

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**MARCUS BARG RESMINI**

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES DO  
TRATAMENTO INTRA-ARTICULAR COM TRIANCINOLONA  
HEXACETONIDA ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO  
(GNPs) EM UM MODELO MECÂNICO DE OSTEOARTRITE EM  
RATOS WISTAR**

**CRICIÚMA, 2020**

**MARCUS BARG RESMINI**

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES DO  
TRATAMENTO INTRA-ARTICULAR COM TRIANCINOLONA  
HEXACETONIDA ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO  
(GNPs) EM UM MODELO MECÂNICO DE OSTEOARTRITE EM  
RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock  
Silveira

**CRICIÚMA, 2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R433e Resmini, Marcus Barg.

Efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do tratamento intra-articular com triancinolona hexacetonida associada a nanopartículas de ouro (GNPs) em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos wistar / Marcus Barg Resmini. - 2020.

49 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2020.

Orientação: Felipe Dal Pizzol.

Coorientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Osteoartrite - Tratamento. 2. Nanopartículas de ouro. 3. Triancinolona hexacetonida - Uso terapêutico. 4. Anti-inflamatórios. 5. Antioxidantes I. Título.

CDD 23. ed. 615.1

## RESUMO

A osteoartrite (OA) primária é uma patologia articular que pode afetar diversas articulações, sendo uma das principais causas de incapacidade na população. Triancinolona Hexacetonida (TH), um glicocorticóide sintético, intra-articular pode ser utilizado em casos de exacerbação sintomática. Em modelos animais a utilização de corticosteroide intra-articular demonstrou efeito protetor sobre a cartilagem, porém estudos clínicos não demonstraram alteração na evolução natural da OA. Trabalhos experimentais com nanopartículas de ouro (GNPs) demonstraram efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios articulares. Além disso, a conjugação de GNPs com medicamentos visando otimização terapêutica vem sendo testada, com resultados variados. No presente estudo foi avaliado os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do tratamento intra-articular de TH associada a GNPs, em um modelo mecânico de OA. Para isso o modelo de OA foi induzido por meniscectomia mediana do membro posterior direito, em 50 ratos Wistar com 2 meses, pesando entre 250-300g. Os animais foram divididos em 5 grupos de 10 animais, correspondendo aos grupos: 1) *sham*, 2) OA, 3) OA tratado com TH (OA-TH), 4) OA tratado com GNPs (OA-GNPs) e 5) OA tratado com GNPs associadas a TH (OA-TH-GNPs). Foram avaliados os níveis de Interferon-gama (IF $\gamma$ ), Fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), nitrito, Diclorofluoresceína (DCF), Superóxido dismutase (SOD), Glutathiona reduzida (GSH), carbonila e sulfidril. Os resultados do experimento demonstraram uma redução nos níveis de TNF $\alpha$  e um aumento nos níveis de IL-6 no grupo TH-GNPs. Observou-se aumento nos níveis de IL-4 e de IL-10 nos grupos OA-TH, OA-GNPs e OA-TH-GNPs. Houve aumento significativo nos níveis de TGF- $\beta$  no grupo OA-TH-GNPs. Todos os grupos tratados com TH e/ou GNPs tiveram uma redução significativa nos níveis de Nitrito e de Carbonila em relação ao grupo OA. Foi observado um aumento dos níveis de sulfidril no grupo OA-TH-GNPs em relação ao grupo OA. Na avaliação da atividade do sistema antioxidante, através da atividade das enzimas de SOD e GSH, houve aumento da atividade dessas enzimas nos grupos OA-GNPs e OA-TH-GNPs em relação ao grupo OA. Os resultados deste estudo indicam atividade anti-inflamatória e antioxidantes das terapias realizadas, sendo mais pronunciada no grupo que recebeu a associação entre TH-GNPs. Esses resultados podem estar

relacionados a farmacocinética da TH quando associada a GNPs ou efeitos aditivos das duas terapias.

**Palavras-chave:** osteoartrite, nanopartículas de ouro, Triancinolona Hexacetonida, anti-inflamatório, antioxidante

## ABSTRACT

Primary osteoarthritis (OA) is an articular pathology that can affect several joints, being one of the main causes of disability in the population. Triamcinolone Hexacetonide (TH), a synthetic glucocorticoid, can be used intra-articular in cases of symptomatic exacerbation. In animal models, the use of intra-articular corticosteroids has shown a protective effect on cartilage; however, clinical studies have not shown changes in the natural story of OA. Experimental studies with gold nanoparticles (GNPs) have demonstrated joint antioxidant and anti-inflammatory effects. In addition, the combination of GNPs with drugs, aiming at therapeutic optimization, has been tested, with varied results. In the present study, the anti-inflammatory and antioxidant effects of intra-articular treatment of TH associated with GNPs were evaluated in a mechanical model of OA. For this, the OA model was induced by medial meniscectomy of the right posterior limb, in 50 Wistar rats, 2 months old, weighing between 250-300g. The animals were divided into 5 groups of 10 animals, corresponding to the groups: 1) sham, 2) OA, 3) OA treated with TH (OA-TH), 4) OA treated with GNPs (OA-GNPs) and 5) OA treated with TH-associated GNPs (OA-TH-GNPs). The levels of Interferon-gamma (IF $\gamma$ ), Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6), interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10), nitrite, dichlorofluorescein (DCF), Superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), carbonyl and sulfhydryl were analyzed. The results of the experiment demonstrated a reduction in TNF $\alpha$  levels and an increase in IL-6 levels in the TH-GNPs group. An increase in the levels of IL-4 and IL-10 was observed in the groups OA-TH, OA-GNPs and OA-TH-GNPs. There was a significant increase in TGF- $\beta$  levels in the OA-TH-GNPs group. All groups treated with TH and/or GNPs had a significant reduction in the levels of Nitrite and Carbonyl compared to the OA group. An increase in sulfhydryl levels was observed in the OA-TH-GNPs group compared to the OA group. In the evaluation of the antioxidant system activity, through the activity of the SOD and GSH enzymes, there was an increase in the activity of these enzymes in the OA-GNPs and OA-TH-GNPs groups compared to the OA group. The results of this study indicate anti-inflammatory and antioxidant activity of the therapies performed, being more pronounced in the group that received the association between TH-GNPs. These results may be related to the pharmacokinetics of TH when associated with GNPs or additive effects of the two therapies.

**Keywords:** osteoarthritis, gold nanoparticles, triamcinolone hexacetonide, anti-inflammatory, antioxidant

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1 Osteoartrite.....	9
1.2 Papel da inflamação na osteoartrite .....	11
1.3 Estresse oxidativo na osteoartrite .....	13
1.4 Osteoartrite e terapia intra-articular com corticoide.....	15
1.5 Osteoartrite e nanopartículas de ouro .....	16
1.6 Justificativa e relevância.....	18
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>19</b>
3.1 Tipo de pesquisa .....	20
3.2 Amostra .....	20
3.3 Modelo de osteoartrite .....	20
3.4 Intervenção.....	22
3.5 Síntese e caracterização das GNPs .....	23
3.6 Determinações do conteúdo de citocinas .....	24
3.7 Análises bioquímicas .....	24
3.7.1 Oxidantes.....	24
3.7.2 Marcadores de danos oxidativos.....	25
3.7.3 Defesas antioxidantes.....	25
3.7.4 Conteúdo de Proteínas .....	26
3.8 Procedimento para análise de dados .....	26
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Caracterização das GNPs .....	26
4.2 Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.....	27
4.3 Avaliação dos níveis de citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento.....	28
4.4 Avaliação dos níveis de oxidantes.....	29
4.5 Dano oxidativo .....	30
4.6 Sistema antioxidante .....	31
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>

<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>48</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Osteoartrite

A osteoartrite (OA) primária é uma doença complexa de etiologia multifatorial que pode afetar muitas articulações diferentes, sendo uma das principais causas de incapacidade na população. A OA é caracterizada por processos morfológicos, bioquímicos, moleculares e alterações biomecânicas teciduais e de matriz extracelular, sendo que o entendimento fisiopatológico dessa doença vem evoluindo recentemente. Anteriormente essa doença foi descrita como sendo originada por alterações degenerativas na cartilagem articular isoladamente; porém, atualmente, a literatura mostra essa condição como uma doença multifatorial que afeta todas as estruturas da articulação. Uma interação de fatores locais e sistêmicos modula sua forma de apresentação clínica e estrutural, levando ao desfecho final comum de destruição articular (Martel-Pelletier *et al.*, 2016).

A prevalência e incidência de OA descrita na literatura é bastante heterogênea devido às suas subclassificações como sintomática, radiográfica ou relacionada à articulação acometida. De forma geral as taxas de incidência variam de acordo com as regiões estudadas, com estimativas de 91 a 347 novos casos por 100.000 habitantes, sendo maior em países de alta renda e menor nos países de baixa renda. É observado também, menor incidência em negros, quando comparada a caucasianos (Neogi e Zhang, 2013; Nelson, 2018). Estima-se que o risco ao longo da vida de desenvolver OA sintomática do joelho é de aproximadamente 40% em homens e 47% em mulheres (Murphy *et al.*, 2008).

Existem múltiplos fatores de risco identificados para o desenvolvimento de OA. A idade é um dos mais fortes preditores de OA, com incidência crescente, especialmente após os 50 anos de idade. Existe associação com o sexo feminino, obesidade, predisposição genética, presença de lesão articular prévia e fatores anatômicos locais como alinhamento e sobrecarga (Johnson e Hunter, 2014).

Há uma variedade de fatores que desempenham papel importante na patogênese da OA, incluindo fatores biomecânicos, mediadores pró-inflamatórios e proteases. Com exceção de um trauma específico que gerou lesão articular, é difícil definir patologicamente quais tecidos (cartilagem, osso ou sinóvia) são afetados primeiramente na OA (Johnson e Hunter, 2014).

A cartilagem articular é formada pelos condrócitos, sendo um tecido avascular e aneural, composto de água (>70%) e componentes de matriz extracelular orgânica, principalmente colágeno do tipo II, agreganos, proteoglicanos, e vários outros colágenos e proteínas não-colágenas. Sua função é principalmente fornecer uma superfície lisa e de baixo atrito, permitindo o deslizamento normal da articulação. Na OA observa-se edema da cartilagem, afrouxamento da estrutura de colágeno, aumento da síntese de proteoglicanos associado a aumento desproporcional na liberação de enzimas degradativas (principalmente MMP-13) resultando em degradação da matriz. Este processo, associado a limitada capacidade de reparo da cartilagem, resulta em progressivo estreitamento do espaço articular, fissuras e exposição do osso subjacente em estados avançados (Wilusz et al., 2014; Heinemeier et al., 2016).

O osso abaixo da cartilagem articular é organizado em uma camada de osso cortical em forma de placa e uma região contígua de osso esponjoso. Na OA, existe aumento no volume, espessura e contorno da placa cortical, alterações no estado de mineralização óssea, na arquitetura óssea trabecular subcondral e massa óssea, e formação de cistos ósseos, lesões na medula óssea e osteófitos. As alterações do osso subcondral são mais evidentes nos locais de maior sobrecarga articular e influenciam de forma negativa o estado da cartilagem articular sobreposta (Day et al., 2004; Taljanovic et al., 2008).

A sinóvia apresenta algum grau de inflamação sinovial e/ou hipertrofia sinovial durante o curso da OA, sendo relacionada à disfunção dos condrócitos e ao dano cartilaginoso. Observa-se liberação de proteinases pelos condrócitos que em uma cascata de eventos culmina na liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-15) (Houard et al., 2013). Ao contrário de outras artropatias inflamatórias, como a artrite reumatoide, a inflamação sinovial não é considerada o fator inicial da OA primária, mas está associada ao desenvolvimento de dor e progressão estrutural da doença (Wang et al., 2018). Além das alterações sinoviais, observa-se alterações na cápsula articular, ligamentos, músculos periarticulares e nervos que contribuem para perda de função e dor (Roos et al., 2011).

Os tratamentos recomendados atualmente para OA envolvem medidas farmacológicas e não-farmacológicas. Medidas não farmacológicas fortemente recomendadas são principalmente exercícios aeróbicos, aquáticos e/ou resistidos, e perda ponderal para pacientes com excesso de peso. As principais medidas

farmacológicas envolvem o uso de paracetamol, anti-inflamatórios não esteroides orais e tópicos, duloxetina, opioides e infiltrações articulares de glicocorticoide e ácido hialurônico (Hochberg et al., 2012).

## **1.2 Papel da inflamação na osteoartrite**

A OA previamente era considerada apenas uma doença relacionada ao “desgaste” da cartilagem, geralmente considerada com processo final de qualquer patologia que gerasse aumento da pressão sobre a articulação ou fragilidade da matriz cartilaginosa. Estudos da década de 1990 modificaram este paradigma, e atualmente papel da inflamação na OA é bem caracterizado (Berenbaum, 2013).

Clinicamente a inflamação é evidenciada pela presença de edema articular ou derrame articular da articulação afetada. Há uma lista crescente de alterações e mediadores pró-inflamatórios encontrados no líquido sinovial e tecidos afetados pela OA, mas os mecanismos iniciadores deste processo ainda são objeto de estudo e controvérsia (Sellam; Berenbaum, 2010). A hipótese mais aceita postula que a cartilagem fragmentada dentro da articulação seja interpretada pelo tecido sinovial como um corpo estranho, levando a produção de citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , por estas células. Esses mediadores induzem os condrócitos a produzirem proteases, quimiocinas, óxido nítrico (NO) e eicosanoides, tais como prostaglandinas e leucotrienos, aumentando a degradação da cartilagem e promovendo a apoptose celular. Os mediadores também podem induzir angiogênese sinovial e gerar um feedback positivo na produção destes mediadores, formando um ciclo vicioso. Assim, a sinovite resultante perpetua a degradação da cartilagem (Sellam e Berenbaum, 2010; Stannus et al., 2010).

Uma característica da OA estabelecida é o aumento da produção local de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , IL-6, proteína quimiotática de macrófagos (MCP-1), proteína induzida por interferon (IP-10) e monoquina induzida por interferon (Sohn et al., 2012). A presença de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  exercem efeitos catabólicos comparáveis no metabolismo do condrócito, diminuindo a síntese de colágeno, proteoglicano e aumentando a liberação de agregcan, através da indução de proteases. Estas citocinas também induzem condrócitos e células sinoviais a produzir outros mediadores inflamatórios, tais como IL-8, IL-6, NO e prostaglandina E2 (Loo et al., 1995; Caron et al., 1996; Attur et al., 2000; Pelletier et al., 2001; Tchetina et al., 2007).

Observa-se também que a expressão da ciclooxygenase-2 indutível (COX-2) está aumentada, associada a uma produção espontânea aumentada de PGE<sub>2</sub>. Os efeitos das prostaglandinas no metabolismo dos condrócitos são complexos e incluem síntese de colágeno tipo II, ativação de metaloproteinases (MMPs), e promoção de apoptose (Amin et al., 1997). Muitos destes caminhos catabólicos e pró-inflamatórios observados na OA são mediados pela ativação do fator nuclear do fator de transcrição  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), que retroalimenta positivamente sua própria expressão e de outras proteínas catabólicas, tais como óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e COX-2, criando assim uma cascata autocatalítica que promove autodestruição da cartilagem articular (Olivotto et al., 2015).

Uma presumida ação chave das citocinas e quimiocinas produzidas na OA é promover a proteólise da cartilagem através da indução de uma ampla gama de proteases, em particular MMPs. As duas principais famílias de MMPs envolvidas neste processo são as colagenases e agrecanases. As colagenases decompõem os proteoglicanos e colágeno tipo II, principal tipo de colágeno presente na cartilagem. A principal colagenase implicada no processo da OA é a MMP-13. As agrecanases, também conhecidas como família ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*), principalmente ADAMTS-4 e ADAMTS-5, regulam a degradação dos agrecanos, que consistem em grandes proteoglicanos responsáveis por grande parte da resiliência da cartilagem ao dano (Troeberg e Nagase, 2012). Dada a importância da ADAMTS-5 e da MMP-13 na OA, o desenvolvimento de inibidores específicos para estas proteases tem sido de interesse para uso como terapia potencial modificadora da osteoartrite.

A expressão e degradação de proteínas não colagenosas e proteoglicanos não-agregantes também são alterados na cartilagem acometida pela OA, e suas funções precisas estão apenas começando a ser compreendidas. Essas moléculas podem ter um papel estrutural ou regulador e, em alguns casos, podem fazer as duas coisas, já que se sabe que os produtos de degradação de algumas das moléculas estruturais influenciam diretamente o catabolismo dos condrócitos (Aigner e McKenna, 2002).

Com relação à inibição das principais citocinas envolvidas na OA, dados de camundongos nocautes de IL-1 $\beta$  mostraram proteção inconsistente na OA induzida cirurgicamente, enquanto os camundongos nocautes de IL-6 foram protegidos de OA induzida por lesão, mas não da OA associada à idade, os quais apresentaram

resultado histológico pior do que os controles (Little e Fosang, 2010). Em um estudo com humanos, o uso de anticorpo monoclonal contra o TNF- $\alpha$  não demonstrou benefícios na dor e sinovite em indivíduos com OA de mãos (Aitken et al., 2018).

Contraopondo-se ao exposto acima, a família do Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- $\beta$ ), formada pelo TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3, representa os principal fator contra-regulatório aos efeitos dos mediadores pró-inflamatórios na cartilagem saudável. Dentre suas ações, observa-se diminuição da ação proteolítica da MMP-1 e MMP-13, bem como redução dos receptores de IL-1 e TNF- $\alpha$  nos condrócitos (Tchetina et al., 2007). O TGF- $\beta$ 2 suprime seletivamente a clivagem do colágeno tipo II por collagenases na cartilagem e limita a expressão de MMPs e citocinas pró-inflamatórias (Moulharat et al., 2004). Outras ações observadas são o aumento na síntese proteica da matriz, inibição da hipertrofia dos condrócitos e estimulação à expressão do Prg4, molécula que codifica a lubricina, crítica para diminuir o atrito das articulações (Cuellar e Reddi, 2015).

A inativação do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) ou das moléculas relacionadas a sua via de sinalização parece ter um importante papel na patogênese da OA, pois mutações de Smad3, uma molécula central nesta via, foram encontradas em pacientes com OA de início precoce (Valdes et al., 2010).

### **1.3 Estresse oxidativo na osteoartrite**

Estudos recentes concluíram que a progressão da OA está significativamente relacionada ao estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo um interesse de pesquisa e de intervenção terapêutica (Lepetsos e Papavassiliou, 2016).

ERO são radicais livres contendo moléculas de oxigênio, incluindo radical hidroxila radical ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), óxido nítrico (NO) e íon hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ). Os seus principais sítios de geração são as mitocôndrias (através da fosforilação oxidativa), a fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) oxidase não mitocondrial ligada à membrana e a xantina oxidase (XO). O sítio com maior participação na geração de ERO é a mitocôndria, estimando-se que 2-3% do total de  $\text{O}_2$  utilizado seja reduzido a  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , ao invés de água (Lepetsos e Papavassiliou, 2016).

As enzimas NADPH oxidase (NOxes) são as principais fontes de ERO em fagócitos, e a XO é fonte através da catalisação da oxidação de hipoxantina à xantina, produzindo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Diversos mecanismos evoluíram para eliminar ERO em espécies que utilizam oxigênio para produção de energia. Este sistema antioxidante inclui antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidica (GPX), glutatona (GSH), NADPH ubiquinona oxidoreductase (NQO1), paraoxonases (PON), ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e carotenoides. O estresse oxidativo foi definido como desequilíbrio entre a produção de ERO e defesas antioxidantes, resultando em danos macromoleculares e desregulação no controle e sinalização redox (Lepetsos e Papavassiliou, 2016).

Em condrócitos de articulações normais as ERO são produzidas em baixos níveis e participam da homeostase da cartilagem ao modularem a apoptose de condrócitos, expressão gênica, síntese e degradação da matriz extracelular e produção de citocinas. Em articulações afetadas por OA, é observado elevado nível de produção de ERO e estresse oxidativo, paralelamente associado à redução de enzimas antioxidantes (Lepetsos e Papavassiliou, 2016).

Na OA, as principais alterações patológicas ao nível celular observadas como a senescência celular, apoptose e os efeitos do envelhecimento celular sofrem influência regulatória das ERO (Ziskoven et al., 2010). O excesso de produção de ERO e NO tem sido associado à apoptose de condrócitos de cartilagem tanto *in vitro* como *in vivo*, desempenhando um papel importante na patogênese da OA, pois os condrócitos são normalmente quiescentes e não possuem capacidade de autorrenovação adequada. O NO é o indutor primário deste processo, mediado pela ativação de caspase-3, caspase-9 e tirosina quinase, levando a regulação positiva da iNOS (Lepetsos e Papavassiliou, 2016). Há evidência que o estresse oxidativo também induz a instabilidade genômica dos telômeros, a senescência replicativa e a disfunção dos condrócitos. A senescência dos condrócitos é caracterizada pela redução na divisão celular e alterações fenotípicas, como a expressão alterada de enzimas catabólicas (Ziskoven et al., 2010).

A produção de NO, e subsequentemente peroxinitrito, é um dos principais fatores catabólicos produzidos por condrócitos em resposta a citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , gerando inibição da síntese de matriz extracelular e perda de integridade da cartilagem, através da inibição a síntese de

proteoglicanos na zona de cartilagem superficial e profunda (Lepetsos; Papavassiliou, 2016). Efeitos adicionais incluem ativação de MMPs (Hirai et al., 2001) e suscetibilidade de lesão aumentada à outros oxidantes (Clancy et al., 1997).

#### **1.4 Osteoartrite e terapia intra-articular com corticoide**

O objetivo de curto prazo do tratamento da OA é aliviar dor e rigidez articular para aumentar a função e mobilidade. Um objetivo à longo prazo seria que o tratamento interrompesse ou lentificasse a progressão da doença, evitando incapacidade funcional e prevenindo, ou pelo menos atrasando, a necessidade de uma artroplastia (McAlindon et al., 2014).

Juntamente com as estratégias de manejo não farmacológico, terapias sistêmicas e intra-articulares são as principais intervenções no manejo conservador desta doença (McAlindon et al., 2014). As terapias intra-articulares constituem procedimentos minimamente invasivos e de caráter ambulatorial que apresentam uma série de vantagens fisiológicas e práticas sobre a utilização medicamentos sistêmicos. Algumas dessas vantagens são: segurança, biodisponibilidade, benefício pelo efeito placebo e possibilidade de ação de certos medicamentos diretamente na fisiopatologia da OA. Os medicamentos mais utilizados por esta via são os glicocorticoides (GC) e o ácido hialurônico (Evans et al., 2014).

O uso de GC intra-articulares têm como objetivo reduzir a inflamação e dor nas articulações, em virtude de sua ação local como um agente anti-inflamatório potente. Diretrizes da *American College of Rheumatology* recomendam seu uso para alívio sintomático da dor moderada a severa em pacientes com OA, efeito que pode durar até 6 semanas. Preparações de triancinolona são as mais utilizadas neste contexto (Hochberg et al., 2012).

O tratamento com GC intra-articular demonstrou ter um efeito protetor sobre a cartilagem articular em modelos *in vitro* de dano estrutural/químico e em modelos animais de artrite inflamatória e OA (Larsson et al., 2004; Lu et al., 2011). No estudo *in vitro* de Lu et al. (2011), a utilização por curto período de GC aboliu efetivamente os efeitos catabólicos resultantes da combinação de citocinas pró-inflamatórias e lesão mecânica, prevenindo a degradação de proteoglicanos e restaurando a biossíntese do condrocito, demonstrando efeito regulatório sobre esta resposta induzida.

De forma contrária, um estudo prévio em humanos com OA de joelho demonstrou que a administração trimestral por 2 anos de triancinolona intra-articular, em comparação com a solução salina intra-articular, resultou em discreta diminuição da espessura da cartilagem mensurada por ressonância magnética no grupo triancinolona (McAlindon et al., 2017). Estes resultados sugerem que em vez de retardar a destruição da cartilagem, a triancinolona pode acelerar o processo, e que os seus efeitos anti-inflamatórios não agem como um agente modificador da evolução da doença, pelo menos neste período de tempo. Entretanto, esta diferença observada na espessura da cartilagem provavelmente não é clinicamente relevante e significativa, pois é semelhante ao grau de perda de cartilagem relatado na literatura em pacientes que não demonstram progressão radiográfica ou clínica da OA (Collins et al., 2016)

Efeitos adversos relacionados ao uso intra-articular de GC incluem hiperglicemia, infecção articular, calcificações intra-articulares e periarticulares, atrofia cutânea e despigmentação cutânea, principalmente quando utilizado repetidamente para o tratamento da OA (Wernecke et al., 2015). Na revisão sistemática de Wernecke et al. (2015) sobre os efeitos de GC intra-articulares, observou-se que o tempo de exposição e a dose utilizada destes medicamentos é o principal determinante da sua ação sobre os condrócitos e estruturas articulares. Efeitos benéficos são observados quando GC são utilizados por curto tempo e em baixas doses; porém, altas doses e tempo de exposição prolongado dessas substâncias resultam em condrotoxicidade. Portanto, estratégias que aperfeiçoem a utilização de GC no tratamento da OA são desejáveis.

### **1.5 Osteoartrite e nanopartículas de ouro**

Compostos de ouro têm sido empregados para o tratamento de doenças reumatológicas inflamatórias desde 1929 (Forestier, 1934). Os principais compostos, Aurofinina e Aurotiomalato de Sódio foram progressivamente abandonados da prática clínica a partir da década de 1980 em virtude do surgimento de novos medicamentos eficazes e com menor incidência de efeitos adversos, principalmente renais e cutâneos (Felson et al., 1990). Mais recentemente com o desenvolvimento da nanotecnologia, o uso de nanopartículas de ouro vem sendo investigado no tratamento de artrite experimental, demonstrando efeitos benéficos articulares e

redução dos efeitos adversos, comparativamente aos compostos de ouro previamente utilizados (Tsai et al., 2007).

Nanomateriais, com uma faixa de tamanho de 1 a 1000 nm de diâmetro, exibem várias propriedades únicas que diferem grandemente daquelas observadas em partículas finas ou materiais a granel. Há potencial para muitas aplicações biomédicas, devido a sua grande superfície específica, alta atividade de superfície, forte propriedade antioxidante, boa biocompatibilidade, e adequação para manipulações em nível molecular (Kong et al., 2017).

A lista de nanomateriais atualmente disponíveis é extensa, dentre eles as Nanopartículas de Ouro (GNPs) são interessantes em virtude de suas propriedades óticas, eletrônicas, sensoriais e bioquímicas únicas (Kong et al., 2017). As GNPs são nano-carreadores promissores para entrega de fármacos devido às suas propriedades únicas como síntese e funcionalização facilitada, biocompatibilidade, facilidade na permeabilidade celular e alta capacidade de carregamento de fármacos (Kim et al., 2009).

Estudos experimentais em modelo de artrite e OA demonstram que GNPs exercem efeitos antioxidantes e efeito anti-inflamatório pela regulação negativa da expressão de interleucina 1 $\beta$ , prostaglandina E2 e ciclooxigenase-2, além de redução dos escores histológicos, densidade de microcapilares e infiltração de macrófagos (Tsai et al., 2007; Sumbayev et al., 2013).

A conjugação de medicamentos com GNPs, visando sua otimização terapêutica, vem sendo estudada. Em um estudo experimental de OA, a conjugação de GNPs de 13nm com sulfato de condroitina (SC) demonstrou um aumento de duas vezes na produção de glicosaminoglicanos e colágeno em comparação com SC isolado, indicando que esta combinação estimulou a proliferação de condrócitos e aumentou a produção de matriz extracelular (Dwivedi et al., 2015). Outro estudo de OA experimental conjugou curcumina com GNPs de 20nm, porém não demonstrou diferença significativa nos resultados comparativamente ao uso isolado de cada substância (Campos et al., 2017).

A literatura contém dados conflitantes sobre a citotoxicidade de GNPs. O tamanho e forma das GNPs definem substancialmente suas propriedades. As GNPs são consideradas "não-tóxicas" de acordo com muitos relatórios em diferentes linhas celulares (Connor et al., 2005; Shukla et al., 2005). Em contrapartida, outros grupos classificam as GNPs como "tóxicas", demonstrando estresse oxidativo, dano

mitocondrial, apoptose e necrose celular associada ao seu uso (Goodman et al., 2004; Pan et al., 2009., Huang et al., 2016) . Estes resultados conflitantes podem ser relacionados à variabilidade dos ensaios de toxicidade, das linhas celulares utilizadas e das propriedades físico/químicas das nanopartículas utilizadas. Estudos em cultura de condrócitos de coelho e humano demonstraram citotoxicidade dependente do tamanho e concentração de GNPs utilizadas (Pascarelli et al., 2013; Huang et al., 2016).

Diante do exposto acima e dos resultados conflitantes na literatura, é prudente que novos trabalhos avaliem a eficácia, toxicidade e aplicabilidade terapêutica das GNPs em modelos experimentais de patologias.

## **1.6 Justificativa e relevância**

Justifica-se este estudo em virtude da alta prevalência e incidência de OA na população, sendo importante a investigação de novas terapias para tratamento desta condição, associada à escassez de tratamentos efetivos disponíveis atualmente.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do tratamento intra-articular com TH associada a GNPs em um modelo mecânico de OA em ratos Wistar.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias (IF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) na articulação do joelho dos animais submetidos ao modelo mecânico de OA.
- Avaliar níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) na articulação do joelho dos animais submetidos ao modelo mecânico de OA
- Avaliar produção de oxidantes (DCF e nitrito), sistema de defesa antioxidante (SOD e GSH) e danos oxidativos (carbonila e sulfidril) na articulação do joelho dos animais submetidos ao modelo mecânico de OA

## **3 METODOLOGIA**

### 3.1 Tipo de pesquisa

Este estudo foi caracterizado como experimental, utilizando um modelo animal. Os procedimentos foram executados de acordo com o Instituto Nacional de Guia de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) projetado para minimizar o sofrimento e limitar o número de animais utilizados. O experimento teve início após aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) sob o protocolo 61/2019-1.

### 3.2 Amostra

Foram utilizados 50 ratos Wistar (2 meses, pesando entre 250-300g), provindos da colônia de reprodução do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. Cada grupo teve um “n” de dez animais devido às análises histológicas, bioquímicas e moleculares. Os animais foram agrupados em gaiolas específicas (comprimento 30 cm x Largura 20 cm x altura 13 cm) colocados sobre estantes e sobre os cuidados dos funcionários do Biotério. A temperatura do ambiente foi controlada entre  $20 \pm 2$  °C, ciclo claro-escuro 12/12h e com livre acesso, alimentados com dieta padrão para roedores e água do sistema público de fornecimento (torneira) colocado em mamadeiras para roedores e ofertada *ad libitum*. Os animais foram distribuídos randomicamente em 5 grupos experimentais (n:10):

- Grupo 1 - Sham
- Grupo 2 – OA
- Grupo 3 - OA + TH
- Grupo 4 - OA + GNPs
- Grupo 5 - OA + TH-GNPs

### 3.3 Modelo de osteoartrite

O modelo de OA mecânica está baseado na ressecção do menisco medial, pois é neste compartimento onde passa o eixo mecânico de distribuição de carga durante a locomoção dos mamíferos. O menisco é uma estrutura fibrocartilaginosa, de formato cuneiforme, responsável pela adaptação, e congruência articular, entre uma superfície côncava dos côndilos do fêmur distal e outra superfície plana do planalto tibial e, é também responsável pela absorção, em função da sua propriedade viscoelástica, da carga aplicada sobre a articulação em sua biomecânica.

Os ratos foram anestesiados e mantidos sob anestesia usando isoflurano 4%. O joelho direito foi raspado, preparado assepticamente com álcool 90%, e exposto para a cirurgia. Em todos os modelos foi realizada a mesma abordagem cirúrgica, baseada na incisão padrão executada nos procedimentos de artroplastia, colocação de próteses, no tratamento de OA severa em humanos. Trata-se de uma abordagem cirúrgica anterior do joelho, seguida de artrotomia parapatelar medial e luxação lateral da patela, permitindo acesso ao compartimento medial do joelho dos animais (Vaishya et al., 2016). Todas as abordagens cirúrgicas nos animais foram realizadas no membro traseiro direito, seguindo o modelo acima descrito. As incisões cirúrgicas foram fechadas em duas camadas, utilizando-se suturas de fio monofilamentar de nylon após redução da luxação patelar.

No grupo sham foi realizada somente a abordagem cirúrgica, sem a meniscectomia, seguida de fechamento da incisão em dois planos. Nos outros grupos a meniscectomia do menisco medial foi realizada após a abordagem anterior, seguida da artrotomia e da luxação patelar. A ressecção completa do menisco medial do membro posterior direito foi realizada com lâmina de bisturi (frio) sem ressecção adicional do ligamento colateral medial, que foi preservado. Não houve acesso algum ao compartimento lateral da articulação, assim como ressecção adicional de ligamentos em nenhum dos procedimentos. Foram preservados os ligamentos centrais do joelho (cruzado anterior e posterior) e os ligamentos colaterais (lateral e medial).

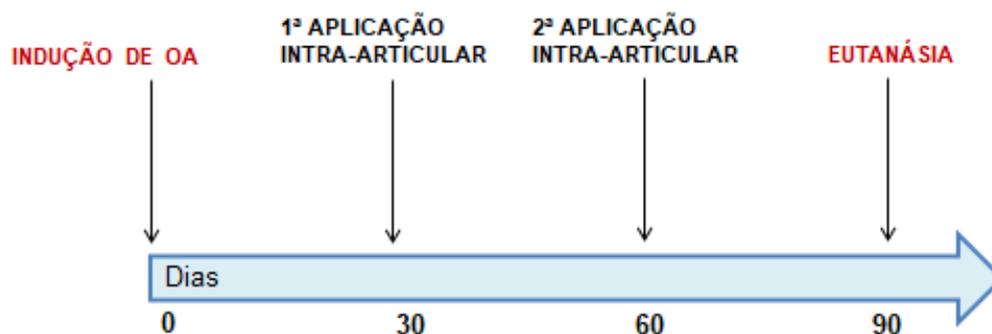


**Figura 1: Meniscectomia do menisco medial.** Imagem demonstrando peça anatômica do menisco medial ressecado (Fonte: Búrigo, MCF, 2018).

### 3.4 Intervenção

Os tratamentos intra-articulares foram realizados nos dias 30 e 60 após a indução do modelo de OA com uma aplicação da solução designada para cada grupo de tratamento (300 $\mu$ L). Após 30 dias da última aplicação os animais foram anestesiados com isoflurano 4% e levados a eutanásia por decapitação. A região do côndilo femoral e do platô tibial do membro posterior direito foi cirurgicamente removida, processada e armazenada para posteriores análises histológicas, bioquímicas e moleculares. As soluções de TH (30 $\mu$ g/300 $\mu$ l salina), GNPs (Tamanho 20nm e concentração de 2,5 mg/Kg) e sua ligação (TH-GNPs) foram preparadas nos dias de tratamento.

Os animais foram retirados do biotério e levados à sala de treinamento do Fisiopat aonde foi realizado o tratamento. Tais procedimentos foram realizados por pessoas treinadas em manusear ratos Wistar.



**Figura 2: Linha do tempo do experimento.** Indução de OA no dia 0, aplicação da solução designada para cada grupo no dia 30 e 60, e realização de eutanásia no dia 90.

### 3.5 Síntese e caracterização das GNPs

GNPs de tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich et al. (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) com o agente redutor e estabilizante citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Nuclear, SP, Brasil). O controle dimensional das nanopartículas foi efetuado variando-se a concentração do agente redutor. Inicialmente, 100 mL de 0,50 mM de ácido tetracloroáurico, foram transferidos para um balão de fundo redondo, a solução aquecida até 90 °C e sob agitação a 700 rpm. Solução de citrato de sódio, previamente preparada, foi então adicionada, e o sistema foi mantido à temperatura descrita, agitando a 200 rpm durante 20 minutos. As soluções adquirem as colorações correspondentes a cada tamanho de GNPs sintetizadas apresentando um pH de 5,8. Por conseguinte, o pH foi ajustado a pH fisiológico com solução tampão e, posteriormente, centrifugadas (13.000 rpm por 15 min), lavadas duas vezes com água ultrapura e, finalmente, disperso em solução salina onde a concentração da solução também será ajustada.

Para análise da morfologia e estimativa do tamanho médio das GNPs utilizou-se a técnica Microscopia Eletrônica Transmissão da marca JEOL, modelo JEM 2100F de 100kV, que se encontra alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Na preparação das amostras, uma gota da solução da Triancinolona + GNPs foi adicionada em um grid contendo carbono (grid de cobre – 200 mesh). Após o tempo de secagem dos grids (24 horas), as imagens foram obtidas.

As análises de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em espectrômetro Agilent Technologies (Cary 600 Series). Para obtenção dos espectros, amostras de GNPs secas a 60°C foram incorporadas em KBr, seguido da compressão para formação de pastilhas. As análises foram conduzidas com varreduras na faixa de 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.6 Determinações do conteúdo de citocinas

As amostras foram processadas e após foi sensibilizado a placa para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem das citocinas (IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) foi utilizado o método *Enzyme-linked immuno absorbent assay* (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA). Os resultados foram expressos em pg/mg de proteína.

### 3.7 Análises bioquímicas

#### 3.7.1 Oxidantes

**Diclorofluoresceína DCFH-DA:** A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'diclorofluoresceína (DCFHDA) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'diclorodihidrofluoresceína (DCFHDA) por ERRO. Os valores foram expressos em unidades de fluorescência/mg de proteína (Lebel; Ischiropoulos; Bondy, 1992).

**Indicador da Formação de Oxido Nítrico (NO):** A produção de NO foi avaliada espectrofotometricamente através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, as amostras foram incubadas com reagente Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 minutos e a absorbância será medida a 540 nm. O conteúdo de nitritos foi calculado com base numa curva padrão de 0 a 100 nM realizada com o metabólito nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ). Os resultados foram calculados em  $\mu\text{mol}$  Nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

### 3.7.2 Marcadores de danos oxidativos

**Conteúdo de Proteínas Oxidadas:** foi determinado a partir do conteúdo total de tióis na presença de DTNB e lido e espectrofotometricamente a 412nm (Aksenov; Markesbery, 2001). Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol TNB/mg}$  de proteína.

**Carbonilação de Proteínas:** A oxidação de proteínas foi determinada mediante a quantificação de proteínas carboniladas através da reação de grupos carbonilas com a dinitrofenilhidrazina. Essa reação gera a formação de hidrazonas correspondentes. O conteúdo de carbonilas foi determinado espectrofotometricamente a 370nm como previamente descrito por Levine et al (1990). Os resultados foram calculados como nmol/mg de proteína empregando o coeficiente de extinção molar de dinitrofenilhidrazonas de  $22.000 \text{ L. M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

### 3.7.3 Defesas antioxidantes

**Superóxido Dismutase (SOD):** Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese (2006). As amostras de tecido ósseo foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15  $\mu\text{l}$  foram retirados da mesma, a qual 5 ml de catalase (0,0024 mg/mL de água destilada), tampão de glicina 175185mL (0,75g em 200 ml de água destilada a 32°C, pH 10,2), 5ul adrenalina (60mM em água destilada +15ml/ml de HCl fumegante) foram adicionados. As leituras foram realizadas por 180s em intervalos de 10s e medido em leitor de ELISA a 480nm. Os valores foram expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

**Glutationa (GSH):** Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin & Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurado em homogenato ósseo após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Em parte da amostra foi adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500  $\mu\text{M}$  DTNB. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atinge um máximo em 5 minutos e mantém-se estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutaciona

reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol/mg}$  de proteína.

### 3.7.4 Conteúdo de Proteínas

O teor de proteína a partir de tecido ósseo homogeneizado foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão (Lowry et al., 1951). Reagente fosfomolibdicofosfotúngstico (Folin fenol) foi adicionado para ligar-se à proteína. O reagente foi lentamente reduzido passando de amarelo para azul. Absorbância foi lida a 750nm.

### 3.8 Procedimento para análise de dados

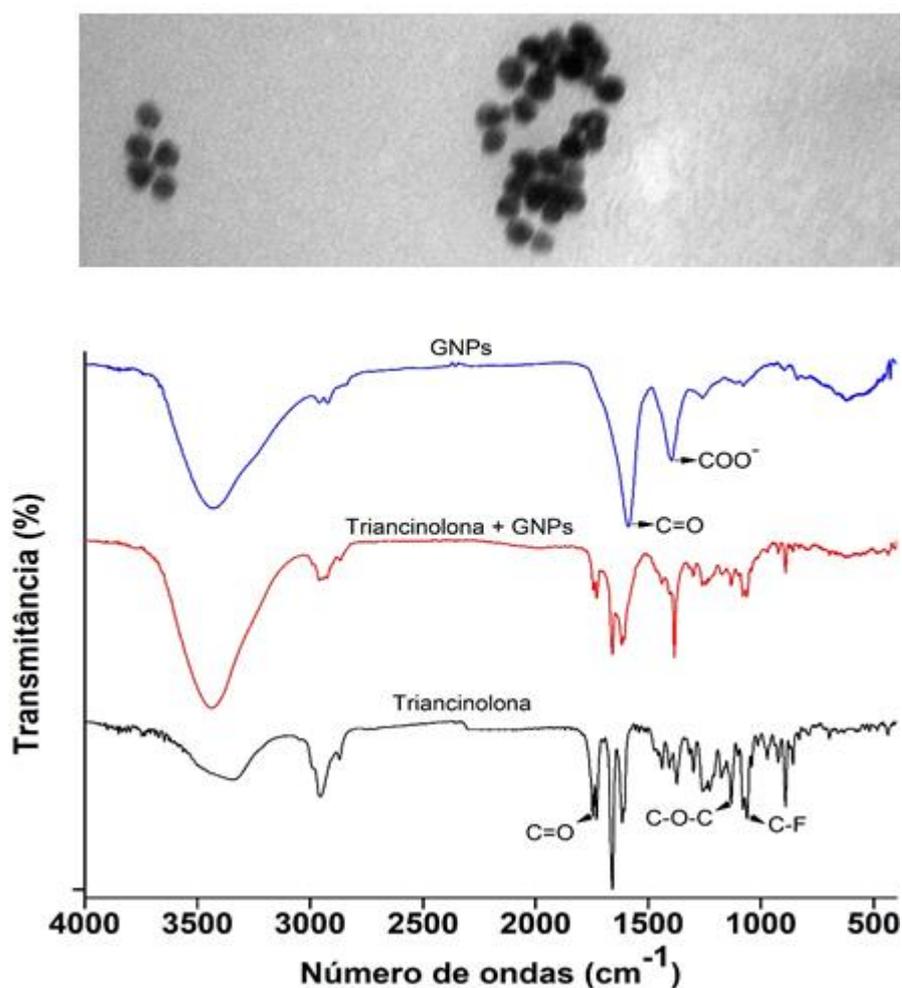
Os dados foram expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico foi de  $P < 0,05$ . Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das GNPs

A partir das análises de TEM (Figura 3), pode ser observado que as GNPs apresentaram um tamanho na faixa de 20nm e morfologia esférica (Vechia et al. 2020). A presença da triancinolona não alterou a morfologia das GNPs. Para confirmação da funcionalização da superfície do GNPs pelos íons citrato e para avaliar possíveis interações entre a triancinolona e as GNPs, análises de FTIR foram realizadas (Figura 3). Como pode ser observado na Figura X, as GNPs apresentaram pico do grupo citrato em  $1588 \nu$  (C=O) e  $1394 \nu$  (COO<sup>-</sup>), confirmando a formação das GNPs (Vechia et al. 2020). Triancinolona puro apresentou picos de absorção em  $3392 \text{ cm}^{-1}$  (O-H) e a  $1735 \text{ cm}^{-1}$  (C=O). Outros picos são característico da triancinolona acetona em  $1129 \text{ cm}^{-1}$  (C-O-C) e a  $1055 \text{ cm}^{-1}$  (C-F) (García-Millán et al. 2017). Os resultados não confirmaram qualquer ligação covalente entre a triancinolona e as

GNPs, no entanto outras análises são necessárias. Por fim, pode-se sugerir uma ligação eletrostática (não covalente) entre a triancinolona e as GNPs.

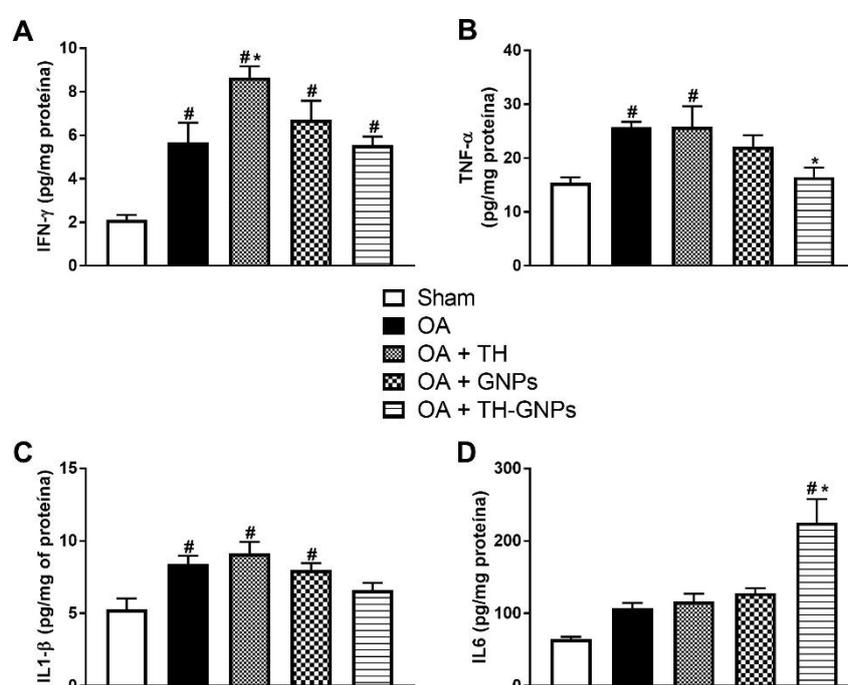


**Figura 3.** Análises de espectrometria por ATR-FTIR da triancinolona, GNPs e TH + GNPs.

#### 4.2 Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias

Na figura 4 estão representados os níveis das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Observa-se, conforme a figura 4A, que os grupos OA, OA + TH, OA + GNPs e OA + TH-GNPs apresentaram um aumento significativo de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo Sham, sendo que o grupo OA + TH apresentou aumento significativo em relação ao grupo OA nesta citocina específica. Na Figura 4B observou-

se que o TNF- $\alpha$  apresentou aumento significativo nos grupos OA e OA+TH em relação ao grupo Sham, e demonstrou-se redução significativo desta citocina no grupo OA + TH-GNPs quando comparado ao grupo OA. Na figura 4C observa-se aumento significativo de IL1 $\beta$  nos grupos OA, OA + TH e OA + GNPs em relação ao grupo Sham. Os níveis de IL-1 $\beta$  no grupo TH-GNPs foram semelhantes ao grupo Sham. Na figura 4D observamos aumento significativo de IL-6 no grupo OA + TH-GNPs em relação ao grupo OA e grupo Sham, sem diferença significativa nos demais grupos intervenção.

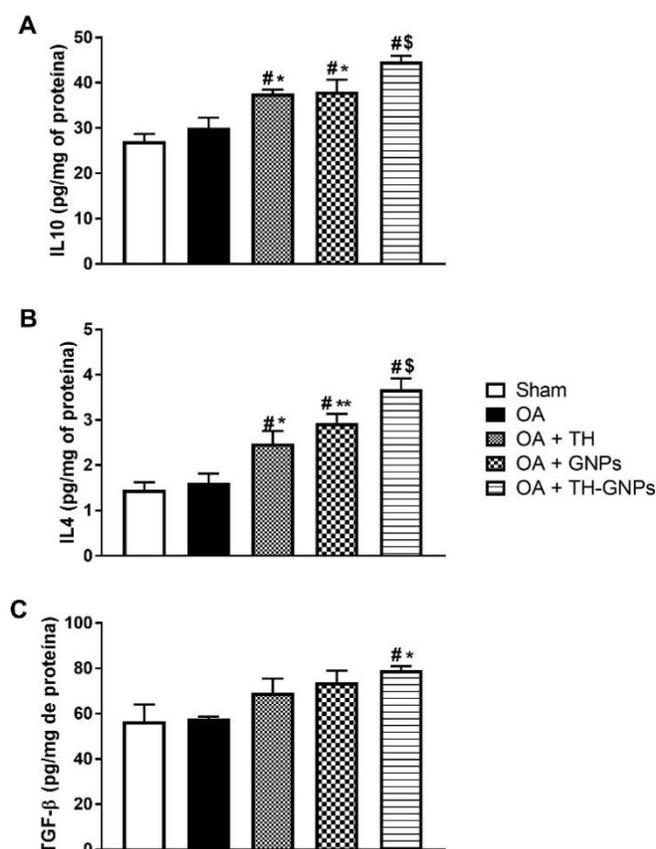


**Figura 4: Efeitos dos tratamentos com TH e GNPs sobre os níveis proteicos de citocinas pró-inflamatórias.** Níveis de IFN -  $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL1- $\beta$  (C) e IL-6 (D), avaliados por ELISA. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: #p < 0,05 versus Sham; \*p < 0,05 versus Grupo OA; \*\*p < 0,01 versus Grupo OA; \*\*\*p < 0,001 versus Grupo OA; \$p < 0,0001 versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

### 4.3 Avaliação dos níveis de citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento

Na figura 5 estão quantificados os níveis das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 e do fator de crescimento TGF- $\beta$ . Como mostra a figura 5A, os níveis de IL-10 apresentaram aumento significativo nos grupos de intervenção terapêutica, OA + TH, OA + GNPs e OA + TH-GNPs em relação ao grupo OA e Sham. Os níveis de IL-4 (figura 5B) demonstraram um aumento significativo nos grupos de intervenção em relação aos grupos Sham e OA.

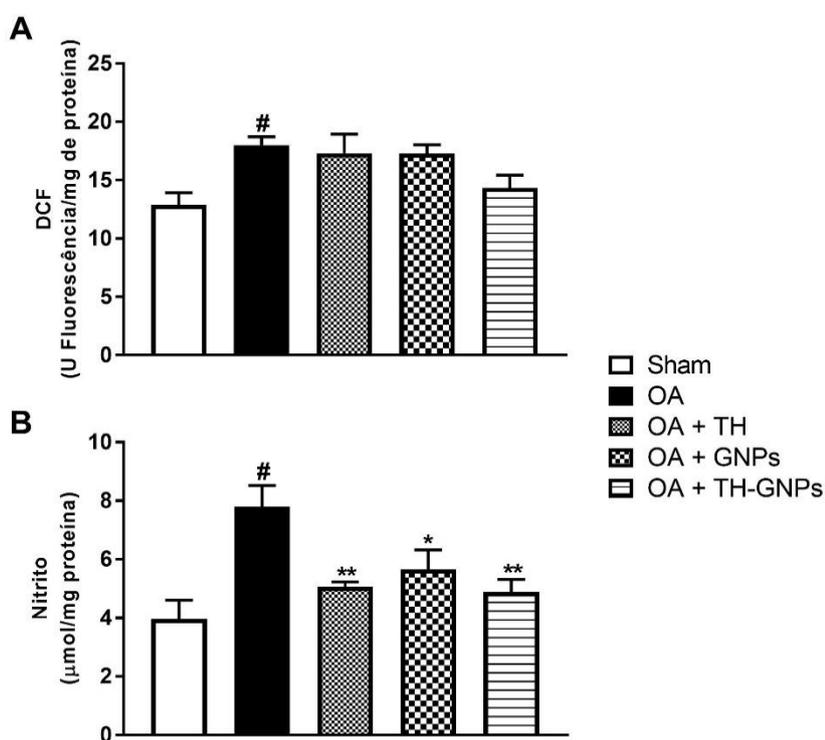
Além disso, os níveis de TGF- $\beta$  apresentaram aumento significativo apenas no grupo tratado como OA + TH-GNPs em relação aos grupos Sham e grupo OA (Figura 5C).



**Figura 5: Efeitos dos tratamentos com TH e GNPs nos níveis proteicos de citocinas anti-inflamatórias e fator de crescimento.** Níveis de IL10 (A), IL4 (B), TGF- $\beta$  (C), avaliados por ELISA. Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: #p < 0,05 versus Sham; \*p < 0,05 versus Grupo OA; \*\*p < 0,01 versus Grupo OA; \*\*\*p < 0,001 versus Grupo OA; \$p < 0,0001 versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

#### 4.4 Avaliação dos níveis de oxidantes

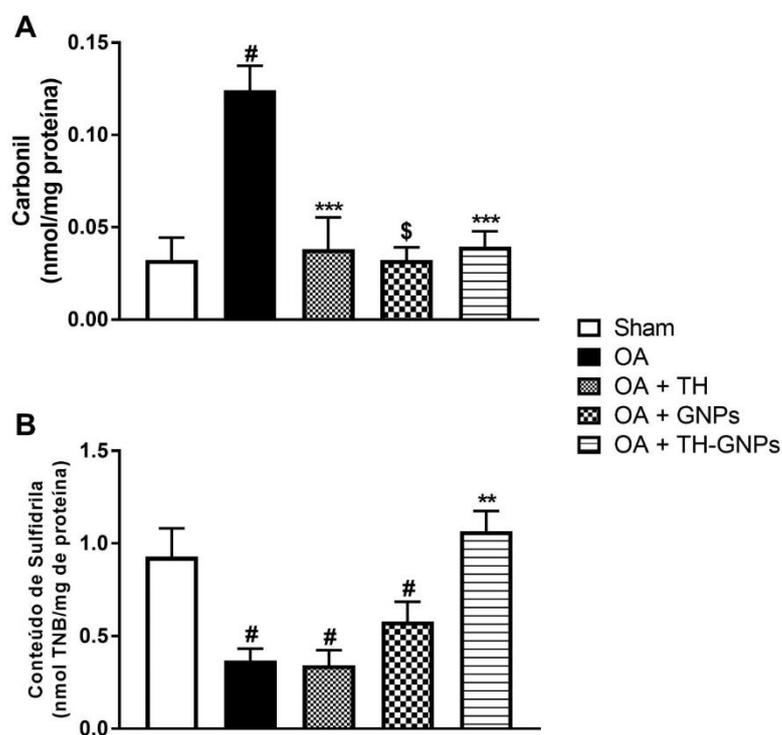
Para avaliação de parâmetros oxidativos analisou-se os níveis de DCF e Nitrito. Os níveis de DCF na cartilagem articular foram significativamente maiores no grupo OA em relação ao grupo Sham, mas não houve diferença nos grupos de intervenção em relação aos outros grupos (Figura 6A). Os níveis de nitrito no grupo OA foram significativamente maiores em relação ao grupo Sham, e significativamente menores nos grupos de intervenção em relação ao grupo OA (Figura 6B).



**Figura 6: Efeitos dos tratamentos com TH e GNPs nos níveis dos oxidantes DCF e Nitrito.** Níveis de DCF (A) e Nitrito (B). Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: # $p < 0,05$  versus Sham; \* $p < 0,05$  versus Grupo OA; \*\* $p < 0,01$  versus Grupo OA; \*\*\* $p < 0,001$  versus Grupo OA; \$ $p < 0,0001$  versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

#### 4.5 Dano oxidativo

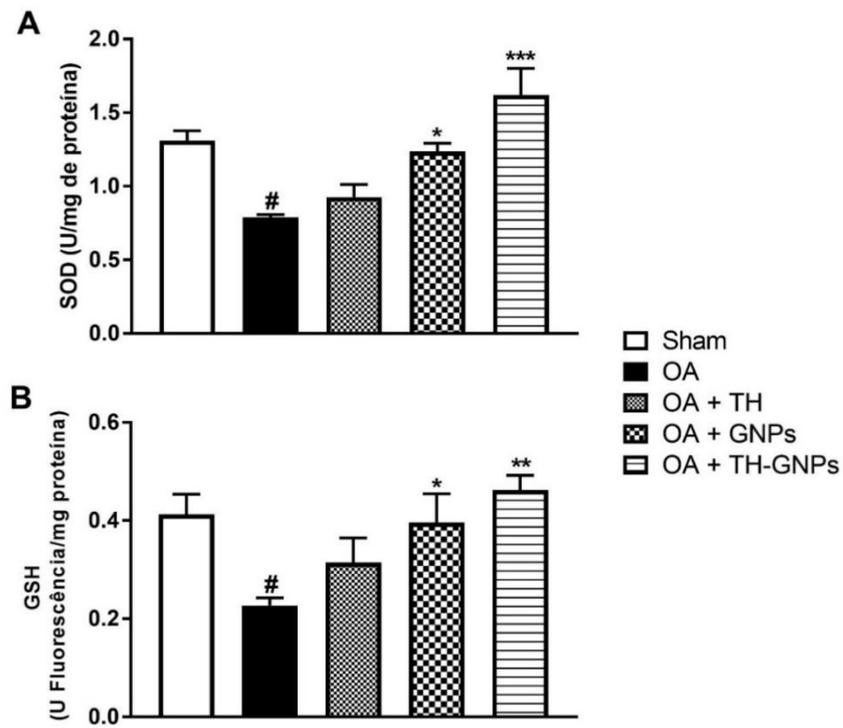
A fim de avaliar o dano oxidativo, foram analisados os níveis de carbonil e o conteúdo de sulfidrilas. Na avaliação de carbonilação de proteínas podemos observar um aumento significativo no grupo OA em relação ao grupo Sham. Todos os grupos tratados com TH e/ou GNPs tiveram uma redução significativa em relação ao grupo OA (Figura 7A). Por fim, os níveis de sulfidrilas, demonstrado na figura 7B, apresentaram uma redução significativa nos grupos OA, OA-TH e OA + GNPs em relação ao sham e um aumento significativo no grupo OA + TH-GNPs em relação ao grupo OA.



**Figura 7: Efeitos dos tratamentos com TH e GNPs sobre os marcadores de dano oxidativo: carbonila e sulfidril.** Níveis de Carbônio (A) e Sulfidril (B). Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: # $p < 0,05$  versus Sham; \* $p < 0,05$  versus Grupo OA; \*\* $p < 0,01$  versus Grupo OA; \*\*\* $p < 0,001$  versus Grupo OA; \$ $p < 0,0001$  versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

#### 4.6 Sistema antioxidante

Para avaliar a atividade do sistema antioxidante articular frente ao modelo mecânico de OA e aos tratamentos, foi mensurado a atividade da SOD e os níveis de GSH (Figura 8A e 8B). Na atividade das enzimas SOD e nos níveis de GSH podemos observar uma redução significativa no grupo OA em relação ao grupo Sham e aumento significativo nos grupos OA + GNPs e OA + TH-GNPs em relação ao grupo OA. O grupo OA + TH não demonstrou diferença significativa em relação ao grupo OA.



**Figura 8: Efeitos dos tratamentos com TH e GNPs nos marcadores de sistema antioxidante SOD e GSH.** Níveis de SOD (A) e GSH (B). Os dados são apresentados em Média  $\pm$  EPM, no qual: # $p < 0,05$  versus Sham; \* $p < 0,05$  versus Grupo OA; \*\* $p < 0,01$  versus Grupo OA; \*\*\* $p < 0,001$  versus Grupo OA; \$ $p < 0,0001$  versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc de Tukey).

## 5 DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, tornou-se evidente que a rede de citocinas pró-inflamatórias contribuem substancialmente para a patogênese da OA. Acredita-se que um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias na cartilagem, na membrana sinovial e no osso subcondral esteja ligado ao desenvolvimento e progressão de alterações estruturais na articulação da OA (Kapoor et al., 2011). O modelo experimental de OA utilizado mimetizou este aspecto da doença, ao demonstrar aumento das citocinas pró-inflamatórias.

A terapia combinada de TH-GNPs resultou em diminuição significativa de TNF $\alpha$ . O TNF $\alpha$  parece desempenhar um papel central no desequilíbrio entre os processos anabólicos e catabólico dos pacientes com OA, podendo desregular a síntese dos principais componentes da matriz extracelular através da inibição da atividade anabólica dos condrócitos, da síntese de proteínas de ligação e colágeno tipo II e estimulação dos condrócitos para liberação de MMPs (Han et al., 2012). Estudos experimentais sugerem que a supressão da inflamação sinovial, da produção de citocinas e da síntese de MMPs com GC intra-articulares poderia reduzir danos estruturais e limitar progressão da doença em doenças articulares, como a OA. A hipótese de que a supressão sustentada da sinovite poderia não apenas proporcionar alívio prolongado da dor, mas também limitar a progressão estrutural na OA (DiBattista et al., 1991; Pelletier et al., 1993).

O estudo de Lu et al. (2011) sobre os efeitos de um corticosteroide no curto prazo em cartilagem bovina, demonstrou que seu uso bloqueou a perda de glicosaminoglicanos da matriz extracelular e reverteu a redução da biossíntese induzida pelo TNF $\alpha$ . Um estudo avaliou os efeitos terapêuticos da triancinolona de liberação prolongada em um modelo murino de OA de joelho induzida, demonstrando melhora histológica significativa da inflamação, formação de pannus, dano na cartilagem e reabsorção óssea no grupo tratado (Kumar et al., 2015). A ação benéfica de GC intra-articulares é dose e tempo-dependente, e as doses e medicações utilizadas em estudos experimentais é bastante variável (Wernecke; Braun; Dragoo, 2015). Em humanos, alteração na evolução radiográfica da doença com estas medicações ainda não foi demonstrada (McAlindon et al., 2017).

O uso de GNPs intra-articular produz regulação negativa da expressão de IL-1 $\beta$ , prostaglandina E2 e ciclooxigenase-2. As vias de sinalização intracelulares

associadas a IL-1 $\beta$  resultam em aumento na produção de MMP-1, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4, ADAMTS-5, TNF $\alpha$ , síntese de NO e PGE<sub>2</sub>, fatores que são associados a redução a produção de elementos da MEC (Wojdasiewicz et al., 2014). Foi observado no grupo TH-GNPs que o nível de IL-1 $\beta$  foi semelhante ao grupo Sham e menor em relação aos outros grupos, evidenciando o efeito anti-inflamatório desta terapia combinada.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com uma ampla gama de atividades biológicas na regulação imune e inflamação, além de processos metabólicos, proliferativos e regenerativos. Na última década, ficou claro que a IL-6 utiliza duas vias diferentes para mediar seus efeitos biológicos: a via clássica, ou sinalização cis; e a via de sinalização trans. A via clássica é responsável por efeitos anti-inflamatórios, podendo controlar a extensão das respostas inflamatórias teciduais. Dependendo do tecido, o uso de IL-6 recombinante induz a liberação do antagonista do receptor de IL-1, do receptor solúvel de TNF e promove inibição do TNF $\alpha$  (Xing et al., 1998). Foi observado no presente estudo elevados níveis de IL-6 no grupo TH-GNPs, que paralelo ao nível mais baixo de TNF $\alpha$  observado neste mesmo grupo, pode estar relacionado a ocorrência de eventos anti-inflamatórios associados a IL-6. Níveis elevados de IL-6 nas articulações com OA estão associados ao aumento dos níveis de MMPs, bem como à gravidade radiográfica da OA em idosos, mas no contexto de nosso estudo não é possível afirmar esta associação sem a disponibilidade dos estudos histológicos. (Stannus et al., 2010; Vuolteenaho et al., 2017).

Interferons podem limitar a inflamação estimulada por IL-1 e a destruição de tecidos inibindo mediadores inflamatórios e MMPs (MMP-3, MMP-9) (Ahmad et al., 2007). Há evidências demonstrando ações anti-inflamatórias do IFN- $\gamma$  através da forte inibição da atividade do promotor de MMP-13 induzida por IL-1 e a sua expressão gênica em condrócitos de indivíduos saudáveis (Hu et al., 2005). Foi observado no presente estudo aumento significativo de IFN- $\gamma$  no grupo OA + TH, mas sem diferença significativa nos demais grupos. O uso isolado TH aumentou a expressão de IFN- $\gamma$  mas sua associação com GNPs não produziu os mesmos resultados.

Várias citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, são encontradas em níveis aumentados no líquido sinovial de pacientes com OA. Sua ação diminui a produção e atividade de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, podendo ter efeitos estimuladores ou protetores diretos no metabolismo dos condrócitos (Zhang et al., 2014). Houve aumento destas citocinas em todos os grupos de tratamento, levantando

a possibilidade de redução de danos teciduais resultantes da inflamação presente da OA.

A concentração de TGF- $\beta$  foi significativamente maior no grupo TH-GNPs, sem diferença nos demais grupos. Normalmente, o TGF- $\beta$  desempenha um papel importante e protetor na manutenção do fenótipo diferenciado de condrócitos, auxilia no reparo celular e pode modular o microambiente dos condrócitos favorecendo um ambiente para a regeneração da cartilagem (Shen et al., 2014; Van Der Kraan, 2018). Os melhores resultados observados nesta e outras análises realizadas no grupo TH-GNPs podem estar relacionados ao fato da conjugação com GNPs aprimorar medicamentos ao promover liberação controlada e prolongada da substância nele ligada, reduzindo os efeitos adversos associados, promover proteção contra inativação do medicamento antes de chegar ao local de ação, aumentar a penetração intracelular e aumentar da atividade farmacológica (Marangoni et al., 2013)

O estresse oxidativo tem papel prejudicial em muitas células, sendo associado a doenças e ao envelhecimento. Articulações com OA possuem níveis elevados de estresse oxidativo e EROs, estando associados a progressão da doença (Lepetsos e Papavassiliou, 2016). A inflamação local, também ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B, através da ativação de I $\kappa$ B kinase (IKK), degradação de I $\kappa$ B pelo sistema ubiquitina-proteassomo e transporte de NF- $\kappa$ B ativado do citoplasma para o núcleo. No núcleo, os NF- $\kappa$ B ativados se ligam à região promotora do gene alvo e regulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, COX-2 e outros mediadores inflamatórios que levam à destruição da cartilagem (Khan e Khan, 2018). A modulação da via NF- $\kappa$ B pelo estresse oxidativo é dependente de contexto específico e do tipo celular, mas na OA está associada a produção de enzimas catabólicas, citocinas e aumento do estresse oxidativo produzindo ciclo de retroalimentação (Olivotto et al., 2015). O modelo de OA induziu um aumento na produção de oxidantes (DCF e nitrito) e de marcadores de dano celular oxidativo, com redução de Sulfidril e aumento de Carbonil. O tratamento com TH ou GNPs, utilizado isoladamente ou em combinação, reduziu os marcadores de estresse oxidativo de forma semelhante, sendo observado um aumento significativo em sulfidril no grupo TH-GNPs em relação aos demais grupos.

As GNPs possuem cargas positivas, estabilizando-se através da ligação com moléculas de carga negativa, como os radicais livres, atenuando notavelmente o desequilíbrio no nível de antioxidantes e oxidantes. Inibem significativamente os

efeitos da inflamação através da supressão das vias inflamatórias relacionadas a produção de citocinas pró-inflamatórias, NF- $\kappa$ B, COX-2 e iNOS. Estes achados foram descritos em um estudo que avaliou o uso de GNPs em um modelo experimental de artrite (Khan; Khan, 2018). Adicionalmente, as GNPs aumentam os níveis de NRF2, e esta via de sinalização leva à indução de vários efetores antioxidantes e genes citoprotetores, como SOD2, catalase e heme oxygenase-1, promovendo a proteção dos condrócitos com OA. Isto resulta em redução no desequilíbrio redox induzido por IL-1 $\beta$  e redução na morte apoptótica, e subsequentemente, melhora a sobrevivência dos condrócitos, impede danos e disfunções mitocondriais (Goldstein et al., 2016; Khan et al., 2018)

Os glicocorticoides sintéticos visam aliviar a inflamação e a dor na OA. Sua ação anti-inflamatória ocorre através da sinalização do receptor GC resultando em ações genômicas e não-genômicas, com ligação e bloqueio de sítios promotores de genes pró-inflamatórios, como IL-1, recrutamento de diversos fatores de transcrição para sequências promotoras de genes que codificam produtos anti-inflamatórios, inibição da síntese de quase todas as citocinas inflamatórias conhecidas e diminuição da estabilidade do RNA mensageiro que as codifica. Muitas destas ações são alcançadas por competição ou bloqueio da função de fatores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B e ativador da proteína 1 (AP-1), ou pelo aumento do I $\kappa$ B (Auphan et al., 1995; Rhen e Cidlowski, 2005). Nos condrócitos e fibroblastos sinoviais estes mecanismos também inibem a produção de NO e expressão do iNOS (Ha et al., 2008; Vuolteenaho et al., 2001). Os níveis de citocinas pró-inflamatórias não foram significativamente reduzidos no grupo OA + TH, isto pode ter sido relacionado a meia-vida da TH em relação a posologia do estudo e o momento em que foi realizado a eutanásia dos ratos para a análise bioquímica. Foi observada redução nos níveis de nitrito em todos os grupos de tratamento, incluindo o que utilizou glicocorticoide isoladamente, de acordo com os mecanismos de ação descritos acima.

Paralelo ao aumento do estresse oxidativo observado na doença, os antioxidantes, como a SOD e GSH, são encontrados em níveis reduzidos no líquido sinovial e na cartilagem de articulações com OA, em comparação com articulações normais. A SOD parece proteger as proteínas e macromoléculas da matriz extracelular vulneráveis a lesão oxidante e proteger o ácido hialurônico do líquido sinovial de ser clivado oxidativamente pelo superóxido. A GSH funciona como antioxidante intracelular e sua depleção está associada a maior morte celular de condrócitos

estressados oxidativamente (Regan et al., 2008). O modelo de OA utilizado em nosso estudo reproduziu estes achados com diminuição nas atividades das enzimas SOD e GSH. Os grupos tratados com GNPs apresentaram aumento na atividade das enzimas antioxidantes mensuradas, e este achado é compatível com o evidente papel das GNPs como agentes antioxidantes. Este achado não foi observado no grupo OA-TH.

É importante mencionar que o uso de GNPs ou GC intra-articulares em estudos experimentais possui resultados variados quanto a citotoxicidade ou benefício histológico, e são dependentes do modelo experimental utilizado, posologia, tamanho e concentração das GNPs utilizados, havendo grande diversidade entre os trabalhos.

Os GC podem ter efeitos deletérios histológicos quando utilizados nas articulações normais. Em contraste, na OA eles reduzem a degeneração da matriz extracelular inibindo diretamente processos catabólicos exagerados, como o aumento de MMPs, e indiretamente via amplos efeitos anti-inflamatórios que limitam as alterações fenotípicas dos condrócitos que são mediadas pela inflamação. Estes efeitos condroprotetores dos GC no contexto da OA são suportados por vários estudos realizados em animais de diferentes espécies, demonstrando uma redução na danos estruturais na articulação, restauração da biossíntese da matriz e redução da perda de proteoglicanos (Bodick et al., 2018). Especificamente com triancinolona, dois estudos em cultura de condrócitos demonstraram que a triancinolona é condrotóxica em todas as doses examinadas. No entanto, estudos em animais e humanos apoiam a possível proteção da triancinolona em lesões condrais induzidas ou OA estes efeitos são dependentes de dose (Wernecke et al., 2015).

As GNPs intra-articulares usadas em modelos *in vivo* de artrite demonstraram efeito benéfico, como atividade antiangiogênica e redução da infiltração de macrófagos, atenuando a inflamação da artrite (Tsai et al., 2007). Importante mencionar que um estudo em cultura de condrócitos demonstrou que GNPs de 13 nm induzem apoptose de condrócitos via dano mitocondrial independente de EROs, porém com GNPs de 3 e 45 nm, este achado não foi observado (Huang et al., 2016). Estes resultados demonstram que para a utilização de GNPs no tratamento OA é importante atentar para a citotoxicidade tamanho-dependente em condrócitos.

Há uma grande variedade de esquemas posológicos utilizados em estudos experimentais de GNPs e GC na literatura. A realização de um experimento com diferentes doses e intervalos de aplicação poderia aprimorar os resultados obtidos em nosso estudo, encontrando o esquema com melhor desfecho anti-inflamatório e

antioxidante. Os melhores resultados no grupo TH-GNPs podem estar relacionados a possível alteração farmacodinâmica de TH quando associada a GNPs ou mesmo aos efeitos aditivos das duas terapias quando utilizadas conjuntamente.

## 6 CONCLUSÃO

O tratamento intra-articular com TH e GNPs demonstrou efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, com redução de citocinas pro-inflamatórias, aumento das citocinas anti-inflamatórias, redução de oxidantes e dano oxidativo com aumento da atividade antioxidante, e essas alterações foram mais evidentes no grupo de tratamento combinado com TH-GNPs.

Futuros estudos com diferentes esquemas posológicos poderão otimizar os desfechos observados e descrever melhor os mecanismos de ação. Além disso, os resultados das alterações histopatológicas poderão trazer informações adicionais sobre as intervenções realizadas neste experimento.

## REFERÊNCIAS

- Ahmad R, Qureshi HY, El Mabrouk M, Sylvester J, Ahmad M, Zafarullah M. Inhibition of interleukin 1-induced matrix metalloproteinase 13 expression in human chondrocytes by interferon. *Ann Rheum Dis*. 2007 Jan 12;66(6):782–9.
- Aigner T, McKenna L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002.
- Aitken D, Laslett LL, Pan F, Haugen IK, Otahal P, Bellamy N, et al. A randomised double-blind placebo-controlled crossover trial of HUMira (adalimumab) for erosive hand OsteoArthritis – the HUMOR trial. *Osteoarthr Cartil*. 2018;
- Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer’s disease. *Neurosci Lett*. 2001 Apr 20;302(2–3):141–5.
- Amin AR, Attur M, Patel RN, Thakker GD, Marshall PJ, Rediske J, et al. Superinduction of cyclooxygenase-2 activity in human osteoarthritis-affected cartilage. Influence of nitric oxide. *J Clin Invest*. 1997 Mar 15;99(6):1231–7.
- Attur MG, Dave M, Cipolletta C, Kang P, Goldring MB, Patel IR, et al. Reversal of autocrine and paracrine effects of interleukin 1 (IL-1) in human arthritis by type II IL-1 decoy receptor: Potential for pharmacological intervention. *J Biol Chem*. 2000;
- Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M. Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF-kappaB Activity Through Induction of IkappaB Synthesis. *Science* (80- ). 1995 Oct 13;270(5234):286–90.
- Balasubramanian SK, Yang L, Yung L-YL, Ong C-N, Ong W-Y, Yu LE. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. *Biomaterials*. 2010 Dec;31(34):9023–30.
- Bannister J V., Calabrese L. Assays for Superoxide Dismutase. In John Wiley & Sons, Ltd; 2006. p. 279–312.
- Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013.
- Bodick N, Williamson T, Strand V, Senter B, Kelley S, Boyce R, et al. Local Effects Following Single and Repeat Intra-Articular Injections of Triamcinolone Acetonide Extended-Release: Results from Three Nonclinical Toxicity Studies in Dogs. *Rheumatol Ther*. 2018 Dec 10;5(2):475–98.

- Campos WN da S, Leite AET, Sonogo DA, Andrade MA de, Pizzinatto FD, Marangoni VS, et al. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro conjugadas com curcumina e seus efeitos na osteoartrite experimental induzida. *Ciência Rural*. 2017;47(7).
- Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: Suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum*. 1996;
- Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(5):843–50.
- Clancy RM, Abramson SB, Kohne C, Rediske J. Nitric oxide attenuates cellular hexose monophosphate shunt response to oxidants in articular chondrocytes and acts to promote oxidant injury. *J Cell Physiol*. 1997;
- Collins JE, Losina E, Nevitt MC, Roemer FW, Guermazi A, Lynch JA, et al. Semiquantitative Imaging Biomarkers of Knee Osteoarthritis Progression: Data From the Foundation for the National Institutes of Health Osteoarthritis Biomarkers Consortium. *Arthritis Rheumatol*. 2016 Oct;68(10):2422–31.
- Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005;
- Cuellar A, Reddi AH. Stimulation of Superficial Zone Protein/Lubricin/PRG4 by Transforming Growth Factor- $\beta$  in Superficial Zone Articular Chondrocytes and Modulation by Glycosaminoglycans. *Tissue Eng Part A*. 2015 Jul;21(13–14):1973–81.
- Day JS, Van Der Linden JC, Bank RA, Ding M, Hvid I, Sumner DR, et al. Adaptation of subchondral bone in osteoarthritis. *Biorheology*. 2004;
- Dibattista JA, Martel-Pelletier J, Wosu LO, Sandor T, Antakly T, Pelletier J-P. Glucocorticoid Receptor Mediated Inhibition of Interleukin-1 Stimulated Neutral Metalloprotease Synthesis in Normal Human Chondrocytes\*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991 Feb;72(2):316–26.
- Dwivedi P, Nayak V, Kowshik M. Role of gold nanoparticles as drug delivery vehicles for chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis. *Biotechnol Prog*. 2015;
- Evans CH, Kraus VB, Setton LA. Progress in intra-articular therapy. *Nature Reviews Rheumatology*. 2014.

- Felson DT, Anderson JJ, Meenan RF. The comparative efficacy and toxicity of second-line drugs in rheumatoid arthritis results of two metaanalyses. *Arthritis Rheum.* 1990; Forestier J. Rheumatoid Arthritis And Its Treatment By Gold Salts. *Lancet.* 1934 Sep;224(5795):646–8.
- Goldstein A, Soroka Y, Frušić-Zlotkin M, Lewis A, Kohen R. The bright side of plasmonic gold nanoparticles; activation of Nrf2, the cellular protective pathway. *Nanoscale.* 2016;8(22):11748–59.
- Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug Chem.* 2004;
- Ha M, Lilja R, Kankaanranta H, Å EM. Inhibition of iNOS expression and NO production by anti-inflammatory steroids Reversal by histone deacetylase inhibitors. 2008;21:331–9.
- Han L, Song JH, Yoon JH, Park YG, Lee SW, Choi YJ, et al. TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Osteoarthritis in a Korean Population. *Korean J Pathol.* 2012;46(1):30.
- Heinemeier KM, Schjerling P, Heinemeier J, Møller MB, Krogsgaard MR, Grum-Schwensen T, et al. Radiocarbon dating reveals minimal collagen turnover in both healthy and osteoarthritic human cartilage. *Sci Transl Med.* 2016;
- Hirai Y, Migita K, Honda S, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, et al. Effects of nitric oxide on matrix metalloproteinase-2 production by rheumatoid synovial cells. *Life Sci.* 2001 Jan 12;68(8):913–20.
- Hochberg MC, Altman RD, April KT, Benkhalti M, Guyatt G, McGowan J, et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res.* 2012;
- Houard X, Goldring MB, Berenbaum F. Homeostatic mechanisms in articular cartilage and role of inflammation in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2013;
- Hu X, Ho HH, Lou O, Hidaka C, Ivashkiv LB. Homeostatic Role of Interferons Conferred by Inhibition of IL-1-Mediated Inflammation and Tissue Destruction. *J Immunol.* 2005 Jul 1;175(1):131–8.
- Huang H, Quan Y yao, Wang X ping, Chen T sheng. Gold Nanoparticles of Diameter 13 nm Induce Apoptosis in Rabbit Articular Chondrocytes. *Nanoscale Res Lett.* 2016;
- Johnson VL, Hunter DJ. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2014;

- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011 Jan 30;7(1):33–42.
- Khan MA, Khan MJ. Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF- $\kappa$ B pathways by suppressing COX-2 activity. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol*. 2018 Oct 31;46(sup1):1149–58.
- Khan NM, Ahmad I, Haqqi TM. Nrf2/ARE pathway attenuates oxidative and apoptotic response in human osteoarthritis chondrocytes by activating ERK1/2/ELK1-P70S6K-P90RSK signaling axis. *Free Radic Biol Med*. 2018 Feb;116:159–71.
- Kim CK, Ghosh P, Rotello VM. Multimodal drug delivery using gold nanoparticles. *Nanoscale*. 2009;
- Kong FY, Zhang JW, Li RF, Wang ZX, Wang WJ, Wang W. Unique roles of gold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications. *Molecules*. 2017.
- Kumar A, Bendele AM, Blanks RC, Bodick N. Sustained efficacy of a single intra-articular dose of FX006 in a rat model of repeated localized knee arthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2015 Jan;23(1):151–60.
- Larsson E, Harris HE, Larsson A, Månsson B, Saxne T, Klareskog L. Corticosteroid treatment of experimental arthritis retards cartilage destruction as determined by histology and serum COMP. *Rheumatology*. 2004;
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992;5(2):227–31.
- Lepetsos P, Papavassiliou AG. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2016 Apr;1862(4):576–91.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990;186:464–78.
- Little CB, Fosang AJ. Is cartilage matrix breakdown an appropriate therapeutic target in osteoarthritis--insights from studies of aggrecan and collagen proteolysis? *Curr Drug Targets*. 2010 May;11(5):561–75.
- Loo FAJ Van De, Joosten LAB, Van Lent PLEM, Arntz OJ, Van Den Berg WB. Role of interleukin-1, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosan-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265–75.
- Lu YC, Evans CH, Grodzinsky AJ. Effects of short-term glucocorticoid treatment on changes in cartilage matrix degradation and chondrocyte gene expression induced by mechanical injury and inflammatory cytokines. *Arthritis Res Ther.* 2011;
- Marangoni VS, Paino IM, Zucolotto V. Synthesis and characterization of jacalin-gold nanoparticles conjugates as specific markers for cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2013 Dec;112:380–6.
- Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Prim.* 2016 Oct 13;2:16072.
- McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil.* 2014 Mar;22(3):363–88.
- McAlindon TE, LaValley MP, Harvey WF, Price LL, Driban JB, Zhang M, et al. Effect of intra-articular triamcinolone vs saline on knee cartilage volume and pain in patients with knee osteoarthritis a randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2017;
- Moulharat N, Lesur C, Thomas M, Rolland-Valognes G, Pastoureau P, Anract P, et al. Effects of transforming growth factor- $\beta$  on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthr Cartil.* 2004 Apr;12(4):296–305.
- Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, et al. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Care Res.* 2008;
- Nelson AE. Osteoarthritis year in review 2017: clinical. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2018.
- Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of OA. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013;
- Olivotto E, Otero M, Marcu KB, Goldring MB. Pathophysiology of osteoarthritis: canonical NF- $\kappa$ B/IKK $\beta$ -dependent and kinase-independent effects of IKK $\alpha$  in cartilage degradation and chondrocyte differentiation. *RMD Open.* 2015 Aug 15;1(Suppl 1):e000061.
- Pan Y, Leifert A, Ruau D, Neuss S, Bornemann J, Schmid G, et al. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small.* 2009;

- Pascarelli NA, Moretti E, Terzuoli G, Lamboglia A, Renieri T, Fioravanti A, et al. Effects of gold and silver nanoparticles in cultured human osteoarthritic chondrocytes. *J Appl Toxicol*. 2013;
- Pelletier J-P, Cloutier J-M, Martel-Pelletier J. In Vitro Effects of NSAIDs and Corticosteroids on the Synthesis and Secretion of Interleukin 1 by Human Osteoarthritic Synovial Membranes. In: *Joint Destruction in Arthritis and Osteoarthritis*. Basel: Birkhäuser Basel; 1993. p. 181–93.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis and Rheumatism*. 2001.
- Regan EA, Bowler RP, Crapo JD. Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury. *Osteoarthr Cartil*. 2008 Apr;16(4):515–21.
- Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1711–23.
- Roos EM, Herzog W, Block JA, Bennell KL. Muscle weakness, afferent sensory dysfunction and exercise in knee osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2011.
- Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2010.
- Shen J, Li S, Chen D. TGF- $\beta$  signaling and the development of osteoarthritis. *Bone Res*. 2014 Dec 27;2(1):14002.
- Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir*. 2005.
- Sohn DH, Sokolove J, Sharpe O, Erhart JC, Chandra PE, Lahey LJ, et al. Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Res Ther*. 2012;
- Stannus O, Jones G, Cicuttini F, Parameswaran V, Quinn S, Burgess J, et al. Circulating levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthr Cartil*. 2010;
- Sumbayev VV., Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, Lall GS, Gibbs BF, et al. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 $\beta$ -induced pro-inflammatory responses. *Small*. 2013;

- Taljanovic MS, Graham AR, Benjamin JB, Gmitro AF, Krupinski EA, Schwartz SA, et al. Bone marrow edema pattern in advanced hip osteoarthritis: Quantitative assessment with magnetic resonance imaging and correlation with clinical examination, radiographic findings, and histopathology. *Skeletal Radiol.* 2008;
- Tchetina E V., Kobayashi M, Yasuda T, Meijers T, Pidoux I, Poole AR. Chondrocyte hypertrophy can be induced by a cryptic sequence of type II collagen and is accompanied by the induction of MMP-13 and collagenase activity: Implications for development and arthritis. *Matrix Biol.* 2007;
- Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics.* 2012.
- Tsai CY, Shiau AL, Chen SY, Chen YH, Cheng PC, Chang MY, et al. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by Nanogold. *Arthritis Rheum.* 2007;
- Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951 Jan 1;11(0):55.
- Vaishya R, Vijay V, Demesugh DM, Agarwal AK. Surgical approaches for total knee arthroplasty. *J Clin Orthop trauma.* 2016;7(2):71–9.
- Valdes AM, Spector TD, Tamm A, Kisand K, Doherty SA, Dennison EM, et al. Genetic variation in the SMAD3 gene is associated with hip and knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010 Apr 21;62(8):2347–52.
- van der Kraan PM. Differential Role of Transforming Growth Factor-beta in an Osteoarthritic or a Healthy Joint. *J bone Metab.* 2018 May;25(2):65–72.
- Vuolteenaho K, Koskinen-Kolasa A, Laavola M, Nieminen R, Moilanen T, Moilanen E. High synovial fluid interleukin-6 levels are associated with increased matrix metalloproteinase levels and severe radiographic changes in osteoarthritis patients. *Osteoarthr Cartil.* 2017 Apr;25:S92–3.
- Vuolteenaho K, Moilanen T, Al-Saffar N, Knowles RG, Moilanen E. Regulation of the nitric oxide production resulting from the glucocorticoid-insensitive expression of iNOS in human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2001 Oct;9(7):597–605.
- Wang X, Hunter DJ, Jin X, Ding C. The importance of synovial inflammation in osteoarthritis: current evidence from imaging assessments and clinical trials. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2018.
- Wernecke C, Braun HJ, Dragoo JL. The Effect of Intra-articular Corticosteroids on Articular Cartilage. *Orthop J Sport Med.* 2015 May;3(5):232596711558116.

- Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biology*. 2014.
- Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1–19.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*. 1998 Jan 15;101(2):311–20.
- Zhang Y, Pizzute T, Pei M. Anti-Inflammatory Strategies in Cartilage Repair. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 Dec;20(6):655–68.
- Ziskoven C, Jäger M, Zilkens C, Bloch W, Brixius K, Krauspe R. Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? *Orthop Rev (Pavia)*. 2010;

**ANEXOS**

## Anexo 1 – Certificado do CEUA



### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 25/06/2019.

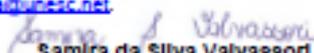
Título do projeto	<i>Efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do tratamento intra-articular com triancinolona hexacetona ligada a nanopartículas de ouro (GNPs) em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos wistar.</i>
Project title	<i>Anti-inflammatory and antioxidant effects of the intra-articular treatment with triamcinolone hexacetonide ligated with gold nanoparticles (GNPs) in a mechanical model of osteoarthritis in wistar rats.</i>
Número do protocolo Protocol number	61/2019-1
Pesquisador principal Principal Investigator	PAULO CESAR LOCK SILVEIRA
Pesquisadores Researchers	Daniela Pacheco dos santos Hauptenthal, Gustavo de Bem Silveira, Rubya Pereira Zacaron, Carolini Mendes, Laura de Roch casagrande, Maria Eduarda Anastácio Borges Corrêa, Germano Duarte Porto.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/08/2019 a 22/07/2020
Espécie/Inhagem/raça	Rato heterogênico / X
Idade/Peso	60 dias / 250g
Número de animais / Gênero	50 / masculino
Origem	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes.

May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

  
Samira da Silva Valvassori  
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 25 de junho de 2019.

## Anexo 2 – Ata de Apresentação



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
 PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
 DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
 Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
 Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 361

Com início às 14h (quatorze horas) do dia quatro de setembro de 2020 (dois mil e vinte), realizou-se, via ferramenta digital Google Meet, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **MARCUS BARG RESMINI**, sob a orientação do Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol e coorientada pelo Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira intitulada **“EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES DO TRATAMENTO INTRA-ARTICULAR COM TRIANCINOLONA HEXACETONIDA ASSOCIADA A NANOPARTÍCULAS DE OURO (GNPs) EM UM MODELO MECÂNICO DE OSTEOARTRITE EM RATOS WISTAR”**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof. Dr. Alessandro Haupenthal (Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 15h (quinze horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, Coordenador do Programa. Criciúma, 04 (quatro) de setembro de 2020 (dois mil e vinte).

**Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**  
 Coordenador Adjunto do PPGCS

**Fernanda Nunes Peruchi**  
 Assistente Administrativo