

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

MÁRIO CÉSAR BÚRIGO FILHO

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES DO
TRATAMENTO INTRA-ARTICULAR COM ACIDO HIALURÔNICO
ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO EM UM MODELO
MECÂNICO DE OSTEOARTRITE EM RATOS WISTAR**

CRICIÚMA, ABRIL DE 2018

MÁRIO CÉSAR BÚRIGO FILHO

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANTIOXIDANTES DO
TRATAMENTO INTRA-ARTICULAR COM ACIDO HIALURÔNICO
ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE OURO 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. Paulo Cesar Lock Silveira

CRICIÚMA, ABRIL DE 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B958e Búrigo Filho, Mário César.

Efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do tratamento intra-articular com ácido hialurônico associado a nanopartículas de ouro em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos wistar / Mário César Búrigo Filho. – 2018.
45 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2018.
Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

1. Osteoartrite - Tratamento. 2. Ácido hialurônico – Uso terapêutico. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Agentes antiinflamatórios. 5. Antioxidantes. I. Título.

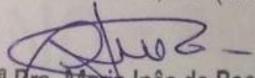
CDD 23. ed. 615.1

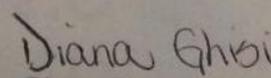


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 310

Com início às 09h00 (nove horas) do dia vinte e sete do mês de abril de 2018 (dois mil e dezoito), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Mário César Búrigo Filho**, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira, intitulada **"EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTES DO TRATAMENTO INTRA-ARTICULAR COM ÁCIDO HIALURÔNICO (AH) ASSOCIADO 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: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico (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. Joni Márcio de Farias (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – 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 10h00 (dez horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Prof.^a Dra. Maria Inês da Rosa, Coordenadora do Programa. Criciúma, 27 (vinte e sete) de abril de 2018 (dois mil e dezoito).


Prof.^a Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora PPGCS
Prof.^a Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

RESUMO

A osteoartrite é considerada uma doença crônica degenerativa caracterizada pelo desgaste das superfícies articulares, acompanhado de quadros de dor, rigidez articular, estresse oxidativo e acentuado processo inflamatório. Pesquisas feitas demonstram resultados promissores a partir da utilização de AH e GNP como terapias adjuvantes para o tratamento da OA. Este trabalho teve como objetivo investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do tratamento intrarticular com Ácido Hialurônico (AH) associado a Nanopartículas de ouro (GNPs) em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos wistar. Foram utilizados 50 ratos Wistar (2 meses pesando entre 250-300g) divididos em 5 grupos de dez animais cada: Sham; Osteoartrite (OA); OA + Ácido Hialurônico (AH); OA + Nanopartículas de ouro (GNPs); OA + AH + GNPs. O modelo de lesão muscular foi desenvolvido de acordo com Wen e cols (2016) e Bagi e cols (2015). Os animais foram anestesiados com isoflurano 4 %, de forma inalatória e posteriormente no grupo sham, uma abordagem cirúrgica do ligamento colateral mediano (LCM) no membro traseiro direito foi realizada apenas cortando a pele enquanto o LCM foi mantido intacto. A incisão cirúrgica foi fechada em duas camadas utilizando suturas absorvíveis. Nos grupos de osteoartrite, a meniscectomia mediana (MM) foi realizada através da transecção completa do LCM e do menisco mediano do membro posterior direito, seguido do fechamento em duas camadas utilizando suturas absorvíveis. O tratamento intraarticular foi iniciado 30 dias após a indução do modelo de osteoartrite com frequência de uma aplicação quinzenal durante 90 dias. Quinze dias após a última aplicação os animais foram anestesiados com isoflurano 4 % e levados à eutanásia por decapitação em guilhotina. Nossos resultados demonstram que o modelo criado foi eficaz na mimetização de OA, expresso pelo aumento nos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL1- β e IL-6 e degeneração das superfícies articulares. A associação de AH + GNP foi capaz de reduzir a concentração destas citocinas a níveis próximos aos basais. No entanto, o uso isolado do AH ou GNP não gerou os mesmos resultados. Os níveis de citocinas IL4 e IL10 foram maiores no grupo terapia combinada quando comparado ao grupo OA. Nosso modelo de OA induziu ao aumento na produção de oxidantes (DCF e nitrito), de dano celular (Sulfidril, Carbonil e MDA) e MPO, ratificando o quadro de estresse oxidativo acarretado no tecido lesionado. Os resultados encontrados neste estudo demonstram que as duas terapias, AH e GNP, utilizadas de forma isolada são capazes de reduzir estes marcadores. No entanto, o grupo que recebeu a terapia combinada (AH + GNP) teve o efeito potencializado. Concluímos que o uso do ácido hialurônico associado com nanopartículas de ouro potencializou a redução da resposta inflamatória e regulou o estado redox celular, demonstrando resultados promissores a partir da sua utilização.

Palavras-chave: Osteoartrite; Ácido Hialurônico; Cartilagem; Inflamação; Nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

Osteoarthritis is considered a chronic degenerative disease characterized by wear of the joint surfaces, accompanied by pain pictures, joint stiffness, oxidative stress and marked inflammatory process. Researches have shown promising results from the use of AH and GNP as adjuvant therapies for the treatment of OA. This work aimed to investigate the possible anti-inflammatory and antioxidant effects of the intra-articular treatment with Hyaluronic Acid (HA) associated with gold nanoparticles (GNPs) in a mechanical model of osteoarthritis in wistar rats. Fifty Wistar rats (2 months weighing between 250-300g) were divided into 5 groups of ten animals each: Sham; Osteoarthritis (OA); OA + Hyaluronic Acid (AH); OA + Nanoparticles of gold (GNPs); OA + AH + GNPs. The muscle injury model was developed according to Wen et al (2016) and Bagi et al (2015). The animals were anesthetized with 4% isoflurane inhalation and then in the sham group, a surgical approach of the medial collateral ligament (LCM) on the right hind limb was performed only by cutting the skin while the LCM was maintained intact. The surgical incision was closed in two layers using absorbable sutures. In the osteoarthritis groups, medial meniscectomy (MM) was performed through complete transection of the LCM and medial meniscus of the right posterior limb, followed by closure in two layers using absorbable sutures. Intra-articular treatment was started 30 days after induction of the osteoarthritis model with frequency of a fortnightly application for 90 days. Fifteen days after the last application the animals were anesthetized with 4% isoflurane and led to euthanasia by guillotine decapitation. Our results demonstrate that the model was effective in mimicking OA, expressed by the increase in the levels of IFN- γ , TNF- α , IL1- β and IL-6 and degeneration of the joint surfaces. The association of AH + GNP was able to reduce the concentration of these cytokines at near-basal levels. However, the use of AH or GNP alone did not generate the same results. IL4 and IL10 cytokine levels were higher in the combination therapy group when compared to the OA group. Our model of OA induced an increase in the production of oxidants (DCF and nitrite), cellular damage (Sulphydryl, Carbonyl and MDA) and MPO, ratifying the oxidative stress caused in the injured tissue. The results found in this study demonstrate that the two therapies, AH and GNP, used in isolation are able to reduce these markers. However, the group receiving combination therapy (AH + GNP) had the potentiated effect. We conclude that the use of hyaluronic acid associated with gold nanoparticles potentiated the reduction of the inflammatory response and regulated the cellular redox state, showing promising results from its use.

Keywords: Osteoarthritis; Hyaluronic acid; Cartilage; Inflammation; Gold nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Meniscectomia do menisco medial.....	20
Figura 2 - Linha do tempo com início do experimento, período de tratamento e fim do experimento.....	21
Figura 3 - Microscopia eletrônica de transmissão de GNPs com diâmetro de 20 nm. GNPs esféricas preparadas em solução aquosa.....	23
Figura 4 - Avaliação da atividade da Mieloperoxidase.....	26
Figura 5 - Quantificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias	27
Figura 6 - Quantificação dos níveis de citocinas anti-inflamatórias.....	28
Figura 7- Avaliação dos níveis dos oxidantes DCF (A) e Nitrito (B).....	29
Figura 8 - Avaliação do dano oxidativo por meio dos níveis de MDA (A), Carbonil (B) e Conteúdo de Sulfidril (C).....	30
Figura 9 - Figura 9: Avaliação da atividade antioxidante da SOD (A), GPX (B), GSH (C).....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH - Ácido hialurônico

COX-2- Ciclooxygenase

DCFH-DA - 2,7 diclorofluoresceína

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ERN-Espécies reativas do nitrogênio

ERO- Espécies reativas de oxigênio

Força G - Força gravidade

GNPs-Nanopartículas de Ouro

GPX – Glutathione Peroxidase

IFN- γ – Interferon Gamma

IGF- Insulin growth factor / fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 - Interleucina 1

IL-6 - Interleucina 6

iNOS- Oxido nítrico indutível

MAP- Mitogen activated protein/ proteína quinase ativada por mitógeno

MDA - Malondialdeído

MMPS - Metaloproteinases

MPO - Mieloperoxidase

NADPH - Fosfato dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzida

NF κ B- Fator Nuclear Kappa B, do inglês Factor Nuclear Kappa B

NO- Óxido nítrico

NOS- Óxido Nítrico Sintase

Nrf2 - Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OA- Osteoartrite

OONO- - Peroxinitrito

PGE- Prostaglandina

SOD – Superóxido Dismutase

TGF- Transforming growth factor / fator de transformação crescimento

TIMP-1 - Inibidores de tecidos de metaloproteinases

TNF- α -Fator de necrose tumoral VEGF - Fator de

Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 OSTEOARTRITE E CARTILAGEM.....	8
1.2 OSTEOARTRITE E INFLAMAÇÃO.....	11
1.3 OSTEOARTRITE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	12
1.4 ÁCIDO HIALURÔNICO E OSTEOARTRITE.....	14
1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO (GNPs).....	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.1.1 Objetivos específicos.....	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	19
3.2 ANIMAIS.....	19
3.3 MODELO DE OSTEOARTRITE.....	19
3.4 TRATAMENTO.....	21
3.5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS GNPs.....	19
3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	23
3.6.1 Oxidantes	23
3.7 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.....	23
3.8 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	24
3.9 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CITOCINAS.....	25
3.10 CONTEÚDO DE PROTEÍNAS.....	25
3.11 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS.....	25
4 RESULTADOS	26
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE.....	24
4.2 AVALIAÇÃO DOS NIVEIS DE CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS.....	24
4.3 AVALIAÇÃO DOS NIVEIS DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS.....	27
4.4 AVALIAÇÃO DOS NIVEIS DE OXIDANTES.....	28
4.5 DANO OXIDATIVO.....	29
4.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 OSTEOARTRITE E CARTILAGEM

A cartilagem articular é um tecido avascular e sem inervação formado por uma matriz extracelular abundante (cerca de 95%) e escassa celularidade (5%), composta por condrócitos e condroblastos responsáveis pelo processo de homeostase do tecido (Linden, 1977). Devido à grande quantidade de água presente na matriz extracelular (cerca de 80%), as duas principais características da cartilagem articular são elasticidade e compressibilidade. Os 20% restantes da matriz extracelular é formada, essencialmente, por colágeno tipo II (cerca de 90%), e o restante por colágenos dos tipos XI, VI e IX. De modo geral, o colágeno é a glicoproteína de maior abundância nos tecidos extracelulares. Quando sofre processo de dano articular esta cartilagem tem a base de seu colágeno substituído por colágenos do tipo I, III e V, chamada de fibrocartilagem, fazendo com que perca as suas características ideais de resistência e elasticidade; e a este processo denominamos osteoartrite. (Loeser et al., 2012).

Estima-se que cerca de um décimo da população mundial com mais de 60 anos tenha problemas sintomáticos que poderiam ser atribuídos à osteoartrite (Symmons et al., 2000). Como uma das doenças músculo-esqueléticas mais comuns, a osteoartrite é uma das principais causas de dor, incapacidade e redução da qualidade de vida. A prevalência da doença aumenta com a idade e está fortemente relacionada à obesidade. Supõe-se que a osteoartrite tornar-se-á um importante problema de saúde no futuro com o envelhecimento da população e a adoção de estilos de vida ocidentais. A prevalência de osteoartrite sintomática em pessoas com mais de 60 anos deverá ser de 30% até o ano 2030 (Croft, 2005).

Em nível global, a osteoartrite é a quarta causa principal de anos perdidos para a incapacidade (Symmons et al., 2000), e está associada a um fardo econômico extremamente alto. Como exemplo, os dados baseados no Reino Unido estimam que os custos totais diretos e indiretos associados à

osteoartrite sejam de 2 milhões de libras esterlinas / ano, incluindo 3 milhões de consultas de GP (General Practitioner) e 115 000 admissões hospitalares.

A análise das tendências temporais da substituição do quadril e do joelho no Reino Unido desde 1991 indica que as taxas de substituição articular aumentaram de forma particularmente acentuada na última década (Culliford et al., 2006). Resultados semelhantes foram relatados por outros países, por exemplo, a Itália (Piscitelli et al., 2012).

A etiologia da osteoartrite é multifatorial e até hoje não totalmente compreendida. A idade é o principal fator de risco independente da osteoartrite. Entretanto, o envelhecimento e a osteoartrite estão inter-relacionados, não interdependentes (Linden, 1977). Quando a senescência da cartilagem é, em certa medida, parte do envelhecimento normal e a relação entre o envelhecimento e o desenvolvimento da osteoartrite é incompletamente compreendida, torna-se evidente que as alterações do envelhecimento no sistema osteoartrite, contribuem para o desenvolvimento da patologia.

Além da idade, fatores intrínsecos (alinhamento, sobrecarga) e extrínsecos (genética) também contribuem para o desenvolvimento da OA (Linden, 1977). No paciente jovem, a patogênese da osteoartrite do joelho está predominantemente relacionada a uma biomecânica desfavorável da articulação, o que resulta em demanda mecânica que excede a capacidade da articulação de reparar e manter-se, predispondo a cartilagem articular à degeneração prematura (Buckwalter et al., 2005). Entretanto, a fisiopatologia do processo pelo qual a degeneração articular leva à síndrome clínica da osteoartrite permanece mal compreendida.

Estudos apontam que a osteoartrite é o resultado de eventos mecânicos e biológicos que desestabilizam os processos normais de degradação e síntese de condrocitos da cartilagem articular, matriz extracelular e osso subcondral (Heybeli et al., 2008). A fisiopatologia da osteoartrite é multifatorial, e como citamos acima, fatores como idade, obesidade, fatores genéticos, fatores hormonais, atividades ocupacionais, e, por último, o trauma, alteram a evolução da doença nos mais diversos segmentos e articulações (Liu-Bryan, 2015).

Genericamente, as osteoartrites são classificadas, independente da articulação acometida, em primárias e secundárias. As chamadas primárias são doenças geralmente poliarticulares e idiopáticas, portanto sem causa aparente,

enquanto as artroses secundárias são normalmente monoarticulares e relacionadas com trauma ou doenças reumáticas. As primárias costumam ter uma evolução menos agressiva e mais favorável ao tratamento clínico do que as secundárias (Heybeli et al., 2008; Waddell, 2012).

Todas as articulações são passíveis de desenvolverem o processo de desgaste da cartilagem que caracteriza o processo degenerativo da osteoartrite. Porém, as articulações do esqueleto axial como coluna, quadris, joelhos e tornozelos sofrem maior efeito da força da gravidade (força G), expostas a maior sobrecarga biomecânica, e, portanto, mais propensas ao desenvolvimento da patologia. Fato este, que não descarta a possibilidade de acometimento de outras articulações, como as articulações metacarpofalângicas distais dos dedos das mãos, considerada a mais característica delas, e por vezes responsável pelos primeiros sintomas relacionados com a idade (Ratneswaran et al., 2015).

Os principais sintomas da osteoartrite são dor e rigidez articular progressiva, levando a alterações biomecânicas angulares, que evoluem conforme a gravidade da doença aumentando o processo de desgaste da cartilagem articular, e por consequente, a dor. As principais causas de dor no processo de evolução da osteoartrite decorrem do processo inflamatório crônico recidivante do líquido sinovial articular, da formação de osteófitos causando elevação do periósteo, da distensão da cápsula articular e do aumento da pressão vascular no osso subcondral (Waddell, 2010).

O tratamento clínico da osteoartrite inclui além de mudanças comportamentais e atividades físicas de rotina para melhora do componente muscular de sustentação esquelética, algumas possibilidades de tratamento medicamentoso, devido ao processo inflamatório, que é consequência do quadro. Dentre as possibilidades de tratamento clínico medicamentoso temos o uso de analgésicos simples, como antiinflamatórios inibidores da Cox (ciclooxigenases), chamados de não hormonais, os corticoesteróides, e a associação entre as glicosaminas e condroitinas. Outra possibilidade mais recentes no tratamento clínico da osteoartrite é a aplicação de ácido hialurônico intra-articular (Mobasheri et al., 2010).

1.2 OSTEOARTRITE E INFLAMAÇÃO

Durante muito tempo a osteoartrite foi chamada de doença não inflamatória em função de seu processo insidioso. Nos dias atuais tem reconhecidamente em sua fisiopatologia um processo inflamatório crônico articular relacionado com a degradação da cartilagem articular, e por tal motivo tem-se difundido o termo osteoartrite para melhor definir a doença (Campbel, 2003).

O processo inflamatório crônico na osteoartrite tem como base o desequilíbrio entre os mecanismos de reparação e degradação da cartilagem articular. Os condrócitos são células altamente diferenciadas com alta capacidade de síntese dos componentes da matriz extracelular e das enzimas responsáveis por sua degradação. É a esse desequilíbrio entre os fatores reguladores dos mediadores pró-catabólicos, chamados de citocinas, e os fatores pró-anabólicos, que são os fatores de crescimento, que se atribui o processo de desenvolvimento da osteoartrite (Sellam e Berenbaum, 2010).

A partir de uma agressão, há uma falha da capacidade primordial de resistência e elasticidade da cartilagem articular relacionada com fatores multifatoriais da patologia, e os condrócitos e as células da sinovial desencadeiam uma resposta anabólica e catabólica articular (Hotamisligil, 2006). Na resposta anabólica inicial os condrócitos aumentam a síntese dos fatores de crescimento como TGF (transforming grown factor) e IGF1 (insulin grown factor). Estes fatores de crescimento aumentam a síntese dos elementos da matriz e inibem a apoptose dos condrócitos (Kapoor M, 2010).

Enquanto isso a resposta catabólica aumenta a expressão das citocinas pró-inflamatórias, principalmente da interleucina 1 (IL1), e especialmente da IL1- β inibidora da síntese de colágeno tipo II, principal componente da matriz extracelular depois da água. Essa interleucina (IL1- β) também induz a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias, especialmente da PGE2, que apresenta níveis elevados na cartilagem artrósica (Yusuf et al., 2010). O TNF- α é outra citocina pró-inflamatória encontrada em níveis elevados na osteoartrite, e age de maneira sinérgica à IL1- β . O número de receptores de IL1- β é muito maior em condrócitos artrósicos do que quando comparados a cartilagem normal (Goldring, 2006).

Essas citocinas pró-inflamatórias, ativam a cascata de fosforilação intracelular após se ligarem à membrana, especialmente pelas vias MAP

(mitogenactivated protein) e NF-kB (nuclear factor), desencadeando a síntese de proteínas inflamatórias como a COX-2 e a iNOS. Esta última, após a sua expressão, desencadeia a liberação do óxido nítrico (NO) que tem papel importante na degradação da cartilagem articular, sendo responsável pela inibição da síntese do colágeno e proteoglicanos, formadores básicos da matriz extracelular, assim como pelo aumento de outros danos oxidativos e apoptose precoce dos condrócitos (Goldring, 2010).

Essa degradação enzimática da cartilagem articular relacionada ao processo inflamatório crônico, leva à alteração e troca nos tipos de colágenos formadores da matriz determinando uma redução da resistência da cartilagem. A sinovite encontrada no processo crônico da osteoartrite é precoce e muitas vezes tem caráter subclínico, com poucos sintomas, mas já é basicamente responsável pelo processo insidioso e crônico da patologia (Bijlsma et al.,m 2011)

1.3 OSTEOARTRITE E ESTRESSE OXIDATIVO

As ERO são moléculas quimicamente reativas formadas a partir da redução univalente do oxigênio molecular gerando o radical superóxido e intermediários reativos como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila (D'Autreaux, 2007; Halliwell, 2007). Está bem estabelecido o importante papel que as ERO possuem, em concentrações fisiológicas, na manutenção das funções celulares dependendo da quantidade e do local onde são produzidas.

Embora necessárias para a defesa celular e demais funções, as ERO, quando produzidas em excesso, por exemplo, pela fagocitose, podem provocar estresse oxidativo, que agride constituintes celulares como lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (Halliwell, 2007). Os principais e mais importantes mecanismos de produção de ERO na lesão muscular são: o aumento na produção de superóxido mitocondrial, a ativação do complexo NADPH (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido) oxidase e a ativação da xantina oxidase. Na mitocôndria, uma das formas de produção de ERO é devido ao escape de elétrons entre o complexo I e ubisemiquinona e entre ubisemiquinona e o complexo III gerando maior parte dos superóxidos produzidos (Drose, 2012). Estima-se que de 2-4% do oxigênio mitocôndrial seja reduzido a superóxido (Halliwell, 2007). A ativação de leucócitos, após o dano muscular, estimula a produção ERO, em particular, os

neutrófilos são as maiores fontes de produção de superóxido pela reação NADPH-oxidase.

Entretanto, elevados níveis de ERO com declínio simultâneo do sistema de defesa antioxidante leva a possíveis danos a celulares devido à capacidade de reagir facilmente com biomoléculas que se localizam em torno de seu sítio de formação, podendo levar a prejuízos celulares como: peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e fragmentação de ácidos nucleicos) e resultando em disfunção ou morte celular assim como ao desenvolvimento de doenças (Valko., 2007; Roberts e Sindhu, 2009; Talukder, 2011).

Uma dessas doenças, como citamos acima, é a osteoartrite. Estudos mostram que a OA ocorre devido a um aumento da produção local de mediadores inflamatórios tais como interleucina IL-1 β , IL-6 e Fator de necrose tumoral (TNF- α), que são altamente expressos em condrócitos. Estas citocinas estimulam a degradação da cartilagem, levando a uma alta produção de ERO (R. Liu-Bryan, 2014). Além disso, condrócitos e colágeno da cartilagem mostram taxas metabólicas lentas, o que os torna altamente sensíveis aos efeitos acumulativos do estresse oxidativo (Yang et al., 2005).

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula na inflamação que ocorre na OA (Henrotin et al., 2003; Lee et al., 2013). Na verdade, quase todas as células incluindo condrócitos, fibroblastos sinoviais e adipócitos, podem produzir grandes quantidades de ERO e de NO em resposta a efeitos biomecânicos ou bioquímicos na articulação. A principal fonte de produção de ERO em articulações que sofrem traumas biomecânicos são as mitocôndrias. Evidências recentes sugerem que a disfunção mitocondrial pode contribuir para o desenvolvimento da OA (Blanco et al., 2013). De fato, dados *in vitro* mostraram que, em certas condições biomecânicas, as mitocôndrias podem produzir grandes quantidades de ERO na cartilagem, levando à morte celular. As ERO participam de vários processos da resposta inflamatória na OA, em particular, estimulando a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), por onde, especialmente as nanopartículas de ouro tem seu efeito antiinflamatório ativado. (Marcu et al., 2010).

1.4 ÁCIDO HIALURÔNICO E OSTEOARTRITE

O ácido hialurônico (AH) é um polímero natural da família dos glicosaminoglicanos. É um componente importante da matriz extracelular e está presente em altas concentrações na cartilagem e no líquido sinovial (Hempfling, 2015). Devido aos seus efeitos antiinflamatórios, lubrificante articular e anti-adesivo celular tem diversas aplicações clínicas, incluindo injeção intra-articular para osteoartrite, aumento de tecido mole em tratamentos estéticos (Friedman, 2002) cicatrização de feridas (Zeng et al.,2007) e prevenção de aderências após cirurgias (Zeng et al.,2007).

Alguns autores afirmam que o hialurônico de sódio, é uma fração definida do ácido hialurônico, que possui propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, contribuindo para a normalização da fluidez e da viscoelasticidade do líquido sinovial, e também para a ativação da regeneração tecidual na cartilagem afetada, além de restaurar o equilíbrio funcional da articulação. Portanto, é recomendada hoje na literatura sua utilização para o tratamento clínico da osteoartrite (Rezende et al.,2012; Pavelka, 2011).

Estudos têm relatado que, além de aliviar a dor e melhorar a função, o uso de ácido hialurônico poderia alterar o curso da osteoartrite e favorecer a preservação da cartilagem articular, facilitando o processo de regeneração da cartilagem agindo na diminuição do processo inflamatório crônico e reequilibrando a homeostase da articulação. Esses benefícios também são baseados na melhor qualidade da matriz, e em uma maior densidade de condrócitos em estudos de biópsia após a implementação do tratamento (Huang et al.,2011).

O uso de medicação intra-articular no pós-operatório imediato na área de cirurgias artroscópicas de joelho é controverso, com perspectivas de novos comportamentos e rotinas, e com autores a favor e contra o uso de ácido hialurônico (Heybeli et al., 2008; Waddelle Bert, 2010). Entretanto, o desempenho das articulações humanas está estritamente relacionado com as propriedades viscoelásticas do líquido sinovial, que determina a transmissão de força, lubrificação e proteção da cartilagem articular. Esta viscoelasticidade depende da concentração de ácido hialurônico no fluido sinovial (Carulli C et al., 2013). Existem no mercado vários preparados de ácido hialurônico e suas diferentes propriedades são dependentes basicamente de seus pesos moleculares. Ácidos hialurônicos de maior

peso molecular tem melhor resultado terapêutico (Waddell e Bert, 2010), além disso, alguns autores acreditam que o ácido hialurônico exógeno também estimula a produção de ácido hialurônico endógeno, o que explicaria seu efeito de longo prazo (Bagga et al., 2006)

Entre as ações do ácido hialurônico temos os efeitos antiinflamatório (pela diminuição da expressão gênica de citocinas, produção de prostaglandinas e concentração intra-articular de metaloproteinases) e analgésico (inibição de nociceptores), estabilização da matriz cartilaginosa, proliferação de condrócitos, aumento da produção de tipo II e sua diminuição da degradação (Conrozier et al., 2009; Pavelka, 2011)

Com relação ao efeito analgésico, acredita-se que inicialmente seu efeito analgésico seja menor do que o dos corticóides, porém mais efetivo em longo prazo. Ademais, os corticoesteróides também em longo prazo apresentam efeitos deletérios aos condrócitos ao sofrerem depósito na superfície da cartilagem na forma de cristais. Há também evidências clínicas de que quanto maior o espaço articular, ou seja, menor severidade da osteoartrite, melhor e mais prolongado é efeito do ácido do ácido hialurônico aplicado intra-articular (Ioan-Facsinay e Kloppenburg, 2012).

Ácido hialurônico (HA) são materiais de injeção intra-articular que têm sido utilizados amplamente para tratamento com OA. Drogas intra-articulares são agentes anti-inflamatórios e analgésicos, portanto, pode se usar como medida eficaz para aliviar os sintomas e prevenir a progressão da OA (Friedman, 1980). No entanto, esses fármacos não induzem a regeneração da cartilagem danificada, o que é crucial para a obtenção de "bons" resultados em longo prazo no tratamento da OA. Somente o tratamento cirúrgico tal como microfractura, auto-enxerto osteocondral, aloenxerto ou implantação de condrócitos autólogos proporcionam regeneração limitada da cartilagem articular em OA. Recentemente, vários estudos estão em andamento para avaliar células-tronco como uma medicina regenerativa para OA, com algumas pesquisas sendo traduzidas em estudos clínicos (Keerthi et al., 2013).

1.5 NANOPARTÍCULAS DE OURO (GNPs)

A nanotecnologia é claramente uma área de pesquisa em desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar, que engloba diferentes classes de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores e biomateriais), estruturados em escala

nanométrica-nanoestruturados de modo a formar “blocos de construção” (building blocks) como *clusters*, nanopartículas e, nanotubos nanofibrilas. A síntese de materiais em escala nanométrica antecipa a fabricação e o controle da estrutura da matéria em um nível molecular e representa o início de uma nova e revolucionária era, em que se pode ter acesso a materiais e dispositivos com novas propriedades e comportamentos de modo nunca visto (Duran, 2006).

A nanotecnologia é um campo em desenvolvimento e possui um enorme potencial para impactar positivamente no sistema de saúde. Importantes aplicações da nanotecnologia estão sendo empregadas na área da saúde e o conhecimento básico da interação dos nanomateriais com as células e suas consequências biológicas estão começando a evoluir (Bhattacharya, 2008; Arvizo et al., 2012).

O ouro tem sua própria importância devido a sua natureza relativamente não reativa e segura. Na medicina indiana, o ouro é usado para o tratamento de várias doenças (Prakash, 1999). Na alopatia, que é um sistema de medicina alternativa, o ouro vem sendo utilizado para tratar inflamações e artrite (Shukla et al., 2005). Existem inúmeras possibilidades para explorar combinações anti-inflamatórias que podem ser de origem inorgânica e com pouco ou nenhum efeito colateral.

Atualmente, as nanopartículas são amplamente utilizadas para a distribuição de várias moléculas bioativas para melhorar a eficiência do fármaco, devido a sua distribuição direcionada, toxicidade reduzida e captação aumentada. Vários métodos estão disponíveis para a síntese de nanopartículas com tamanho controlado e morfologia que permite o aprisionamento de uma ampla variedade de moléculas bioativas e sua liberação controlada (Malam et al., 2009; Ahn et al., 2013). As nanopartículas de ouro (GNPs) são promissoras devido à suas propriedades, como fácil síntese e funcionalização, biocompatibilidade, facilidade na permeabilidade celular e alta capacidade de carga da droga (Kim et al., 2009).

Sumbayev et al. (2013), demonstraram, que as GNPs estabilizadas por citrato diminuem a resposta celular induzida por IL-1- β in vitro e in vivo, bem como redução dos escores histológicos, densidade de microcapilares, infiltração de macrófagos em um modelo experimental de artrite. Estudos revelam o papel efetivo das GNPs como um agente antioxidante, por inibir a formação de ERO, agir como sequestrador de radicais livres, melhorando assim a ação de enzimas antioxidantes (BarathManiKanth et al., 2010; Sul et al., 2010). As GNPs também podem inibir a

angiogênese diminuindo seletivamente a ação do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (Mukherjee et al., 2005).

Além de todo o efeito antioxidante já demonstrado na literatura, o estudo de Kajita et al. (2007), mostra a relação direta da GNPs com os radicais livres, mostrando que as GNPs estão associadas à eliminação de radicais livres, ou na interrupção da vida desses radicais, como o peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, independente da dose. Também estudos mostraram que GNPs, foram eficientes por inibir a produção de óxido nítrico suprimindo a via Nf- κ B (Ma, 2010).

O estudo de Priyanka e cols de 2015 descreve a interação das GNPs com sulfato de condroitina. Um componente importante da cartilagem nativa é o colágeno que forma 2/3 do peso seco da matriz da cartilagem articular do adulto. A quebra de colágeno é considerada um passo crítico na progressão da OA e é utilizada como um marcador para monitorizar a progressão da doença. Sulfato de condroitina ajuda na produção de colágeno através do aumento da produção de TIMP-1 (Inibidores de tecidos de metaloproteinases MMPs) que degradam o colágeno tipo 2 (Pecchi et al., 2012). No estudo, observou-se um aumento de 2 vezes na produção de colágeno pelos condrócitos quando adicionou GNPs nas articulações lesionadas. Nenhuma atividade estimulante foi observada com GNPs sozinhas, suportando o papel das GNPs como veículo na administração de sulfato de condroitina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do tratamento intra-articular com AH associado a GNP's em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos wistar.

2.1.1 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do tratamento intra-articular com ácido hialurônico associado a GNP's sobre a articulação do joelho após 90 dias da indução do modelo mecânico de osteoartrite sobre:

- a) A produção de oxidantes, sistema de defesa antioxidante e danos oxidativos;
- b) Os níveis proteicos (ELISA) de citocinas pró inflamatórias (IFN γ , TNF- α , IL1- β , IL-6);
- c) Os níveis proteicos (ELISA) de citocinas anti-inflamatórias (IL4 e IL-10);
- d) Os níveis proteicos (ELISA) de fatores de crescimento envolvidos no reparo articular (TGF- α e FGF);

3 METODOLOGIA

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi submetido para a Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC, para avaliação e aprovação tendo todos os procedimentos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7). O mesmo foi aprovado sob o parecer nº 005-2017-2 no dia 22 de agosto de 2017 (Anexo A).

3.2 ANIMAIS

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 seis animais devido às análises 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 é controlada entre 20 ± 22 °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:6): Grupo 1-Sham

Grupo 2-Osteoatrose (AO)

Grupo 3-OA + Ácido Hialurônico (AH)

Grupo 4-OA + Nanopartículas de ouro (GNPs)

Grupo 5-OA + AH + GNPs

3.3 MODELO DE OSTEOARTRITE

O modelo de osteoartrite 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 concava 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 foram realizadas a mesma abordagem cirúrgica, baseadas na incisão padrão executada nos procedimentos de artroplastia, colocação de próteses, no tratamento de osteoartrite 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. (Insall,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 grupos de osteoartrose, 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 não houve 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.

3.4 TRATAMENTO

O tratamento intra-articular foi iniciado 30 dias após a indução do modelo de osteoartrite com frequência de uma aplicação a cada 15 dias durante 90 dias. Após 15 dias da última aplicação os animais foram anestesiados com isoflurano 4 % e levados a eutanásia por decapitação (Figura 2). A região do côndilo femural e do platô tibial do membro posterior direito foi cirurgicamente removida, processada e armazenada em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas e moleculares. As soluções na forma líquida de AH a 0,9 % e de GNPs (Tamanho 20nm e concentração de 2,5 mg/L) ou associadas foram preparadas nos dias de tratamento.

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

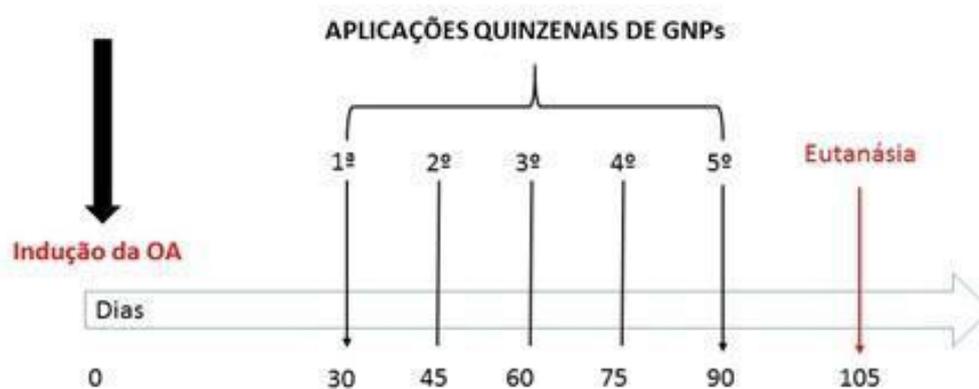


Figura 2: Linha do tempo com início do experimento, período de tratamento e fim do experimento.

3.5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS GNPs

GNPs de tamanhos médios de 20 nm foram sintetizadas como descrito por Turkevich e cols. (1951) com pequenas modificações, a partir de redução química do precursor metálico ácido tetracloroáurico (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 pela 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 foi ajustada.

Após a síntese, as soluções de GNPs foram caracterizadas empregando-se a técnica de espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), via monitoramento da banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), usando um espectrofotômetro modelo UV-1800, difração de raios-x, através do equipamento de LAB-X, modelo XDR-6000 (Shimadzu). Para a espectrometria de UV-visível, a medição da banda de SRP, foi realizada a temperatura ambiente num espectrofotômetro utilizando uma cubeta de quartzo contendo uma alíquota de 1 mL de cada uma das soluções, sendo que o espectro eletrônico das soluções foi monitorado diariamente ao longo de uma semana no intuito de revelar qualquer alteração do comprimento de onda na máxima absorção, obtendo-se valor de 532 nm para GNPs de 20 nm.

Para medidas de difratometria de raios-x (DRX), uma alíquota de 9 mL da solução de GNPs foi centrifugada a 10.000 rotações por minuto por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o material sedimentado transferido para uma porta amostra e seco em estufa. O material foi caracterizado com os seguintes parâmetros: Comprimento de onda da radiação do tubo de cobre: 1.54056 Å, voltagem de 30 kV, corrente 30 mA. Velocidade de varredura: 2°/min, ao passo de 0.02°, entre 20-80° (Balasubramanian et al., 2010). O diâmetro médio das GNPs foi calculado usando a equação de Scherrer $2\theta = 38^\circ$ (Yan et al., 2005). Onde, D é Diâmetro médio, K = 0,94, uma constante característica das partículas esféricas, λ é comprimento onda (raios-x usado): 1,54056, β : Largura da banda a meia altura (total na metade máxima do pico em radianos) e θ : ângulo de Bragg (do pico de 100% de intensidade) (Balasubramanian et al., 2010).

A concentração de ouro foi mensurada por espectrofotometria de absorção atômica (Varian model AA 240Z; Varian Medical Systems, Inc., Palo Alto, CA, USA) obtendo concentração de 2,5 mg/L. A concentração de ouro nas soluções de GNPs foi determinada por espectrometria de absorção atômica (EAA) utilizando um espectrofotômetro modelo AA240 FS-Fast Sequential Atomic Absorption

Spectrometer marca VARIAN.

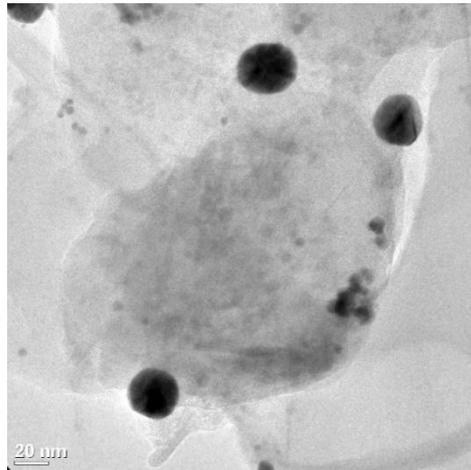


Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão de GNP's com diâmetro de 20 nm. GNP's esféricas preparadas em solução aquosa.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 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 ERO de acordo com o método descrito anteriormente Lebeland. (1992), com algumas modificações.

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 foi 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 (NaNO₂). Os resultados foram calculados em $\mu\text{mol Nitrito/mg proteína}$ (Chae et al., 2004).

3.7 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 e Markesbery, 2000).

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 M⁻¹. cm⁻¹.

Níveis de Malondialdeído (MDA): Como índice de peroxidação de lipídeos foi verificado a formação de MDA e mensurado no aparelho HPLC proeminence Shimadzu em uma coluna Ascentis® C18 (250 x 2.1 mm, 5 µm) Supelco Sigma-Aldrich, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo Grotto et al. (2006)

3.8 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Superóxido Dismutase (SOD): Foi medida pela inibição da oxidação da adrenalina adaptado de Bannister e Calabrese, (1987). As amostras de tecido ósseo foram homogeneizadas em tampão de glicina. Os volumes de 5, 10 e 15ul foram retiradas 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).

Atividade da Glutathione Peroxidase (GPX): A determinação da atividade da GPX foi realizada a partir da taxa de decaimento do NADPH. A determinação será realizada em espectrofotômetro a 340 nm, conforme Flohé e Günzler, (1984). Os resultados foram calculados como U/ mg de proteína, sendo que 1U corresponde a 1µmol de peróxido transformado em água por minuto.

Glutathiona (GSH): Os níveis de GSH foram determinados como descrito por Hissin & Hilf (1976), com algumas adaptações. GSH foi mensurada em homogenato ósseo após precipitação de proteína com 1 mL proteína de ácido tricloroacético 10%. Parte da amostra será adicionado um tampão de fosfato 800 mM, pH 7,4 e 500 μ M DTNB. O desenvolvimento de cor resultante a partir da reação entre o DTNB e tióis atingi um máximo em 5 minutos e manteve estável durante mais de 30 min. A absorbância foi lida a 412nm depois de 10 min. Uma curva padrão de glutathiona reduzida foi usada para calcular os níveis de GSH nas amostras.

3.9 DETERMINAÇÕES DO CONTEÚDO DE CITOCINAS

As amostras serão processadas e após será sensibilizado a placa para posterior incubação com o anticorpo. Para dosagem das citocinas (IFN γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, TGF- α e FGF) será utilizado o método enzyme-linked immuno absorbent assay (Duoset ELISA) de captura (R&D system, inc., Minneapolis, USA).

3.10 CONTEÚDO DE PROTEÍNAS

O teor de proteína a partir de tecido ósseo homogenizado foi ensaiado utilizando albumina de soro bovino como um padrão, de acordo com Lowry, (1951). Reagente fosfomolibdicofosfotúngstico (Folin fenol) ser adicionado para ligarse à proteína. O reagente foi lentamente reduzido passando de amarelo para azul.

3.11 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 Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de $P < 0,05$. Foi utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 17.0 como pacote estatístico

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE

Primeiramente avaliamos a atividade da MPO como marcador secundário de infiltração de neutrófilos. Conforme a figura 3, observamos um aumento significativo em sua atividade no grupo OA em relação ao sham, porém os grupos tratados com AH, GNPs e combinados apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo OA.

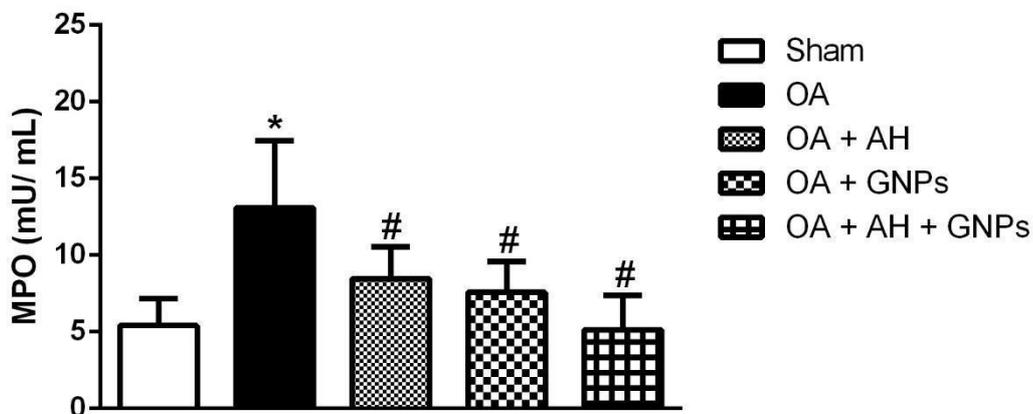


Figura 4: Avaliação da atividade da Mieloperoxidase. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$ versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste pelo teste post hoc Newman-Keuls).

4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS

Avaliamos também os níveis das principais citocinas pró inflamatórias envolvidas nos processos de degeneração articular (IF- γ , TNF- α , IL1 β e IL-6). Podemos observar conforme a figura 1, que os grupos OA, OA + AH, OA + GNPs apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo sham, entretanto o grupo OA + AH + GNPs teve uma redução significativa em relação ao grupo OA.

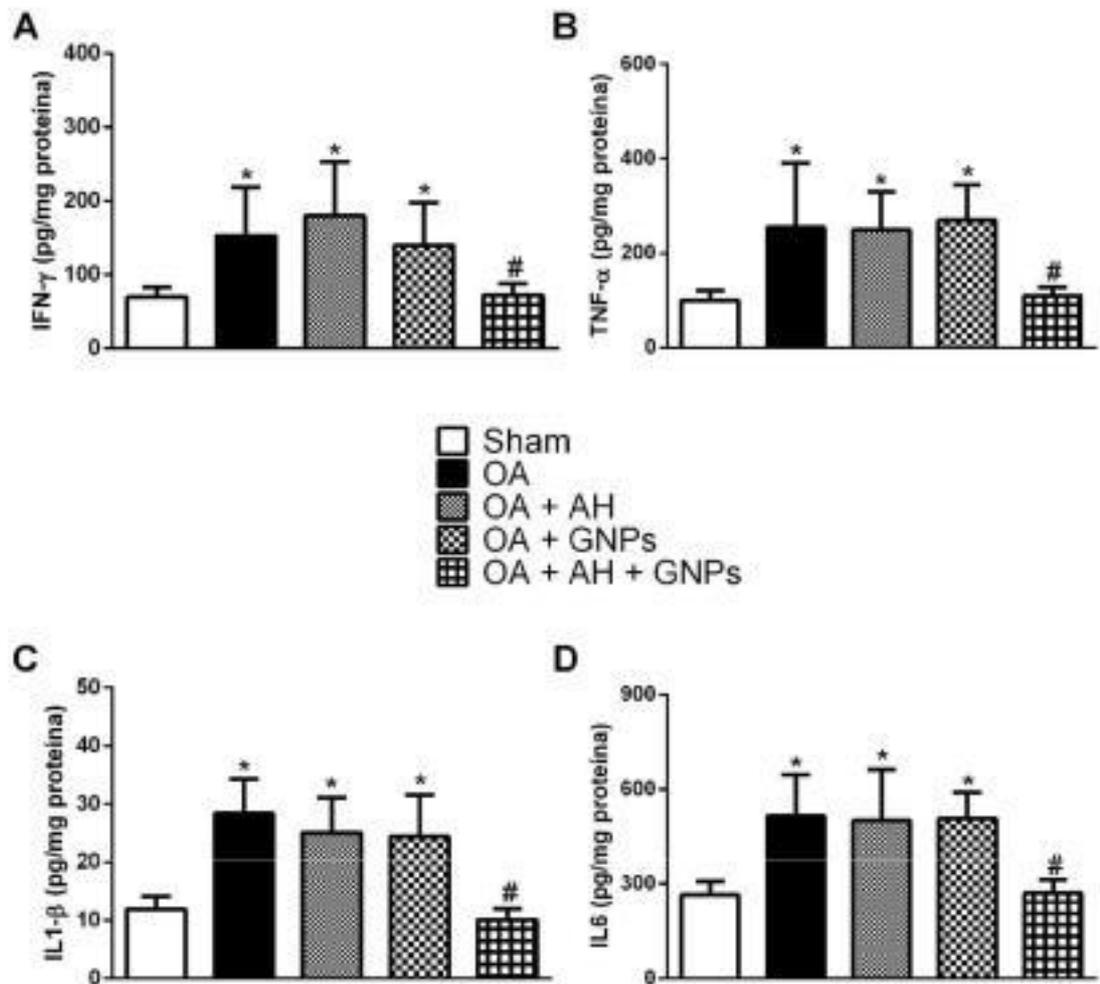


Figura 5: Níveis proteicos de IFN- γ (A), TNF- α (B), IL-1 β (C), IL6 (D) avaliados por ELISA. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$ versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

4.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS

Para avaliar a participação da resposta inflamatória crônica na regeneração articular quantificamos os níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL10 e IL4) e de fatores de crescimento (TGF- α e FGF). Como mostra a figura 1, os níveis de IL4 apresentaram uma diminuição significativa no grupo OA em relação ao sham, entretanto, os grupos com tratamento isolado ou combinado apresentaram um aumento significativo em relação aos grupos sham e OA. Nos níveis de IL10 os grupos induzidos ao modelo de OA e tratados com AH e AH + GNPs demonstraram um aumento significativo em relação aos grupos sham e OA, porém o grupo tratado com GNPs teve um aumento significativo apenas em relação ao grupo OA.

Além disso, os níveis de TGF- α apresentaram aumento significativo apenas no grupo tratado com AH + GNPs em relação aos grupos sham e OA. Avaliamos também os níveis de FGF onde podemos observar que todos os grupos tratados com AH e/ou GNPs mostraram um aumento significativo em relação aos grupos sham e OA.

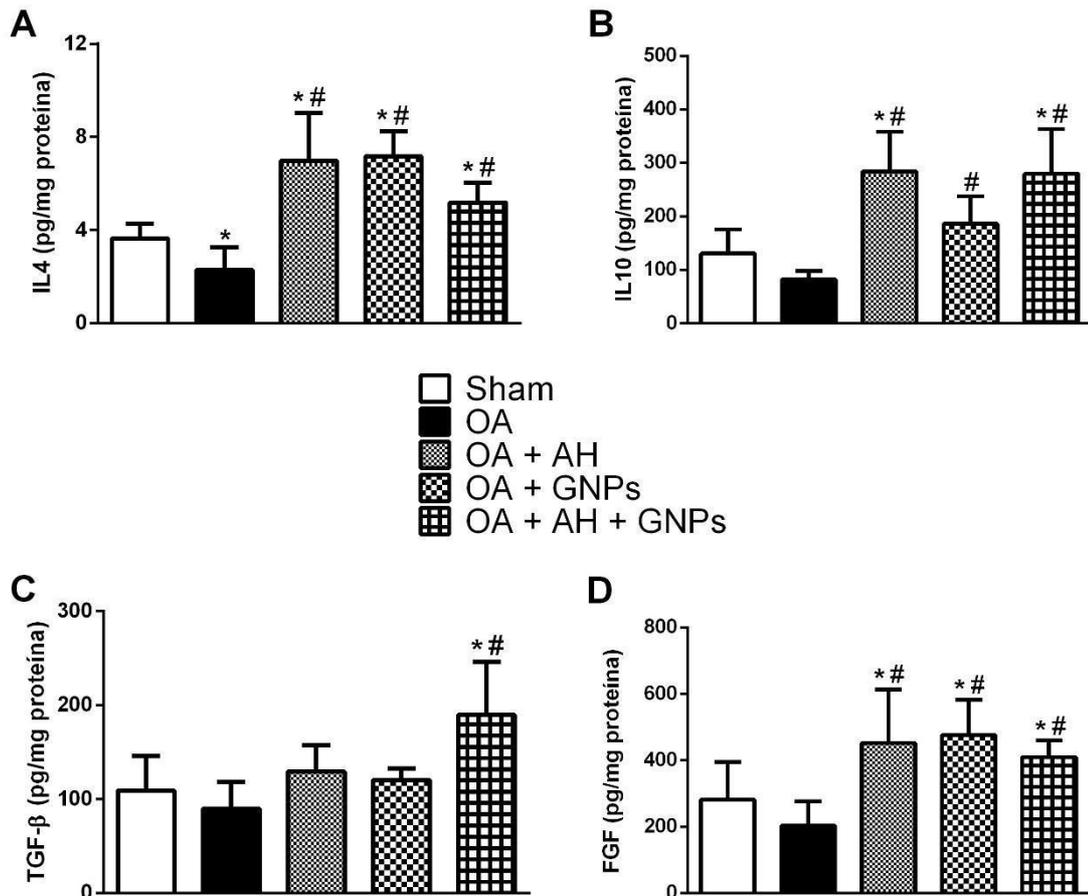


Figura 6: Níveis proteicos de IL4 (A), IL10 (B), TGF- β (C), FGF (D) avaliados por ELISA. Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$ versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

4.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE OXIDANTES

Com intuito de avaliar a participação do estresse oxidativo no modelo mecânico de osteoartrite e os efeitos dos tratamentos propostos, avaliamos os níveis de oxidantes, danos oxidativos e a atividade de enzimas antioxidantes.

Primeiramente avaliamos os níveis de DCF na cartilagem articular e podemos observar que o grupo OA apresentou um aumento significativo em relação ao grupo sham e os grupos tratados com AH e/ou GNPs diminuíram de forma

significativa esses valores em relação ao grupo OA. Nos níveis de nitrito os grupos OA e AO + AH demonstraram um aumento significativo em relação ao grupo sham, porem os grupos OA + GNPs e OA + AH + GNPs tiveram uma redução significativa em relação ao grupo OA.

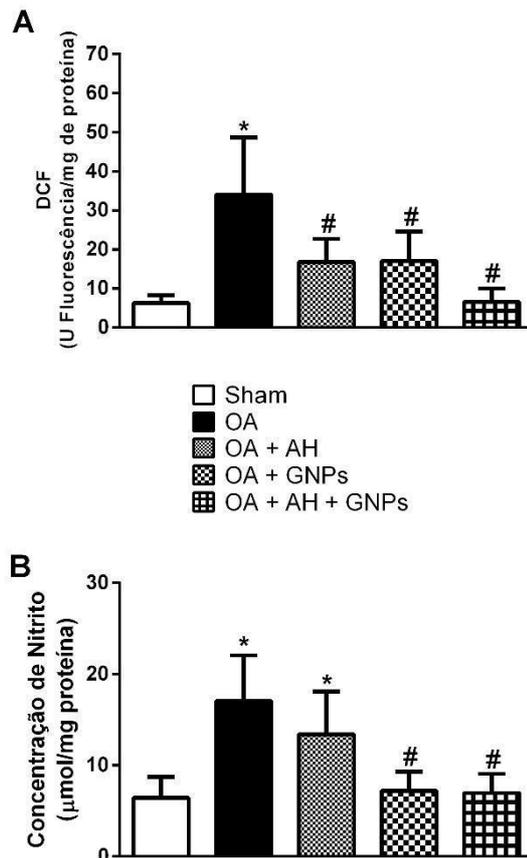


Figura 7: Avaliação dos níveis de DCF (A) e Nitrito (B). Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$ versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

4.5 DANO OXIDATIVO

Nos níveis de MDA quantificados por HPLC os grupos AO, AO + AH e AO + GNPs apresentaram um aumento significativo em relação ao grupo sham, entretanto o grupo AO + AH + GNPs teve uma diminuição significativa em relação ao grupo AO. Na carbonilação de proteínas podemos observar um aumento significativo no grupo OA em relação ao grupo sham e todos os grupos tratados com AH e/ou GNPs tiveram uma redução significativa em relação ao grupo OA. Por fim, os níveis de sulfidrilas apresentaram uma redução significativa em todos os grupos com OA em relação ao sham.

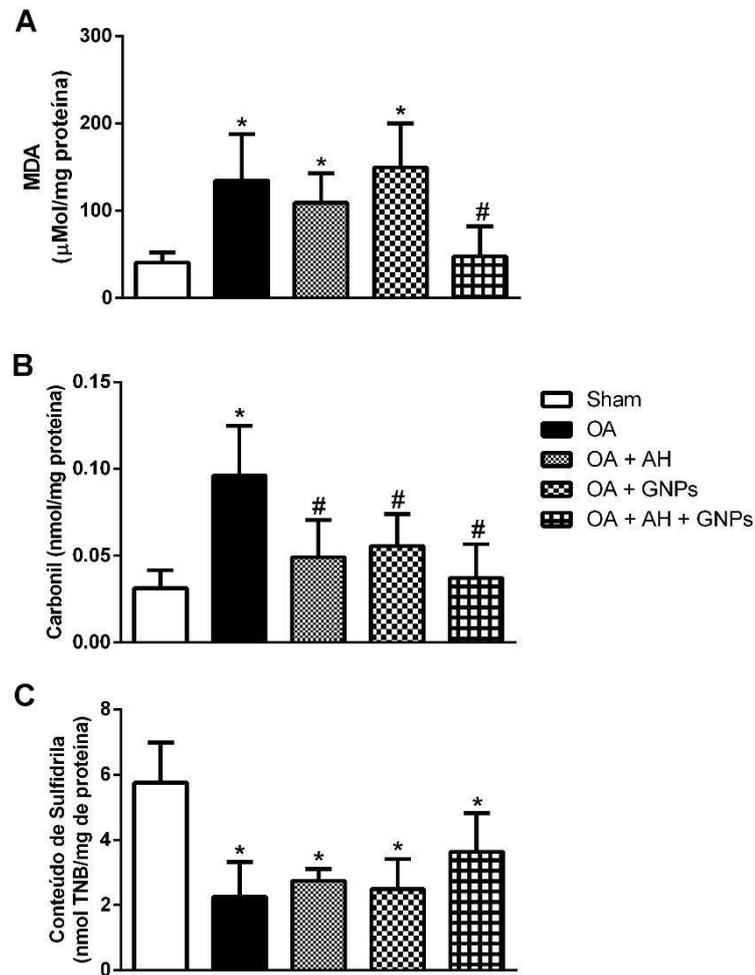


Figura 8: Avaliação do dano oxidativo por meio dos níveis de MDA (A), Carbonil (B) e Conteúdo de Sulfidril (C). Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$ versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

4.6 SISTEMA ANTIOXIDANTE

Para avaliar a atividade do sistema antioxidante articular frente ao modelo mecânico de AO e aos tratamentos avaliamos a atividade da SOD e GPx e os níveis de GSH. Na atividade das enzimas SOD e GPx e nos níveis de GSH podemos observar uma redução significativa no grupo OA em relação ao grupo sham e que todos os tratamentos com AH e/ou GNPs demonstraram um aumento significativo em relação ao grupo OA.

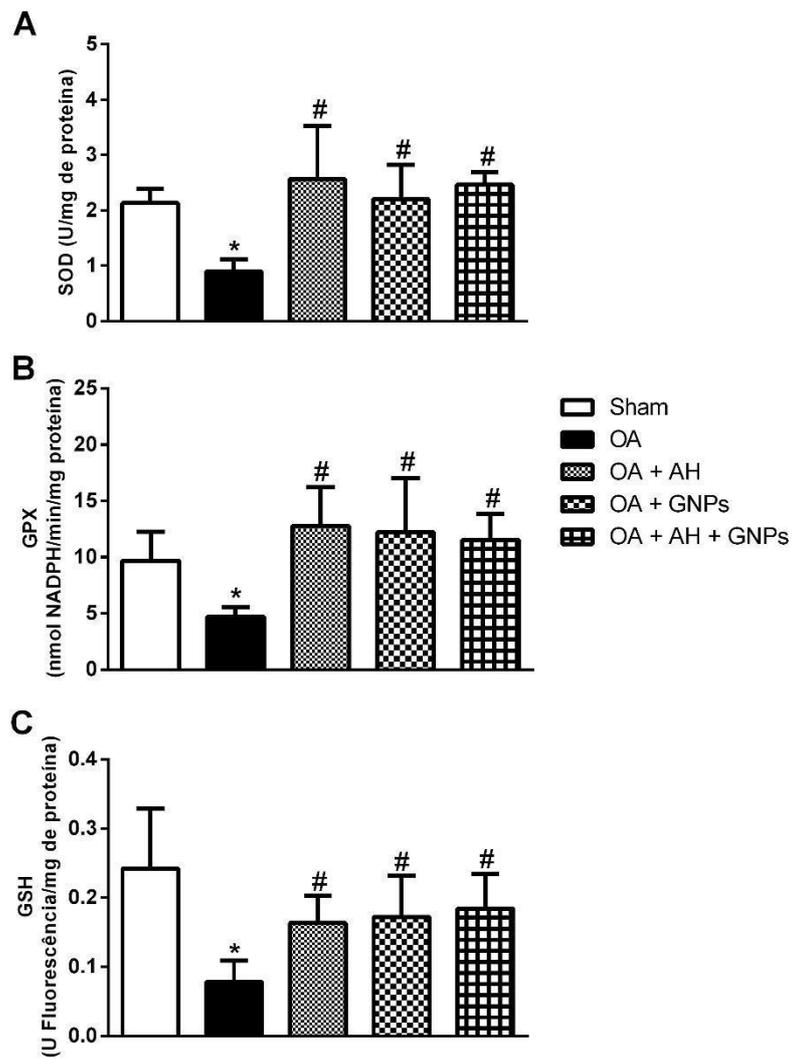


Figura 9: Avaliação dos níveis da atividade antioxidante da SOD (A), GPX (B), e níveis totais GSH (C). Os dados são apresentados em Média \pm EPM, no qual: * $p < 0,05$ v.s Grupo Sham; # $p < 0,05$ versus Grupo OA (ANOVA de 1 via seguido de teste post hoc Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

A osteoartrite é a doença inflamatória crônica degenerativa de maior incidência em indivíduos acima de 65 anos, caracterizada por lento e progressivo desgaste da superfície articular, dor espontânea ao repouso ou ao movimento, redução da amplitude de movimento (ADM) e crepitação (Iturriaga et. Al, 2017).

Devido à natureza avascular da cartilagem e sua incapacidade de superar a resposta inflamatória, a mesma é facilmente atacada por fatores pró-inflamatórios e estresse oxidativo (ZHANG et al, 2014). Muitas citocinas, ERO e ERN são conhecidas por serem mediadores deste processo, dentre elas TNF- α , IL1- β e NO. A ocorrência da fagocitose e o consequente aumento no consumo de oxigênio também constitui fonte importante de formação de ROS (Shafer et. Al, 1994; Iturriaga et. Al, 2017; Hirota, 1998; Takahashi et. Al, 1996), os quais são considerados fatores etiogênicos da OA.

O papel do NF- κ B também tem sido reportado na OA. Olivotto (2014), afirma que o fator nuclear κ B (NF- κ B) orquestra processos ativados por estresse mecânico, inflamatório e oxidativo. A fosforilação de I κ B quinase (IKK) ativa os dímeros de NF- κ B, os quais podem translocar para o núcleo e regular a expressão de genes alvo específicos envolvidos na remodelação da matriz extracelular e na diferenciação terminal de condrócitos. Portanto, medidas que visem o controle destes processos e busquem atenuar danos secundários aos tecidos são extremamente importantes, constituindo alvo terapêutico da doença.

Na fase aguda, a OA acarreta em grande infiltração de neutrófilos no líquido sinovial, os quais são responsáveis pela liberação de uma variedade de mediadores pró inflamatórios, produção de ROS, e consequente aumento na atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO). O papel desta enzima é catalisar a oxidação e a cloração de macromoléculas usando peróxido de hidrogênio como substrato para formação de ácido hipocloroso (Stamp et.al, 2012; Sanfins et. Al, 2018). Robinson et al., (2016) afirmam que na OA macrófagos sinoviais nas articulações acometidas são também ativados e contribuem para a destruição da cartilagem e formação de osteófitos por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Danos ao menisco ou ligamentos no joelho causados por trauma ou microtraumas repetidos são amplamente aceitos como causas comuns de osteoartrite. Segundo dados apresentados por Bagi et al. (2015), a menissectomia

medial unilateral (MM) em ratos resulta primariamente em alterações degenerativas rápidas e progressivas da cartilagem articular do planalto tibial medial, enquanto a patologia óssea subcondral (esclerose e formação de osteófitos) é considerada secundária e reflete a adaptação local do esqueleto a novas demandas mecânicas. Estes danos ao tecido articular foram encontrados após 10 semanas do procedimento cirúrgico.

Nosso modelo foi eficaz na mimetização do quadro inflamatório presente na OA, expresso pelo aumento de MPO associado à elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL1- β e IL-6. Estes resultados corroboram com os achados de Fioravanti et al., (2018), o qual realizou análise destes marcadores em 135 pacientes acometidos por OA nas mãos. Punzi et al., (2012) também demonstraram aumentos na MPO e na forma nitrada de fragmentos derivados do colágeno tipo II (Coll2-1NO₂) em pacientes com OA em comparação a osteoartrite não erosiva da mão (NEHOA). Aumento de TGF- β , infiltração celular e destruição da cartilagem, foram encontrados no estudo de Wen et al. (2016), em que a OA foi induzida em 35 animais a partir da liberação cirúrgica do ligamento cruzado anterior (LCA) num experimento de 20 semanas de duração. Um estudo utilizando um modelo de OA quimicamente induzida foi realizado por El-Seoudi et al. (2017) e demonstrou aumento nos níveis de FGF e MMP13 através da utilização de ácido monoiodoacético intraarticular em 16 animais durante um período de 21 dias.

Mimetizando a doença, nosso modelo induziu o aumento das citocinas pró-inflamatórias no grupo OA, o que corrobora com dados de recentes estudos em que tecidos e fluidos sinovial de pacientes acometidos pela doença possuem níveis elevados de proteínas plasmáticas e mediadores inflamatórios (Robinson et al., 2016). Para Zhang et al. (2014), níveis aumentados de IL-1 β e TNF α são de grande importância para a destruição da cartilagem na OA.

Além de responsáveis pelo catabolismo da cartilagem, citocinas pró inflamatórias tem sido propostas como responsáveis pela inibição de processos anabólicos essenciais à homeostase da cartilagem. O aumento de marcadores pró-inflamatórios está associado à maior produção de ácido aracdônico e prostaglandinas (Hirota, 1998) os quais favorecem a vasodilatação e formação de edema, causando amplificação da resposta inflamatória. No entanto, Robinson et al. (2016) afirma que a precisa contribuição de diferentes citocinas para OA ainda precisa ser elucidado.

O controle do processo inflamatório afim de evitar danos aos tecidos constitui um dos principais objetivos de tratamento da OA. Pesquisas feitas demonstram resultados promissores a partir da utilização de AH e GNP como terapias adjuvantes ao tratamento (Tsai et.al, 2007; Leonavičienė et al.,2012). Tsai (2007) relata diminuição significativa na infiltração de macrófagos, assim como dos níveis destes marcadores no líquido sinovial de animais com artrite tratados com nanopartículas de ouro. Em nosso estudo, o tratamento com AH associado a GNP diminuiu os níveis de citocinas pró-inflamatórias juntamente aos níveis de MPO. Este resultado pode ser justificado pelo mecanismo de ação das GNPs na IL1- β , impedindo sua ligação ao receptor IL1-R na membrana, e desta forma evitando sua translocação para o núcleo, bloqueando a cascata de sinalização (Zhang et al, 2014; Rocha et al., 2016). Outro mecanismo proposto envolve o bloqueio da ativação do NF-kB por meio da interação com o componente CYS-179 do IKK-B e consequente diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 e IL-6 (Jeon et al., 2003). Esta ação anti-inflamatória da GNP já foi documentada em outros estudos (Chen, 2013; Karthick et al., 2014; Silveira et al., 2014).

De acordo com o estudo feito por Hempfling et al., (2016) a aplicação de AH é justificada pela sua capacidade de reduzir a permeabilidade vascular, inibir a migração de PMN (leucócitos e macrófagos) e a fagocitose. Iturriaga (2017) e Clementi et al. (2017) sugerem que o AH age não apenas como suplemento viscoso na redução da fricção mecânica, mas também na regulação da ativação do plasminogênio, prevenção da liberação de mediadores inflamatórios, como IL1- β e melhora na síntese de proteoglicanos. Em nosso modelo, a atenuação da resposta inflamatória e o melhor controle dos danos foi alcançada através da associação de GNP + AH, com níveis de citocinas pró-inflamatórias próximos aos valores basais. Acreditamos que isso se deva à grande capacidade da GNP como agente carreador, facilmente capaz de se conjugar à outras moléculas (Tsai et al., 2007), desta forma promovendo uma maior infiltração e interação do AH com o tecido lesado. Além disso, Lee et al. (2014) afirma que ligação entre o hialuronato e GNPs é capaz de reduzir a ligação desta molécula a proteínas séricas não-específicas, desta forma favorecendo a infiltração seletiva no tecido alvo.

A OA é considerada uma doença inflamatória crônica de baixo grau em que o processo de reparo é em parte mediado pela liberação de citocinas anti-inflamatórias. Dados do estudo de Zhang (2014) afirmam que a liberação de IL-4 e a

IL-10 endógenas mostraram não apenas reduzir a IL1, mas também ter efeitos estimuladores ou protetores diretos no metabolismo dos condrócitos. Em nossos achados, os níveis de citocinas IL4 e IL10 foram maiores nos grupos tratados quando comparados ao grupo OA. Acreditamos que tanto o uso isolado quanto a combinação de GNP e AH possam ter auxiliado na estimulação da resposta inflamatória crônica, isso poderia acarretar em uma proteção pelo menos em parte do tecido lesado aos efeitos deletérios da resposta aguda exacerbada.

Na forma isolada, o uso do AH ou GNPs não mostrou-se eficaz no controle da fase inflamatória aguda conforme demonstra a figura 1. O concomitante aumento de citocinas pró e antiinflamatórias encontrado gera um quadro de inflamação persistente atualmente chamada de “mal resolvida”, caracterizado por infiltração celular constante. Segundo Nathan e Ding (2010), frequentemente a inflamação aguda e crônica podem coexistir por períodos prolongados, implicando em uma reinicialização contínua, como o que ocorre na artrite reumatoide que apresenta um quadro de inflamação crônica com infiltração extensa de neutrófilos e linfócitos. Para o autor, a perpetuação da inflamação é um risco inerente porque danifica o tecido, e a necrose provoca aumento da resposta inflamatória, gerando um ciclo que impede a finalização do processo de reparo.

Para a integridade da cartilagem articular, os fatores de crescimento TGF- β e FGF são considerados essenciais e estão presentes em níveis elevados na cartilagem normal (Wen et al., 2016), como demonstrado pelo grupo Sham (Figura 6) Tecidos acometidos por OA apresentam expressão reduzida destes marcadores, o que corrobora com nossos achados. Em nosso estudo, todas as terapias foram capazes de promover aumento nos níveis de FGF; enquanto que a terapêutica combinada foi a única a promover elevação nos níveis de TGF- β . Este resultado nos leva a supor que a terapia combinada foi capaz de acelerar a resolução do processo de reparo, pois obtivemos redução dos níveis de citocinas pró inflamatórias associado ao concomitante aumento de citocinas anti-inflamatórias responsáveis pela resposta final do processo de reparo. Ademais, Zhang et al, (2014) classificam TGF- β e FGF como os maiores fatores anabólicos de formação de cartilagem, sendo responsáveis pela síntese de proteoglicanos e da matriz extracelular, colágeno tipo II, indução de proliferação celular, diferenciação condrogênicas das células satélites e diminuição dos efeitos catabólicos das citocinas. Além disso, para Wen et al. (2016), o TGF- β é também capaz de neutralizar IL-1, apresentando, portanto, ação anti-inflamatória, o

que poderia igualmente justificar nossos achados e fundamentar nossas especulações.

Dados encontrados na literatura apontam uma relação direta entre o aumento na concentração de ROS e as reações inflamatórias locais decorrentes da OA, como causadores do aumento do desgaste articular. A produção de ROS e o estresse oxidativo foram encontrados elevados em pacientes com osteoartrite (Lepetsos, 2016; Altay et al, 2015; Erturk et al, 2012; Altindag et al, 2007). Nosso modelo de OA também induziu um aumento na produção de oxidantes (DCF e nitrito) e de dano celular oxidativo (Sulfidril, Carbonil e MDA). Os resultados encontrados neste estudo demonstram que as duas terapias, AH e GNP, utilizadas de forma isolada são capazes de reduzir estes marcadores, corroborando com estudos de Barathmanikanth, (2010) e Hirota (1998). No entanto, apesar do efeito benéfico das terapias isoladas, o grupo que recebeu a terapia combinada (AH + GNP) teve o efeito potencializado. Razzaq et al., (2016) mostraram que as GNPs possuem cargas positivas e por isso têm a tendência de se estabilizar a partir da interação com moléculas de carga negativa; desta forma neutralizando a ação dos radicais livres. Estudos prévios apontam que as GNPs são substâncias biocompatíveis, de simples preparação e tendência à forte ligação por grupamentos tióis e aminas (Mukherjee et al., 2005; Hainfeld et al., 2006).

Os produtos resultantes da degradação da cartilagem podem induzir ao aumento na inflamação e produção de ROS, através da ativação da expressão da óxido nítrico sintase indutível (iNOS). Este quadro acaba criando um círculo vicioso que resulta na progressão da OA. O excesso de produção de óxido nítrico (NO) desempenha um papel patogênico importante na OA (Amin et al, 1995; Mazzetti et al, 2001). Sabe-se que o óxido nítrico tem muitas funções de sinalização e pode reagir prontamente com o superóxido para formar o peroxinitrito (ONOO^-) levando à depleção dos grupos tióis nas células. Esta modificação de grupos tióis pode alterar o balanço redox e desempenhar um papel importante em inúmeras vias de sinalização celular (Powers, 2011). Em nosso estudo observou-se uma elevação nos níveis de NO no grupo AO; comparado aos grupos tratados, o que pode ser explicado pelo fato de a GNP inibir a produção de NO e a expressão do gene iNOS (Ma et al., 2010). O AH, em conjunto, contribuiu para essa ação. A regulação de NO a partir do uso de AH já foi comprovada por outros estudos, como no de Guarda Nardini et al (2004), em que os níveis de NO melhoraram com a aplicação do AH, e Del Rosso et al (2005)

que mostrou que a aplicação de um ciclo de 5 infiltrações semanais de AH regula os níveis de NO. Iturriaga et al (2017) fez uma revisão na qual 87 pacientes com OA obtiveram uma melhora nos níveis basais de NO quando tratados com AH.

Agentes antioxidantes aumentam sua atividade e expressão na tentativa de proteger a célula contra espécies reativas. Estudos experimentais da OA em humanos e animais indicam redução na capacidade antioxidante no sistema da glutathiona e redução da atividade de algumas enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, como SOD, catalase e GPX (Olszewska-Stonina et al, 2010; Scott et al, 2010). Estes dados corroboram com nossos achados, nos quais o grupo OA apresentou diminuição nas atividades das enzimas SOD, GSH e GPX. Todos os grupos tratados apresentaram aumento na atividade dessas enzimas antioxidantes, o que deixa evidente o papel da GNP como potencial agente antioxidante, por inibir a formação de ERO e agir como sequestradores de radicais livres, melhorando assim a ação de enzimas antioxidantes (Barathmanikanth et al., 2010). Outros estudos demonstraram que as GNPs, em células epiteliaias, aumentam níveis de NRF2, fator que induz a sinalização de genes antioxidantes. Este aumento é causado por ação das GNPs que afetam as ligações tióis de keap1, assim, mudando sua conformação e liberando NRF2 para posterior transcrição de genes citoprotetores, desta forma, contribuindo com efeito antioxidante (Lai et al., 2015; Xu et al., 2017). Estes resultados incluem a ação do AH sobre o processo de OA. O AH é uma molécula de alto peso molecular que suprime a resposta imune prevenindo a exacerbação da inflamação (Manzanares et al, 2007). O efeito da AH como anti-inflamatório também foi demonstrado por Engström et al (2001), em pacientes com periodontite crônica.

O tratamento da OA é considerado um desafio terapêutico uma vez que a cartilagem é um tecido avascular. O processo de reparo deste tecido resulta em processo inflamatório não resolvido. Terapias que busquem a resolução do processo e a regeneração tecidual são de extrema importância. O potencial antioxidante e anti-inflamatório da GNP, assim como a ação anti-inflamatória do AH foi demonstrado neste trabalho, em que a terapia combinada gerou melhores resultados na resolução/atenuação do processo inflamatório e do estresse oxidativo.

6 CONCLUSÃO

O uso isolado do AH e da GNP mostrou efeitos benéficos sobre a resposta inflamatória crônica articular. É sabido que essas duas moléculas possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, como demonstrado nesse referido trabalho.

No entanto, o tratamento combinado de AH + GNP mostrou-se mais eficaz no controle do processo inflamatório no modelo experimental de OA. Acreditamos que esse efeito potencializado deve-se ao aumento da biodisponibilidade que as nanopartículas proporcionam, e pela ação scavenger que ambas possuem. Novos estudos que visem a melhora da fisiopatologia da OA devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- Alcaraz, Maria José et al. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology*, [s.l.], v. 80, n. 1, p.13-21, jul. 2010. Elsevier BV.
- Aigner T, Rose J, Martin J, Buckwalter J. Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. *Rejuvenation Res.* 2004; 7:134–145.
- Bagga H, Burkhardt D, Sambrook P, March L. Longterm effects of intra-articular hyaluronan on synovial fluid in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 2006;33(5):946–50.
- BAKER, Michelle; BROOK, Bindi S.; OWEN, Markus R.. Mathematical Modelling Of Cytokines, Mmps And Fibronectin Fragments In osteoarthritic cartilage. *Journal Of Mathematical Biology*, [s.l.], v. 75, n. 4, p.985-1024, 17 fev. 2017. Springer Nature.
- Bannuru RR, Natov NS, Dasi UR, Schmid CH, McAlindon TE. Therapeutic trajectory following intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis-meta-analysis. *Osteoarthritis Cartil.* 2011;19(6):611–9
- Bhattacharya R, Mukherjee P. Biological properties of "naked" metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008; 60: 1289–1306.
- Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet.* 2011; 377:2115–26.
- Bijlsma JWJ, Berenbaum F, Lafeber FPJG. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 2011;377:2115e26,
- Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C. The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7:161e9.
- Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ (2005) Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 54:465–480.
- Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.* 2005; 54:465–480.
- Bullough PG. Joints. In: Mills SE (ed) *Histology for pathologists*, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2007; 97–121.
- Cai A, Hutchison E, Hudson J, Kawashima Y, Komori N, Singh A, et al. Metabolic enrichment of omega-3 polyunsaturated fatty acids does not reduce the onset of idiopathic knee osteoarthritis in mice. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(9):1301–1309.
- Campbel. *Operative orthopaedics de S. Sociedade brasileira de Ortopedia e Traumatologia (SBOT)*, 2003.

Carulli C, Matassi F, Civinini R, Morfini M, Tani M, Innocenti M. Intra-articular injections of hyaluronic acid induce positive clinical effects in knees of patients affected by haemophilic arthropathy. *Knee*. 2013;20(1):36–9

Clarke S, Lock V, Duddy J, Sharif M, Newman JH, Kirwan JR. Intra-articular hylan G-F (Synvisc®) in the management of patellofemoral osteoarthritis of the knee (POAK). *Knee*. 2005;12(1):57–62.

Conde J, Gomez R, Bianco G, Scotece M, Lear P, Dieguez C, et al. Expanding the adipokine network in cartilage: identification and regulation of novel factors in human and murine chondrocytes. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:551e9.

Conrozier T, Jerosch J, Beks P, Kemper F, Euller-Ziegler L, Bailleul F, et al. Prospective, multi-centre, randomized evaluation of the safety and efficacy of five dosing regimens of viscosupplementation with hylan G-F 20 in patients with symptomatic tibio-femoral osteoarthritis: a pilot study. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009;129(3):417–23.

Croft P. The epidemiology of osteoarthritis: Manchester and beyond. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(4):iv27–iv32.

Culliford DJ, Maskell J, Beard DJ, Murray DW, Price AJ, Arden NK. Temporal trends in hip and knee replacement in the United Kingdom: 1991 to 2006. *J Bone Joint Surg Br*. 2010; 92:130–5.

Dimitroulas, Theodoros et al. Biologic drugs as analgesics for the management of osteoarthritis. *Seminars In Arthritis And Rheumatism*, [s.l.], v. 46, n. 6, p.687-691, jun. 2017. Elsevier BV.

D.M. Friedman, M.E. Moore The efficacy of intra-articular steroids in osteoarthritis: a double-blind study *J Rheumatol*, 7 (1980), pp. 850–856.

Dahiya P, Kamal P. Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy. *N Am J Med Sci*. 2013; 5(5):309-15.

Durán N, Mattoso LHC, Morais PC. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. *Artliber 2006*; 1ª ed. São Paulo.

Egea, J. et al. Antioxidant, antiinflammatory and neuroprotective actions of chondroitin sulfate and proteoglycans. *Osteoarthritis And Cartilage*, [s.l.], v. 18, p.24-27, jun. 2010. Elsevier BV.

Friedman PM, Mafong EA, Kauvar AN, Geronemus RG. Safety data of injectable nonanimal stabilized hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. *Dermatol Surg*. 2002;28(6):491–494.

Fujisawa Y, Masuhara K, Shiomi S (1979) The effect of high tibial osteotomy on osteoarthritis of the knee. An arthroscopic study of 54 knee joints. *Orthop Clin North Am* 10:585–608.

- Goldring MB, Goldring SR (2007) Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213:626–634.
- Goldring MB. Are bone morphogenetic proteins effective inducers of cartilage repair? Ex vivo transduction of muscle-derived stem cells. *Arthritis Rheum* 2006;54:387–9.
- Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:625e35.
- Guettler JH, Demetropoulos CK, Yang KH, Jurist KA (2004) Osteochondral defects in the human knee: influence of defect size on cartilage rim stress and load redistribution to surrounding cartilage. *Am J Sports Med* 32:1451–1458.
- Iturriaga, V. et al. Effect of hyaluronic acid on the regulation of inflammatory mediators in osteoarthritis of the temporomandibular joint: a systematic review. *International Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery*, [s.l.], v. 46, n. 5, p.590-595, maio 2017.
- Hempfling H. Intra-articular hyaluronic acid after knee arthroscopy: a two-year study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2007;15(5):537–46.
- Henrotin YE, Bruckner P, Pujol J-PL. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:747e55.
- Herrero-Beaumont, Gabriel et al. Clinical settings in knee osteoarthritis: Pathophysiology guides treatment. *Maturitas*, [s.l.], v. 96, p.54-57, fev. 2017.
- Heybeli N, Doral MN, Atay OA, Leblebicioglu G, Uzumcugil A. Intra-articular sodium hyaluronate injections after arthroscopic debridement for osteoarthritis of the knee: a prospective, randomized, controlled study. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2008;42(4):221–7.
- Heijink, Andras et al. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, [s.l.], v. 20, n. 3, p.423-435, 16 dez. 2011. Springer Nature.
- Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M (2002) Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 18:730–734.
- Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860e7.
- Huang TL, Chang CC, Lee CH, Chen SC, Lai CH, Tsai CL. Intra-articular injections of sodium hyaluronate (Hyalgan®) in osteoarthritis of the knee. A randomized, controlled, double-blind, multicenter trial in the Asian population. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011;12:221–8.
- Humbert P, Mikosinki J, Benchikhi H, Allaert FA. Efficacy and safety of a gauze pad containing hyaluronic acid in treatment of leg ulcers of venous or mixed origin: a double-blind, randomised, controlled trial. *Int Wound J.* 2013;10(2):159-66.

Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier J-P, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the patho- physiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011;7: 33e42, <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>.

Kirkwood TB (1997) What is the relationship between osteoarthritis and ageing? *Baillieres Clin Rheumatol* 11:683–694.

L. Yang, S.G. Carlson, D. McBurney, W.E. Horton, Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 31156–31165.

Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain.

Lee, Hwiwon et al. Hyaluronate–Gold Nanoparticle/Tocilizumab Complex for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Acs Nano*, [s.l.], v. 8, n. 5, p.4790-4798, 14 abr. 2014. American Chemical Society (ACS).

Lepetsos, Panagiotis; Papavassiliou, Athanasios G.. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis Of Disease*, [s.l.], v. 1862, n. 4, p.576-591, abr. 2016. Elsevier BV.

Linden B (1977) Osteochondritis dissecans of the femoral condyles: a long-term follow-up study. *J Bone Joint Surg Am* 59:769–776.

Liu-Bryan R, Terkeltaub R. Emerging regulators of the inflam-

Loeser RF (2009) Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr Cartil* 17:971–979.

Liu, Shan-chi et al. Soya-cerebroside, an extract of *Cordyceps militaris*, suppresses monocyte migration and prevents cartilage degradation in inflammatory animal models. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, p.43205-43220, 22 fev. 2017. Springer Nature.

Loeser RF, Carlson CS, Del CM, Cole A (2002) Detection of nitrotyrosine in aging and osteoarthritic cartilage: Correlation of oxidative damage with the presence of interleukin-1beta and with chondrocyte resistance to insulin-like growth factor 1. *Arthritis Rheum* 46:2349–2357

Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoar-Maletius W, Messner K. The effect of partial meniscectomy on the long-term prognosis of knees with localized, severe chondral damage. A twelve- to fifteen-year followup. *Am J Sports Med.* 1996;24:258–262

Marchev, Andrey S. et al. Oxidative stress and chronic inflammation in osteoarthritis: can NRF2 counteract these partners in crime?. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 1401, n. 1, p.114-135, 29 jun. 2017. Wiley-Blackwell.

Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. NF- kappaB signaling:multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets.* 2010;11:599e613.

Melchiorri, C., Meliconi, R., Frizziero, L., Silvestri, T., Pulsatelli, L., Mazzetti, I.,. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998.

Mobasheri A, Matta C, Zakany R, Musumeci G. Chondrosenescence: definition, hallmarks and potential role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Maturitas.* 2015;80(3):237–244.

N. Keerthi, M. Chimutengwende-Gordon, A. Sanghani, W. Khan The potential of stem cell therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis .*Curr Stem Cell Res Ther,* 8 (2013), pp. 444–450

Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L, Coto G. Hyaluronic acid and wound healing. *J Pharm Pharm Sci.* 2015;18(1):53-60.

Pavelka K, Uebelhart D. Efficacy evaluation of highly purified intra-articular hyaluronic acid (Sinovial®) hylan G-F20 (Synvisc®) in the treatment of symptomatic knee osteoarthritis. A double-blind, controlled, randomized, parallel-group non-inferiority study. *Osteoarthritis Cartil.* 2011;19(11):1294–300.

Portal-Nóñez, Sergio et al. Oxidative stress, autophagy, epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology, [s.l.]*, v. 108, n. 8, p.1-10, maio 2016. Elsevier BV.

Pearson, Mark J.; Jones, Simon W.. Review: Long Noncoding RNAs in the Regulation of Inflammatory Pathways in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology, [s.l.]*, v. 68, n. 11, p.2575-2583, 27 out. 2016. Wiley-Blackwell.

Piscitelli P, Iolascon G, Di TG, et al. Socioeconomic burden of total joint arthroplasty for symptomatic hip and knee osteoarthritis in the Italian population: a 5-year analysis based on hospitalization records. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012; 64:1320–7.

R. Liu-Bryan, R. Terkeltaub, Emerging regulators of the inflammatory process in osteoarthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.*11 (2014) 35–44

Ratneswaran A, LeBlanc EA, Walser E, Welch I, Mort JS, Borradaile N, Beier F. Peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes the progression of posttraumatic osteoarthritis in a mouse model. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(2):454–464.

Robinson, William H. et al. Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology, [s.l.]*, v. 12, n. 10, p.580-592, 19 ago. 2016. Springer Nature.

Saito S, Furuya T, Kotake S. Therapeutic effects of hyaluronate injections in patients with chronic painful shoulder: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62(7):1009–1018.

Saito S, Kotake S. Is there evidence in support of the use of intra-articular hyaluronate in treating rheumatoid arthritis of the knee? A meta-analysis of the published literature. *Mod Rheumatol*. 2009;19(5):493–501.

Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat. Rev Rheumatol*. 2010;6(11):625-35

Shukla R et al. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment. A Microscopic Overview. *Langmuir*. 2005.

Scanzello, Carla R.. Chemokines and inflammation in osteoarthritis: Insights from patients and animal models. *Journal Of Orthopaedic Research*, [s.l.], v. 35, n. 4, p.735-739, 8 mar. 2017.

Symmons, D.; Mathers, C.; Pfleger, B. [Accessed 28 November 2011] Global burden of osteoarthritis in the year 2000. *Arthritis Rheum* 2012;64(6):1697e707.

Van Beek M, Jones L, Sheardown H. Hyaluronic acid containing hydrogels for the reduction of protein adsorption. *Biomaterials*. 2008;29(7):780-9.

Voigt J, Driver VR. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regen*. 2012;20(3):317–331.

Waddell DD, Bert JM. The use of hyaluronan after arthroscopic surgery of the knee. *Arthroscopy*. 2010;26(1):105–11

Westacott, C.I., and Sharif, M. 1996. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction? *Semin. Arthritis Rheum*. 25(4): 254–272.

Zeng Q, Yu Z, You J, Zhang Q. Efficacy and safety of Seprafilm for preventing postoperative abdominal adhesion: systematic review and meta-analysis. *World J Surg*. 2007;31(11):2125–2131.

Zhang, Ying; Pizzute, Tyler; PEI, Ming. Anti-Inflammatory Strategies in Cartilage Repair. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, [s.l.], v. 20, n. 6, p.655-668, dez. 2014. Mary Ann Liebert Inc.

Ziskoven, Christoph et al. Physiology and pathophysiology of nitrosative and oxidative stress in osteoarthritic joint destruction. *Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology*, [s.l.], v. 89, n. 7, p.455-466, jul. 2011. Canadian Science Publishing.

ANEXO



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



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** pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de **22/08/2017**.

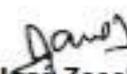
Título do projeto	Efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes do tratamento intra-articular com ácido hialurônico (AH) associado a nanopartículas de ouro (GNPs) em um modelo mecânico de osteoartrite em ratos wistar.
Project title	Anti-inflammatory and antioxidant effects of the intra-articular treatment with hyaluronic acid (AH) associated with gold nanoparticles (GNPs) in a mechanical model of osteoarthritis in wistar rats.
Número do protocolo Protocol number	005/2017-2 – Versão 2
Pesquisador principal Principal Investigator	Paulo Cesar Lock Silveira
Pesquisadores Researchers	Fernando Milanez Dias, Gustavo de Bem Silveira, Rubya Pereira Zacaron

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/09/2017 a 22/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	50
Idade/Peso	60 dias / 250 g
Gênero	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.

Criciúma, 22 de agosto de 2017.


Jairo José Zocche
Coordenador da CEUA