Crespigio, T. M. Cunha, J. C. Alves-Filho, R. V. da Silva, P. Pinge-Filho, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, R. Casagrande and W. A. Verri, Jr., 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality, *BioMed research international*, 2013, **2013**, 627046.

31. R. P. Guedes, L. D. Bosco, C. M. Teixeira, A. S. Araujo, S. Llesuy, A. Bello-Klein, M. F. Ribeiro and W. A. Partata, Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord, *Neurochemical research*, 2006, **31**, 603-609.
32. L. Staurengo-Ferrari, K. W. Ruiz-Miyazawa, F. A. Pinho-Ribeiro, T. P. Domiciano, V. Fattori, S. S. Mizokami, J. S. Pelayo, J. Bordignon, F. Figueiredo, R. Casagrande, K. M. Miranda and W. A. Verri, Jr., The nitroxyl donor Angeli's salt ameliorates *Staphylococcus aureus*-induced septic arthritis in mice, *Free radical biology & medicine*, 2017, **108**, 487-499.
33. J. D. Lambeth, NOX enzymes and the biology of reactive oxygen, *Nature Reviews Immunology*, 2004, **4**, 181-189.
34. H. L. Wright, R. J. Moots and S. W. Edwards, The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis, *Nature reviews. Rheumatology*, 2014, **10**, 593-601.
35. M. Feldmann, F. M. Brennan and R. N. Maini, Role of cytokines in rheumatoid arthritis, *Annual review of immunology*, 1996, **14**, 397-440.
36. B. T. Wipke and P. M. Allen, Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis, *Journal of immunology*, 2001, **167**, 1601-1608.
37. H. Jonsson, P. Allen and S. L. Peng, Inflammatory arthritis requires Foxo3a to prevent Fas ligand-induced neutrophil apoptosis, *Nature medicine*, 2005, **11**, 666-671.
38. T. M. Cunha, W. A. Verri, Jr., I. R. Schivo, M. H. Napimoga, C. A. Parada, S. Poole, M. M. Teixeira, S. H. Ferreira and F. Q. Cunha, Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception, *Journal of leukocyte biology*, 2008, **83**, 824-832.
39. J. Suo, B. Linke, S. Meyer dos Santos, S. Pierre, D. Stegner, D. D. Zhang, C. V. Denis, G. Geisslinger, B. Nieswandt and K. Scholich, Neutrophils mediate edema formation but not mechanical allodynia during zymosan-induced inflammation, *Journal of leukocyte biology*, 2014, **96**, 133-142.
40. W. A. Verri, Jr., T. M. Cunha, C. A. Parada, S. Poole, F. Q. Cunha and S. H. Ferreira, Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?, *Pharmacology & therapeutics*, 2006, **112**, 116-138.
41. C. A. Hitchon and H. S. El-Gabalawy, Oxidation in rheumatoid arthritis, *Arthritis research & therapy*, 2004, **6**, 265-278.
42. J. Fay, D. Varoga, C. J. Wruck, B. Kurz, M. B. Goldring and T. Pufe, Reactive oxygen species induce expression of vascular endothelial growth factor in chondrocytes and human articular cartilage explants, *Arthritis research & therapy*, 2006, **8**, R189.

43. M. M. Bezerra, S. D. Brain, V. C. Girao, S. Greenacre, J. Keeble and F. A. Rocha, Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2007, **374**, 265-273.
44. V. Fattori, F. A. Amaral and W. A. Verri, Jr., Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives, *Pharmacological research*, 2016, **112**, 84-98.
45. L. K. Stamp, I. Khalilova, J. M. Tarr, R. Senthilmohan, R. Turner, R. C. Haigh, P. G. Winyard and A. J. Kettle, Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis, *Rheumatology*, 2012, **51**, 1796-1803.
46. R. Masoud, T. Bizouarn, S. Trepout, F. Wien, L. Baciou, S. Marco and C. Houee Levin, Titanium Dioxide Nanoparticles Increase Superoxide Anion Production by Acting on NADPH Oxidase, *PloS one*, 2015, **10**, e0144829.
47. J. X. Wang, Y. B. Fan, Y. Gao, Q. H. Hu and T. C. Wang, TiO<sub>2</sub> nanoparticles translocation and potential toxicological effect in rats after intraarticular injection, *Biomaterials*, 2009, **30**, 4590-4600.
48. R. M. Martinez, F. A. Pinho-Ribeiro, V. S. Steffen, C. V. Caviglione, D. Pala, M. M. Baracat, S. R. Georgetti, W. A. Verri and R. Casagrande, Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation, *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 2016, **15**, 554-563.
49. M. F. Manchope, C. Calixto-Campos, L. Coelho-Silva, A. C. Zarpelon, F. A. Pinho-Ribeiro, S. R. Georgetti, M. M. Baracat, R. Casagrande and W. A. Verri, Jr., Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP Channel Signaling Pathway, *PloS one*, 2016, **11**, e0153015.
50. M. M. Ndengele, C. Muscoli, Z. Q. Wang, T. M. Doyle, G. M. Matuschak and D. Salvemini, Superoxide potentiates NF-kappaB activation and modulates endotoxin-induced cytokine production in alveolar macrophages, *Shock*, 2005, **23**, 186-193.
51. X. D. Wang, X. X. Kou, D. Q. He, M. M. Zeng, Z. Meng, R. Y. Bi, Y. Liu, J. N. Zhang, Y. H. Gan and Y. H. Zhou, Progression of cartilage degradation, bone resorption and pain in rat temporomandibular joint osteoarthritis induced by injection of iodoacetate, *PloS one*, 2012, **7**, e45036.
52. D. Heinegard and A. Oldberg, Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1989, **3**, 2042-2051.

53. A. J. Sophia Fox, A. Bedi and S. A. Rodeo, The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function, *Sports health*, 2009, **1**, 461-468.
54. K. Yudoh, T. Nguyen v, H. Nakamura, K. Hongo-Masuko, T. Kato and K. Nishioka, Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function, *Arthritis research & therapy*, 2005, **7**, R380-391.
55. C. J. Wruck, A. Fragoulis, A. Gurzynski, L. O. Brandenburg, Y. W. Kan, K. Chan, J. Hassenpflug, S. Freitag-Wolf, D. Varoga, S. Lippross and T. Pufe, Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice, *Annals of the rheumatic diseases*, 2011, **70**, 844-850.
56. Y. Henrotin, B. Kurz and T. Aigner, Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?, *Osteoarthritis and cartilage*, 2005, **13**, 643-654.
57. A. Panasyuk, E. Frati, D. Ribault and D. Mitrovic, Effect of reactive oxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans, *Free radical biology & medicine*, 1994, **16**, 157-167.
58. A. K. Roshak, J. R. Jackson, K. McGough, M. Chabot-Fletcher, E. Mochan and L. A. Marshall, Manipulation of distinct NFkappaB proteins alters interleukin-1beta-induced human rheumatoid synovial fibroblast prostaglandin E2 formation, *The Journal of biological chemistry*, 1996, **271**, 31496-31501.
59. J. Schmitz, A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan and R. A. Kastelein, IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines, *Immunity*, 2005, **23**, 479-490.
60. A. Trzeciakiewicz, V. Habauzit, S. Mercier, D. Barron, M. Urpi-Sarda, C. Manach, E. Offord and M. N. Horcajada, Molecular mechanism of hesperetin-7-O-glucuronide, the main circulating metabolite of hesperidin, involved in osteoblast differentiation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2010, **58**, 668-675.
61. Borghi SM, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Cardoso RDR, Martins-Pinge MC, Tatakihara RI, et al. Role of TNF- $\alpha$ /TNFR1 in intense acute swimming-induced delayed onset muscle soreness in mice. *Physiol Behav* 2014; **128**:277–87.

## 5- CONCLUSÃO

Em conclusão, a hesperidina metil chalcona (HMC) apresentou efeito analgésico, anti-inflamatório e antioxidante em artrite crônica induzida por  $\text{TiO}_2$ . O tratamento HMC inibiu hiperalgesia e edema articular, recrutamento de leucócitos, estresse oxidativo, depleção de proteoglicanos e sistema RANKL/ OPG modulado em artrite crônica induzida por  $\text{TiO}_2$ . Além disso, o tratamento prolongado com HMC não induziu danos renais ou gástricos. Portanto, o tratamento com HMC pode ser uma abordagem terapêutica concebível em portadores de próteses para artrite crônica induzida por liberação.

## 6- REFERÊNCIAS

1. Zhong Y, Chiou YS, Pan MH, Shahidi F. Anti-inflammatory activity of lipophilic epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives in LPS-stimulated murine macrophages. *Food chemistry*. 2012;134(2):742-8.
2. Kwon OK, Lee MY, Yuk JE, Oh SR, Chin YW, Lee HK, et al. Anti-inflammatory effects of methanol extracts of the root of *Lilium lancifolium* on LPS-stimulated Raw264.7 cells. *Journal of ethnopharmacology*. 2010;130(1):28-34.
3. Rocha e Silva M. A brief survey of the history of inflammation. 1978. *Agents and actions*. 1994;43(3-4):86-90.
4. Abbas AK, Kumar V, Fausto N. *Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças*: Elsevier; 2016. 1440- p.
5. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-35.
6. Verri WA, Vicentini FTMC, Baracat MM, Georgetti SR, Cardoso RDR, Cunha TM, et al. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: Mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. 2012; 362012. p. 297-330.
7. Verma V, Sheikh Z, Ahmed AS. Nociception and role of immune system in pain. *Acta neurologica Belgica*. 2015;115(3):213-20.
8. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
9. Bottaro D, Shepro D, Peterson S, Hechtman HB. Serotonin, norepinephrine, and histamine mediation of endothelial cell barrier function in vitro. *Journal of Cellular Physiology*. 1986;128(2):189-94.

10. Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitros D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunological Reviews*. 2007;217(1):65-78.
11. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontology* 2000. 2013;63(1):149-64.
12. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*. 2005;6(12):1191-7.
13. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, Neill LAJO, et al. Resolution of inflammation : state of the art , definitions and terms. 2007;21(2):325-32.
14. Huang LH, Pan XP, Gong KR, Shao G. Anti-inflammatory effects of three kinds of traditional Mongolian medicine monomer and its combination on LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2016;20(5):950-8.
15. Lindell L, Bergman S, Petersson IF, Jacobsson LT, Herrstrom P. Prevalence of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Scandinavian journal of primary health care*. 2000;18(3):149-53.
16. Iasp. IASP Taxonomy - IASP. 2012.
17. Ji RR, Xu ZZ, Strichartz G, Serhan CN. Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain. *Trends in Neurosciences*. 2011;34(11):599-609.
18. Ferreira SH, Ferrari LF, Cunha TM, Nascimento PGBD, Verri WA, Cunha FdQ. *Dor Inflamatória*. 2009. p. 1438-.
19. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001;413(6852):203-10.
20. Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain research reviews*. 2006;51(2):240-64.

21. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012;211:39-50.
22. Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Chiu IM. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in Immunology*. 2017;38(1):5-19.
23. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free radical biology & medicine*. 2010;49(11):1603-16.
24. Ndengele MM, Cuzzocrea S, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Matuschak GM, et al. Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22:3154-64.
25. Cobelli N, Scharf B, Crisi GM, Hardin J, Santambrogio L. Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices. *Nature reviews Rheumatology*. 2011;7(10):600-8.
26. Lee K, Goodman SB. Current state and future of joint replacements in the hip and knee. *Expert review of medical devices*. 2008;5(3):383-93.
27. Ulrich SD, Seyler TM, Bennett D, Delanois RE, Saleh KJ, Thongtrangan I, et al. Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision? *International orthopaedics*. 2008;32(5):597-604.
28. Lee K, Goodman SB. Current state and future of joint replacements in the hip and knee. *Expert review of medical devices*. 2008;5(3):383-93.
29. Browne M, Gregson PJ. Surface modification of titanium alloy implants. *Biomaterials*. 1994;15(11):894-8.
30. Haynes DR, Crotti TN, Potter AE, Loric M, Atkins GJ, Howie DW, et al. The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2001;83(6):902-11.

31. Wooley PH, Morren R, Andary J, Sud S, Yang SY, Mayton L, et al. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. *Biomaterials*. 2002;23(2):517-26.
32. Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends in pharmacological sciences*. 2003;24(6):290-7.
33. Harris WH. Wear and periprosthetic osteolysis: the problem. *Clinical orthopaedics and related research*. 2001(393):66-70.
34. Purdue PE, Koulouvaris P, Nestor BJ, Sculco TP. The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis. *HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*. 2006;2(2):102-13.
35. Wooley PH, Nasser S, Fitzgerald RH, Jr. The immune response to implant materials in humans. *Clinical orthopaedics and related research*. 1996(326):63-70.
36. Goncalves DM, Girard D. Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles induce neutrophil influx and local production of several pro-inflammatory mediators in vivo. *International immunopharmacology*. 2011;11(8):1109-15.
37. Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chemical research in toxicology*. 2008;21(9):1871-7.
38. Vamanu CI, Cimpan MR, Hol PJ, Sornes S, Lie SA, Gjerdet NR. Induction of cell death by TiO<sub>2</sub> nanoparticles: studies on a human monoblastoid cell line. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2008;22(7):1689-96.
39. Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*. 2005;213(1-2):66-73.
40. Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. In vivo acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *Journal of applied toxicology : JAT*. 2009;29(4):330-7.

41. Driscoll KE, Lindenschmidt RC, Maurer JK, Higgins JM, Ridder G. Pulmonary response to silica or titanium dioxide: inflammatory cells, alveolar macrophage-derived cytokines, and histopathology. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1990;2(4):381-90.
42. Dunford R, Salinaro A, Cai L, Serpone N, Horikoshi S, Hidaka H, et al. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS letters*. 1997;418(1-2):87-90.
43. Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology letters*. 2007;168(2):176-85.
44. Dörner T, Haas J, Loddenkemper C, von Baehr V, Salama A. Implant-related inflammatory arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2006;2(1):53-6.
45. Park EJ, Yoon J, Choi K, Yi J, Park K. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology*. 2009;260(1-3):37-46.
46. Borghi SM, Mizokami SS, Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Crespigio J, Clemente-Napimoga JT, et al. The flavonoid quercetin inhibits titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>)-induced chronic arthritis in mice. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2017;53:81-95.
47. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal*. 2013;2013:162750.
48. Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo MS, Folador P, Damazio RG, et al. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2008;8(13):1429-40.
49. Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Remesy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *European journal of clinical nutrition*. 2003;57(2):235-42.

50. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*. 2000;52(4):673-751.
51. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*. 2002;96(2-3):67-202.
52. Jawien A, Bouskela E, Allaert FA, Nicolaidis AN. The place of Ruscus extract, hesperidin methyl chalcone, and vitamin C in the management of chronic venous disease. *International angiology : a journal of the International Union of Angiology*. 2017;36(1):31-41.
53. Galati EM, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Rossitto A, Monforte MT. Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid. (Note III): antihypertensive and diuretic activity in rat. *Farmaco*. 1996;51(3):219-21.
54. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy research : PTR*. 2015;29(3):323-31.
55. Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione CV, Pala D, Baracat MM, et al. Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2016;15(4):554-63.
56. Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy research : PTR*. 2001;15(8):655-69.
57. Guerrero AT, Verri WA, Jr., Cunha TM, Silva TA, Rocha FA, Ferreira SH, et al. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2006;84(2):244-51.

58. Hohmann MSN, Cardoso RDR, Pinho-Ribeiro FA, Crespigio J, Cunha TM, Alves-Filho JC, et al. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *BioMed research international*. 2013;2013:627046-.
59. Fluckiger FA, Hanbury D. In *Pharmacographia - A history of the principle Drugs of Vegetable Origin*. International Book Distributors: Delhi, India;1986; 104-105
60. Sieve B, J. A new antifertility factor. *Science*, 1952, 116; 373-385
61. Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *PhytotherRes* , 2001, 15: 655–669.