

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

SIMÃO KALEBE SILVA DE PAULA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTI-
APOPTÓTICA DO MIGLUSTATO NA OSTEOARTRITE**

Recife

2018

SIMÃO KALEBE SILVA DE PAULA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTI-
APOPTÓTICA DO MIGLUSTATO NA OSTEOARTRITE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre
em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Michelly Cristiny Pereira

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Ângela Luzia Branco Pinto Duarte

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Paula, Simão Kalebe Silva de

Avaliação *in vitro* da atividade imunomoduladora e antiapoptótica
do miglustato na osteoartrite / Simão Kalebe Silva de Paula - 2018.
138 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadoras: Michelly Cristiny Pereira

Ângela Luzia Branco Pinto Duarte

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Osteoartrite 2. Glicolipídeos 3. Inflamação

I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (Orientadora) II. Pereira, Michelly
Cristiny (Coorientadora) III. Duarte, Ângela Luzia Branco Pinto
(Coorientadora) IV. Título

616.7223

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-418

SIMÃO KALEBE SILVA DE PAULA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTI-
APOPTÓTICA DO MIGLUSTATO NA OSTEOARTRITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 30/07/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Roberto Weber Sobrinho
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço por tudo.

Aos meus pais, Hilquias e Edna, agradeço pelo amor incondicional e por me ensinarem o que é resiliência. À minha irmã, Sâmela, agradeço por sempre torcer pelo meu sucesso.

Aos meus avós, Samuel (*in memoriam*), Carmélio e Berenice (paternos) e Eloísa e Edvaldo (maternos), agradeço por serem minhas raízes. Aos meus tios e tias, primos e primas, agradeço pelo apoio.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maira Pitta, agradeço a oportunidade, a confiança, a paciência e o conhecimento transmitido.

À minha querida co-orientadora, Profa. Dra. Michelly, agradeço pela luz emanada, pelo carinho e pelo direcionamento.

À minha segunda co-orientadora, Profa. Dra. Ângela, agradeço a facilitação e o apreço.

Ao querido Prof. Moacyr, agradeço o acolhimento e a disposição em ajudar.

Aos professores Dr. Carlos Weber, Dra. Carolina Accioly e Dra. Maria Danielly, agradeço por aceitarem o convite e por refinarem o meu trabalho com seu conhecimento.

À Priscilla, minha mãe científica, agradeço a sabedoria, a experiência e as palavras de força. Obrigado por tudo. À Vanessa, nossa querida IC, agradeço pela ajuda, pelo carinho e pela determinação. A cada membro da família LINAT, agradeço por compartilhar a alegria e as tristezas, também.

A cada paciente e voluntário sadio que aceitou doar seu sangue para a realização deste trabalho. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigado. À equipe do Serviço de Reumatologia do HC, em especial à Dra. Cláudia, Dr. Sérgio, Dra. Andrea, Dra. Aline, Illana, Ana Raquel, Vanessa, Lays e Camila.

Aos meus amigos, agradeço por acreditarem em mim quando eu mesmo duvidei e por tornarem meus dias melhores.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para conclusão dessa etapa.

RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma doença reumática que atinge as articulações. Sua fisiopatologia é caracterizada pela degradação da cartilagem e apoptose dos condrócitos, através da ação de mediadores inflamatórios, como a IL-1 β , a IL-6 e o TNF- α . As citocinas IL-16, IL-18, IL-22 e IL-31 têm sido apontadas como possíveis participantes dos mecanismos da OA. A depleção dos glicolípídeos é uma rota de estudo da inibição da apoptose dos condrócitos e do favorecimento do reparo da cartilagem. O miglustato, utilizado no tratamento de doenças de deposição lisossomal, inibe a enzima responsável pela síntese dos glicolípídeos e também é capaz de modular a secreção de citocinas e de inibir a apoptose em células de Purkinje. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade imunomoduladora e anti-apoptótica do miglustato na osteoartrite. Foram recrutados 78 pacientes e 83 voluntários sadios. O soro foi obtido para dosagem de IL-16, IL-18, IL-22 e IL-31 por ELISA e o sangue total de 23 pacientes foi obtido para a cultura de PBMCs, posteriormente estimuladas com PMA/ionomicina e cultivadas por 24h com o miglustato nas concentrações de 10, 50 e 100 μ M. O sobrenadante das culturas foi coletado para dosagem de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , através de CBA em citômetro de fluxo. Para estabelecimento da cultura primária de condrócitos, ratos Wistar foram eutanasiados e submetidos a cirurgia de remoção da cartilagem. As amostras foram incubadas *overnight* em meio DMEM contendo 3 mg/ml de collagenase tipo II; as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com SBF a 10%; foi realizada uma imunofluorescência do receptor CD44 e do colágeno tipo II, a fim de confirmar o isolamento das células. Em seguida, foi feito um teste de citotoxicidade do miglustato nas concentrações citadas anteriormente. As células foram estimuladas com IL-1 β a 1 ng/ml e miglustato e, decorrido um período de 48 horas, foram fixadas para imunofluorescência da caspase 3 e da Bcl-2. Setenta e quatro pacientes eram do sexo feminino e apenas 4 do sexo masculino, sendo a média de idade entre eles igual a 59,1 anos; 51,2% dos pacientes tinham OA de joelho, 78,2% apresentavam dor e 70,5% mostravam sinais como crepitação e nódulos; a maioria (80,4%) possuía comorbidades e mais da metade (53,8%) estava sob tratamento farmacológico. Os níveis séricos da IL-18 se mostraram significativamente elevados ($p < 0,0001$) nos pacientes se comparados ao grupo controle, ao passo que a quantificação de IL-16, IL-22 e IL-31 foi maior nos voluntários sadios ($p < 0,0001$, $p = 0,0285$ e $p = 0,0005$, respectivamente). A concentração das citocinas no soro não mostrou correlação com os parâmetros clínicos avaliados. Adicionalmente, o miglustato não inibiu significativamente a produção das citocinas. Os condrócitos mostraram marcação positiva

para o CD44 e para o colágeno tipo II e se mantiveram viáveis no teste de citotoxicidade em todas as doses. O miglustato foi capaz de reduzir expressivamente a marcação da caspase 3 e aumentar a da Bcl-2, indicando a redução da atividade apoptótica dos condrócitos.

Palavras-chave: Osteoartrite. Glicolípídeos. Inflamação. Apoptose.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a rheumatic disease that affects the joints. Its physiopathology is characterized by cartilage degradation and chondrocyte's apoptosis, through mediation of inflammatory agents, like IL-1 β , IL-6 and TNF. Cytokines IL-16, IL-18, IL-22 and IL-31 have been suggested as part of OA mechanisms. Glycolipids depletion is a route of investigation for the inhibition of apoptosis in chondrocytes and improvement of cartilage repair. Miglustat, recommended for treating diseases of lysosomal deposition, inhibits the enzyme responsible for glycolipids synthesis and is able to modulate the secretion of cytokines and to decrease apoptosis in Purkinje cells. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* immunomodulatory and anti-apoptotic activity of miglustat in osteoarthritis. We recruited 78 patients and 83 healthy volunteers. Their sera were collected to IL-16, IL-18, IL-22 and IL-31 quantification by ELISA; 23 patients also donated their blood to PBMC culture, which were stimulated with PMA/ionomycin and cultivated with miglustat (10, 50 and 100 μ M) during 24h. Supernatants were collected for quantification of IL-1 β , IL-6 and TNF, through CBA in flow cytometer. For establishment of a chondrocyte primary culture, Wistar rats were sacrificed and undergone cartilage removal surgery. Samples were incubated in DMEM with 3 mg/ml of type II collagenase; cells were cultivated in DMEM supplemented with BFS 10%; to confirm the isolation, we perform an immunofluorescence of CD44 and type II collagen. After that, a cytotoxicity test was performed with miglustat in the concentrations previously described. Cells were stimulated with 1 ng/ml of IL-1 β and, after 48 hours, fixed for immunofluorescence of caspase 3 and Bcl-2. Seventy fours patients were female, whereas only 4 were male; mean age was 59,1 years; 51,2% patients had knee OA, 78,2% had joint pain and 70,5% showed signals like crepitus and nodules; most of them (80,4%) had comorbidities and over a half (53,8%) were under pharmacological treatment. Serum IL-18 was significantly increased in patients ($p < 0,0001$), whereas IL-16, IL-22 and IL-31 were higher in control group ($p < 0,0001$, $p = 0,0285$ e $p = 0,0005$, respectively). These concentrations did not show any correlation with clinical features. In addition, miglustat had no significant inhibition over cytokines. Chondrocytes showed a positive fluorescence for CD44 and type II collagen, being viable in cytotoxic test even with the highest concentration of miglustat. The compound expressively decreased caspase 3 staining and increased Bcl-2, suggesting a decrease of apoptotic activity in chondrocytes.

Keywords: Osteoarthritis. Glycolipids. Inflammation. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1A – Nódulos articulares ósseos.....	28
Figura 1B – Osteoartrite de joelho unilateral.....	28
Figura 2A – Joelho normal.....	31
Figura 2B – Joelho artrósico.....	31
Figura 3A – Representação da tripla hélice do colágeno.....	35
Figura 3B – Clivagem do procolágeno e formação das fibras colágenas, através de ligações cruzadas.....	35
Figura 4 – Componentes da matriz cartilaginosa.....	37
Figura 5 – Esquema histológico da cartilagem articular.....	37
Figura 6 – Esquema comparativo entre a articulação normal e a osteoartrite.....	39
Figura 7 – Esquema representativo da apoptose nos condrócitos via Ras-MAPK.....	42
Figura 8 – Sinalização da IL-1 β	44
Figura 9A – Estrutura química do miglustato (N-butil-deoxinojirimicina).....	55
Figura 9B – Estrutura química da deoxinojirimicina.....	55
Figura 10 – Detalhamento das etapas do estudo.....	57
Figura 11A – Níveis séricos das citocinas em pacientes e indivíduos saudáveis – IL-16.....	65
Figura 11B – Níveis séricos das citocinas em pacientes e indivíduos saudáveis – IL-18.....	65
Figura 11C – Níveis séricos das citocinas em pacientes e indivíduos saudáveis – IL-22.....	65
Figura 11D – Níveis séricos das citocinas em pacientes e indivíduos saudáveis – IL-33.....	65
Figura 12A – Quantificação das citocinas no sobrenadante de cultura de PBMCs – IL-1 β	67
Figura 12B – Quantificação das citocinas no sobrenadante de cultura de PBMCs – TNF.....	67
Figura 12C – Quantificação das citocinas no sobrenadante de cultura de PBMCs – IL-6.....	67
Figura 13A – Condrócitos primários – fragmento de cartilagem incubado em meio contendo colagenase tipo II (10x).....	68
Figura 13B – Condrócitos primários – condócitos em cultura (10x).....	68
Figura 13C – Condrócitos primários - condócitos não aderidos (40x).....	68

Figura 13D – Condrócitos aderidos (40x).....	68
Figura 14 – Imunofluorescência de CD44 e colágeno tipo II.....	69
Figura 15 – Imunofluorescência de caspase 3 e Bcl-2.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Citocinas estudadas recentemente e suas possíveis implicações na patogênese da osteoartrite.....	47
Tabela 2 – Modelos de estudo <i>in vitro</i> e suas principais vantagens e desvantagens.....	53
Tabela 3 – Idade e sexo da população de estudo.....	62
Tabela 4 – Características clínicas dos pacientes.....	63
Tabela 5 – Viabilidade dos condrócitos frente ao miglustato.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ADAMNTS	desintegrina e metaloproteinase com domínio de tromboespondrina
AINES	anti-inflamatório não esteroideal
AR	artrite reumatóide
AVE	acidente vascular encefálico
BSF-2	fator 2 estimulador de célula B
Ca ⁺	íon cálcio
CD44	<i>cluster</i> de diferenciação 44
CID 10	Código Internacional de Doenças (versão 10)
Cox-2	ciclooxigenase 2
CT	tomografia computadorizada
DDR-2	receptor 2 com domínio de discoidina
DMOAD	drogas modificadoras da osteoartrite
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FR	fator reumatóide
GDF5	fator 5 de diferenciação do crescimento
Gly	glicina
GWAS	estudos genômicos de ampla associação
HCQ	hidroxicloroquina
Hyp	hidroxiprolina
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
iNOS	óxido nítrico sintase induzida

IRM	imagem por ressonância magnética
MAPK	MAP quinase
MMP	metaloproteinase
Na ⁺⁺	íon sódio
NCOA3	coativador 3 de receptor nuclear
NF-κB	fator nuclear kappa B
NGF	fator de crescimento neuronal
OA	osteoartrite
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	óxido nítrico
PBMCs	células mononucleares de sangue periférico
PGE2	prostaglandina E2
PMA	acetato miristato de forbol
Pro	prolina
QVRS	Qualidade de Vida Relacionada à Saúde
RER	retículo endoplasmático rugoso
RMN	ressonância magnética nuclear
Sox9	fator de transcrição SRY-box9
T3	triiodotironina
T4	tetraiodotironina
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
TNF	fator de necrose tumoral
TNFCE	enzima conversora de TNF
TRAIL	ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
TRPV4	receptor vanilóide de potencial transitório 4
USG	ultrassonografia

VHS velocidade de hemossedimentação

WOMAC *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	JUSTIFICATIVA.....	19
1.2	OBJETIVOS.....	20
1.2.1	Objetivo geral.....	20
1.2.2	Objetivos específicos.....	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1	EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.2	ETIOLOGIA.....	21
2.2.1	Idade.....	22
2.2.2	Sexo.....	22
2.2.3	Genética.....	23
2.2.4	Obesidade.....	24
2.2.5	Tabagismo.....	24
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, COMORBIDADES E QUALIDADE DE VIDA.....	25
2.3.1	Sintomas.....	26
2.3.2	Sinais.....	26
2.3.3	Comorbidades e qualidade de vida.....	29
2.4	DIAGNÓSTICO E INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL.....	30
2.4.1	Exames de imagem.....	30
2.4.2	Ferramentas laboratoriais.....	32
2.4.3	Instrumentos de avaliação funcional.....	32
2.5	PATOGÊNESE.....	33
2.5.1	Cartilagem articular.....	33

2.5.2	Osso subcondral.....	37
2.5.3	Membrana sinovial.....	38
2.5.4	Degradação da cartilagem articular.....	38
2.5.5	Apoptose dos condrócitos.....	40
2.5.6	Citocinas.....	42
2.5.6.1	IL-1 β	43
2.5.6.2	Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	45
2.5.6.3	IL-6.....	45
2.4.6.4	Outras citocinas.....	46
2.6	TRATAMENTO.....	47
2.6.1	Abordagem não-farmacológica.....	48
2.6.2	Abordagem farmacológica.....	48
2.6.2.1	Ação rápida.....	48
2.6.2.1.1	<i>Analgésicos.....</i>	48
2.6.2.1.2	<i>AINES.....</i>	49
2.6.2.1.3	<i>Glicocorticoides.....</i>	49
2.6.2.2	Ação lenta.....	50
2.6.2.2.1	<i>Hidroxicloroquina.....</i>	50
2.6.2.2.2	<i>Diacereína.....</i>	50
2.6.2.2.3	<i>Óleo insaponificável de abacate e soja (ASU).....</i>	50
2.6.2.2.4	<i>Glicosamina e condroitina.....</i>	51
2.6.2.2.5	<i>Ácido hialurônico.....</i>	51
2.6.3	Intervenção cirúrgica.....	51
2.6.3.1	Artroscopia.....	51

2.6.3.2	Artroplastia total.....	52
2.7	REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS E MODELOS DE ESTUDO	
	<i>IN VITRO</i>	52
2.7.1	Modelos de estudo <i>in vitro</i>	52
2.8	MIGLUSTATO.....	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	57
3.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	57
3.3	RECRUTAMENTO DE PACIENTES.....	57
3.4	MIGLUSTATO.....	58
3.5	COLETA DE SANGUE TOTAL E OBTENÇÃO DO SORO.....	58
3.6	CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCS).....	58
3.7	<i>ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</i> (ELISA).....	58
3.8	<i>CYTOMETRIC BEADS ARRAY</i> (CBA).....	59
3.9	ISOLAMENTO E CULTURA DE CONDRÓCITOS.....	59
3.10	ENSAIO DE CITOXICIDADE (MTT).....	59
3.11	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	60
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4	RESULTADOS	62
4.1	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES.....	62
4.2	NÍVEIS SÉRICOS DE IL-16, IL-18, IL-22 E IL-31.....	65
4.3	CORRELAÇÃO COM OS PARÂMETROS CLÍNICOS.....	66
4.4	EFEITO DO MIGLUSTATO NA PRODUÇÃO DE IL-1B, IL-6 E TNF.....	66
4.5	ISOLAMENTO E CULTURA DE CONDRÓCITOS.....	68

4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS CONDRÓCITOS.....	69
4.7	ENSAIO DE CITOXICIDADE.....	70
4.8	IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CASPASE 3 E BCL-2.....	70
5	DISCUSSÃO.....	72
6	CONCLUSÃO.....	75
7	PERSPECTIVAS.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS.....	108
	APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS IMPOSSIBILITADOS DE ASSINAR (RESOLUÇÃO 466/12).....	112
	APÊNDICE C – FICHA OSTEOARTRITE.....	116
	APÊNDICE D – FICHA CLÍNICA EVOLUTIVA.....	118
	APÊNDICE E – QUANTIFICAÇÃO DE IFN-γ NAS CULTURAS DE PBMCS.....	120
	APÊNDICE F – ARTIGO A SER SUBMETIDO COMO <i>BRIEF REPORT</i>.....	123
	ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM SERES HUMANOS.....	137
	ANEXO 2 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA).....	138

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA), popularmente conhecida como artrose, é uma doença complexa e multifatorial, que afeta as articulações interfalângicas, os quadris, a coluna vertebral e o joelho (PEDDADA et al, 2015). É a forma mais comum de doença osteoarticular e está intimamente associada à incapacidade, perda da qualidade de vida e geração de altos custos ao sistema de saúde (REZENDE et al., 2013). A doença é mais comum em mulheres, especialmente a partir dos 50 anos de idade (LITWIC, 2013).

Na fisiopatologia da OA, os condrócitos, por *stress* inflamatório ou mecânico, passam a produzir mediadores inflamatórios e enzimas degradativas (SHERWOOD et al., 2014). Com a matriz cartilaginosa degenerada, as células perdem a adesão necessária para sobreviverem e morrem por apoptose (HWANG et al., 2015).

Entre os mediadores que integram a patogênese da OA, destaca-se a IL-1 β , que induz a degradação da matriz cartilaginosa pelo aumento da expressão da metaloproteinase 13 (MMP-13) e aumenta a síntese de prostaglandina E2 (PGE2), colaborando para o estabelecimento de um ambiente inflamatório na articulação (BLASIOLI & KAPLAN, 2014). Outras citocinas já bem descritas e apontadas como participantes do mecanismo inflamatório da doença incluem o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e a IL-6 (MILLER et al., 2014; WOJDASIEWICZ et al., 2014). Mais recentemente, muitos grupos de pesquisa em doenças inflamatórias voltaram seus esforços para o estudo de algumas citocinas que exibiram grande potencial como biomarcadores de doenças reumáticas: as IL-16, IL-18, IL-22 e IL-31, que são produzidas por linfócitos T CD4⁺ em condições patológicas (WANG et al., 2014; MUROTA et al., 2015; PAINE & RITCHLIN, 2016; ROSINE et al., 2018).

O tratamento da OA é baseado no combate aos sintomas e na reversão da destruição da cartilagem, através da associação entre componentes farmacológicos e não-farmacológicos (YU & HUNTER, 2015). Os componentes farmacológicos incluem analgésicos, anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), glicocorticoides e drogas modificadoras da doença (DMOADs), representadas pelo sulfato de condroitina, ácido hialurônico, glicosamina, entre outras (DAVIES et al., 2013).

A terapia com AINES e glicocorticoides, apesar de aliviar a dor, tem efeito limitado e traz sérios efeitos secundários para a população idosa (MCCARBERG, 2013; BOBACZ, 2013). As DMOADs têm farmacocinética incerta, apresentando uma alta taxa de falha

terapêutica (KARSDAL et al., 2016). Tais evidências ressaltam a necessidade da busca por estratégias terapêuticas de eficácia comprovada e que não tragam tantos efeitos colaterais.

Uma estratégia que pode agilizar a concepção de novas abordagens terapêuticas é o reposicionamento de fármacos, que consiste na utilização de fármacos já comercializados para tratamento de outras doenças (FONSECA, 2013). Os estudos de reposicionamento na OA ainda são escassos (GRAMMER & LIPSKY, 2017).

Recentemente, um estudo publicado por Matsuoka e outros (2017) mostrou que a depleção de glicolipídeos em camundongos inibe a apoptose dos condrócitos e estimula o reparo da cartilagem articular. O miglustato (Zavesca[®]), que é um aminoaçúcar utilizado em distúrbios de deposição de glicolipídeos (GRABOWSKI, 2008), age inibindo a ceramida glicosil-transferase, ou seja, impedindo que esses glicoconjugados sejam formados (PARENTI et al., 2015). Além disso, o fármaco é capaz de inibir a produção de citocinas em células do epitélio brônquico (DECHECCHI et al., 2011). Diante do que foi exposto, o presente estudo tem por objetivo investigar o potencial *in vitro* do miglustato como alternativa terapêutica para a OA.

1.1 JUSTIFICATIVA

A osteoartrite é uma doença reumática degenerativa, que traz consigo um importante comprometimento da qualidade de vida do paciente e disfunção do sistema osteoarticular. As terapias tradicionais são eficazes no alívio da dor, mas pouco melhoram o status funcional dos pacientes. Os AINES, além de conferirem um efeito efêmero, trazem consigo uma gama de efeitos colaterais que acabam por impedir a melhora da funcionalidade nos idosos (BOBACZ *et al.*, 2013). As drogas modificadoras, por sua vez, exibem um longo histórico de falhas terapêuticas e controvérsia clínica, já que a sua farmacocinética é complexa e seus mecanismos de ação incertos (KARSDAL et al., 2016). Resta aos pacientes refratários a intervenção cirúrgica, que, apesar de eficaz, é altamente invasiva e nem sempre de fácil acesso. Assim, torna-se fundamental a busca por abordagens terapêuticas de eficácia comprovada, com mais efeitos prolongados e menos danos colaterais.

Recentemente, estudos demonstraram que a depleção de glicolipídios inibe a apoptose dos condrócitos e estimula o reparo da cartilagem. O miglustato, que inibe a síntese de glicolipídios, também se mostrou capaz de inibir a produção de citocinas em alguns tipos celulares. O presente estudo tem por objetivo investigar o potencial *in vitro* do miglustato como alternativa terapêutica para a osteoartrite.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Investigação *in vitro* da atividade imunomoduladora e anti-apoptótica do miglustato na osteoartrite;

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os aspectos clínicos dos pacientes portadores de osteoartrite;
- Avaliar os níveis séricos de IL-16, IL-18, IL-22 e IL-31 em pacientes portadores de osteoartrite;
- Avaliar o efeito do miglustato na secreção de IL-1 β , IL-6 e TNF no sobrenadante de cultura de PBMCs de pacientes portadores de osteoartrite;
- Padronizar uma cultura primária de condrócitos derivados de ratos Wistar;
- Avaliar a toxicidade do miglustato em condrócitos derivados de ratos Wistar;
- Avaliar o efeito do miglustato na expressão do marcador pró-apoptótico caspase 3 e do anti-apoptótico Bcl2 em condrócitos primário;

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

A osteoartrite (OA) é considerada a forma mais comum de doença osteoarticular, atingindo pessoas ao redor do mundo todo (AMOAKO & PUJALTI, 2014). Nos EUA, mais de 10% da população adulta é acometida pela doença (MURPHY & HELMICK, 2012). No Brasil, um estudo publicado por Senna e colaboradores (2004) indica que a prevalência da OA é de 4,14%.

A transição demográfica sofrida por grande parte dos países ocidentais, com aumento da expectativa de vida e envelhecimento da população, teve um papel importante no aumento dos indicadores da OA (CHAIMOWICZ, 2013), já que a idade é um dos principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença. Um estudo retrospectivo realizado por Wallace e colaboradores (2017) na Universidade de Harvard mostrou que a prevalência da doença aumentou o dobro desde a época da Revolução Industrial. No Brasil, estima-se que a população com mais de 60 anos corresponderá a 64 milhões em 2050 (IBGE, 2013), aumentando o número de pessoas sob risco de desenvolver osteoartrite.

2.2 ETIOLOGIA

A OA é uma doença articular crônica e degenerativa, caracterizada, sobretudo, pela degradação da cartilagem articular e esclerose do osso subcondral (MOBASHERI, 2012). As articulações mais acometidas são as dos quadris, mãos, joelhos e coluna (PEDDADA et al., 2015). É uma condição complexa, cujo mecanismo de desenvolvimento resulta da combinação de componentes mecânicos, estruturais e biológicos (ANDRIANAKOS, 2006). Além disso, tem um caráter multifatorial, podendo agravar-se a partir de uma série de fatores de risco, como obesidade, idade, sexo, genética e tabagismo (LITWIC, 2013).

Etiologicamente, a osteoartrite é classificada como primária ou secundária. A primária, também chamada de “idiopática”, decorre de processos degenerativos da cartilagem relacionados ao avanço da idade ou à herança genética (HOAGLUND, 2013). A secundária pode ser resultante de distúrbios mecânicos, como desvios de eixo articular ou traumas (ex: lesão meniscal), (TREVISANI & FIDELIX, 2009) e de distúrbios metabólicos e processos inflamatórios (WANG et al., 2015).

2.2.1 Idade

A idade é um dos fatores de risco mais influentes na artrose (FELSON et al., 2000). Não se sabe, porém, os mecanismos exatos relacionados ao aumento da prevalência e incidência da doença na população idosa. Provavelmente, esses mecanismos representam uma combinação de alterações que incluem a diminuição da capacidade de adaptação da cartilagem articular à injúria mecânica, alterações bioquímicas e celulares, como a senescência, e o aumento do *turnover* ósseo (JOHNSON & HUNTER, 2014).

Estudos recentes demonstraram que três alterações importantes ocorrem a nível celular em condrócitos senescentes: a) disfunção mitocondrial, com aumento significativo da produção de espécies reativas de oxigênio (KIM et al., 2010); b) alteração na sinalização de fatores de crescimento, sendo os condrócitos senescentes menos responsivos ao estímulo por TGF- β (BLANEY et al., 2009) e c) diminuição da capacidade de autofagia, que representa um mecanismo importante de proteção celular contra o estresse e uma fonte alternativa de obtenção de energia (CARAMES et al., 2010)

Vale ressaltar que essas alterações, por si só, não explicam o que ocorre em outros tecidos acometidos pela doença. O envelhecimento da cartilagem articular ocorre num contexto sistêmico, paralelamente ao envelhecimento de músculos, ossos, tecido adiposo e sistema nervoso (LOESER, 2011).

2.2.2 Sexo

A literatura é consistente no que diz respeito ao maior acometimento das mulheres em relação aos homens, principalmente nas mãos, quadris e joelhos (LITWIC et al., 2013). Muito suspeitava-se do “desmascaramento” da dor pela diminuição dos níveis de estrógeno na menopausa, mas estudos clínicos e observacionais com terapia hormonal não encontraram resultados que sustentassem tal afirmação (HANNA et al., 2004; NEVITT et al., 2001; CIRILLO et al., 2006). Curiosamente, uma revisão realizada por Maleki-Fischbach e Jordan (2010) com achados de ressonância magnética nuclear (RMN), demonstrou diferenças entre a espessura da cartilagem articular de homens e mulheres; nessas, a cartilagem mostrou-se naturalmente menos espessa.

2.2.3 Genética

A OA, sob um ponto de vista molecular, parece ser fortemente influenciada por fatores genéticos. Diversos genes desempenham papéis fundamentais na iniciação e progressão da doença, seja ela primária ou pós-traumática (SANDELL, 2012).

Alguns estudos de associação genômica ampla (GWAS) encontraram vários alelos relacionados à OA, embora muitos exerçam risco moderado ou baixo no desenvolvimento da doença. Entre eles está o polimorfismo rs143383 no gene do fator 5 de diferenciação de crescimento (GDF5), cuja função é promover o crescimento e diferenciação de diversos tecidos, incluindo a cartilagem (MIYAMOTO et al., 2007; VALDES et al., 2011). Outro gene cujo polimorfismo funcional parece estar relacionado ao risco de desenvolvimento de OA é o DIO2, que codifica a enzima iodotironina deionidase 2, que está relacionada à conversão de tetraiodotironina (T4) em triiodotironina (T3) (BOS et al., 2008).

Uma meta-análise realizada por Evangelou e colaboradores (2013), evidenciou um *locus* de susceptibilidade no cromossomo 20 (20q13), identificado como rs6094710. Essa região localiza-se próxima ao gene do coativador 3 de receptor nuclear (NCOA3), que está envolvida na ativação de receptores nucleares de retinóides, esteroides, hormônios da tireoide e vitamina D (XU et al., 2000). A meta-análise mostrou que esse polimorfismo confere aos indivíduos 30% de chances a mais de desenvolver OA de quadril.

No tocante ao papel da genética na etiologia das doenças, outros fatores, que não os polimorfismos, tornaram-se indispensáveis na busca por respostas. Os microRNAs, por exemplo, são pequenas moléculas de RNA não-codificante, que regulam a expressão de diversos genes, principalmente por silenciamento pós-transcricional (CHEN et al., 2016). Estudos com *microarray* de cartilagem artrósica encontraram nove microRNAs suprarregulados (miR-16, miR-22, miR-23b, miR-30b, miR-103, miR-223, miR-377, miR-483 e miR-509) e sete infrarregulados (miR-25, miR-26^a, miR-29^a, miR-140, miR-210, miR-337 e miR-373), quando comparados à cartilagem saudável. O miR-140, por exemplo, tem um papel crítico na OA, pois é expresso exclusivamente por condrócitos e desempenha uma função fundamental na condrogênese (MIYAKI et al., 2009).

Mecanismos epigenéticos também podem estar envolvidos na OA, já que vários genes mostraram padrão alterado de metilação do DNA (TSEZOU, 2014). A redução da metilação de ilhas CpG foi associada ao aumento da expressão das metaloproteinases 3, 9, 13 e do gene

ADAMTS-4 em estágios avançados da doença (ROACH et al., 2005; CHEUNG et al., 2009; DA SILVA et al., 2009)

2.2.4 Obesidade

A obesidade se tornou um problema global de grande causa de morbimortalidade. Sua prevalência duplicou desde os anos 80, com cerca de 475 milhões de adultos obesos atualmente e 1 bilhão com sobrepeso (BLIDDAL et al., 2014)

A rede que compreende os mecanismos de desenvolvimento da OA através da obesidade é complexa, e o entendimento desse sistema demandou muitos anos de estudo. Inicialmente, achava-se que o *link* entre a obesidade e a osteoartrite era puramente biomecânico (MESSIER et al., 2005; AABOE et al., 2011), mas hoje sabe-se que as alterações metabólicas desencadeadas pelo excesso de tecido adiposo favorecem a liberação de diversas citocinas inflamatórias (LIVSHITS et al., 2009). Assim, anormalidades na marcha e outros problemas biomecânicos representam apenas uma parcela da contribuição da obesidade para a artrose.

De modo simplificado, o aumento das forças compressivas na cartilagem, o excesso de tecido adiposo acumulado e a infiltração gordurosa no músculo levam o organismo a uma condição denominada de “hiperleptinemia”, onde os níveis aumentados de leptina causam a resistência à insulina, diminuição dos níveis de adiponectina e desenvolvimento do estado subinflamatório crônico da obesidade (LEAL & MAFRA, 2013). Esse estado é marcado pela secreção constante de citocinas como o TNF e as IL-1 β , IL-6 e IL-8 (VINCENT et al., 2012), que, como será discutido mais à frente, são de suma importância para a patogênese da osteoartrite.

Um estudo realizado por Pacca e colaboradores (2018) mostrou a OA prevalece em cerca de 60% de pacientes obesos mórbidos, indicados à cirurgia bariátrica. Vale salientar que a obesidade também interfere diretamente no panorama de tratamento dos pacientes, já que os indivíduos obesos tendem a desenvolver quadros generalizados, mais erosivos e dependentes de intervenção cirúrgica (WENDELBOE et al., 2003).

2.2.5 Tabagismo

A relação entre o hábito de fumar e o maior risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias é bem descrito na literatura. Ao redor do mundo, muitas evidências clínicas e epidemiológicas têm associado o uso do tabaco à causa de morte por câncer e doenças cardiorrespiratórias e inflamatórias (JOHANNSEN et al., 2014). À exemplo de evidências

clínicas, temos o aumento de biomarcadores inflamatórios em pacientes fumantes (MCEVOY et al., 2015).

Uma meta-análise que investigou a relação entre o hábito de fumar e a osteoartrite de joelho, quadril, mão e coluna encontrou uma correlação negativa, ou seja, de “proteção” entre pacientes fumantes (HUI et al., 2011). Vários grupos de pesquisa imediatamente avaliaram detalhadamente a qualidade do trabalho e observaram que o mesmo encontrou significância apenas nos estudos de caso-controle, que eram maioria, mas não nos de coorte (GILL & HILL, 2013; FELSON & ZHANG, 2015). Assim, os autores da meta-análise se propuseram a publicar um artigo original (PEARCE et al., 2013) ressaltando que não há evidências do efeito protetor do tabagismo sobre a osteoartrite.

Leung e colaboradores (2014), no entanto, encontraram as mesmas evidências numa meta-análise com a população chinesa. Tais achados foram corroborados por estudos *in vitro* que demonstraram o poder da nicotina presente no cigarro em aumentar a síntese de colágeno tipo 2 em condrócitos isolados de côndilos femorais normais (GULLAHORN et al., 2005) e aumentar a proliferação de condrócitos isolados de cartilagem artrósica (YING et al., 2012).

Apesar de tais resultados refutarem o que se espera do tabagismo, é importante salientar que o hábito de fumar predispõe, inicia e agrava outras diversas condições patológicas. Felizmente, existem evidências suficientes para reforçar o risco de desenvolvimento e progressão da doença pelo tabaco e provar que este pode causar a) redução da espessura da cartilagem (AMIN et al., 2007; DAVIES-TUCK et al., 2009), b) a ativação de fatores genéticos predisponentes (DING et al., 2008), c) aumentar marcadores de inflamação (BERMUDEZ et al., 2002; BAZZANO et al., 2003), d) aumentar a resistência à insulina (CHIOLERO et al., 2008) e estreitar a relação da síndrome metabólica com a OA (HUSSAIN et al., 2014).

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, COMORBIDADES E QUALIDADE DE VIDA

A osteoartrite é classificada pelo Código Internacional de Doenças (CID 10) como um grupo de doenças (“artroses”), que vai de M15 à M19 (DATASUS, 2008). Com diversas apresentações clínicas que variam de indivíduo para indivíduo, acredita-se que, dentro das mesmas subclassificações da doença, existam fenótipos diferentes (LANE et al., 2011).

2.3.1 Sintomas

O desenvolvimento da OA é lento e insidioso, e os primeiros sintomas podem surgir um longo tempo após o início das alterações (HINTERHOLZ & MUHLEN, 2003). Os principais sintomas são dor, rigidez matinal e limitação do movimento (HASAN & SCHUCKETT, 2010).

Geralmente, a dor é desencadeada pelo uso da articulação e aliviada pelo repouso – padrão que difere de outras doenças inflamatórias articulares (onde a dor piora com o repouso e melhora com o movimento), como a artrite reumatoide (AR), ajudando no diagnóstico diferencial (MOTA, 2010). O processo algico na osteoartrite pode variar de acordo com a fase da doença, podendo persistir mesmo no repouso (passando de um caráter mecânico para um caráter inflamatório) e acordar o paciente à noite, levando ao surgimento de distúrbios do sono (TREVISANI & FIDELIX, 2009).

A rigidez articular consiste no desconforto e dificuldade que o paciente sente para iniciar o movimento após um período de inatividade, geralmente após o despertar matinal (CARDOSO et al., 2005). Diferentemente da artrite reumatoide, a rigidez na OA dura menos que 30 minutos e é limitada à articulação (HUNTER & FELSON, 2006).

A progressão da doença traz a limitação do movimento associada à incongruência entre as superfícies articulares, espasmos musculares, contração da cápsula articular e bloqueio mecânico devido à osteófitos ou corpos livres intra-articulares (NEOGI, 2013). Vale salientar que cada sítio anatômico traz manifestações específicas da osteoartrite, como a dificuldade de descer degraus na OA de joelho, dificuldade de deambulação associada à OA de quadris e incapacidade de executar tarefas que exijam destreza, como em estágios avançados do acometimento da primeira carpometacarpal e trapézio-escafoide (base do polegar) (MOTA, 2010)

2.3.2 Sinais

Os principais sinais clínicos da artrose são o aumento do volume articular, crepitação ao movimento, sensibilidade à palpação da linha articular, deformidades, limitação à movimentação ativa/passiva e atrofia muscular (ABHISHEK & DOHERTY, 2013).

O aumento do volume articular associado ao edema pode ser evidenciado principalmente na OA de joelho, ocorrendo tanto pelo aumento na quantidade de fluido sinovial (derrame), quanto pelo surgimento de osteófitos marginais (MOTA, 2010). O edema

inflamatório não é comum, mas, quando presente, é localizado, discreto e com pouco calor, sendo esse um diagnóstico diferencial para gota e artrite séptica (ALLEN et al., 2009).

Crepitação é definida como um rangido audível e/ou uma vibração palpável no joelho, detectável pela mão do avaliador posicionada sobre a patela do paciente (SCHIPHOF et al., 2014). O sinal decorre da fricção entre as superfícies articulares oponentes e da cartilagem danificada, podendo estar presente em 90% dos casos de OA de joelho (ALTMAN et al., 1986). Além disso, a presença de crepitação é utilizada como critério diagnóstico por diversos colégios de reumatologia, incluindo o norte-americano e o europeu (ZHANG et al., 2010).

Queixas sobre dor ou sensibilidade a nível de linha articular podem resultar da concentração de forças nas articulações tibiofemoral e patelofemoral (THOMPSON et al., 2009). Quando essas queixas se tornam frequentes, até mesmo durante a execução de atividades diárias mais simples, é muito provável que haja dano articular extenso, com exposição do osso subcondral (ABHISHEK & DOHERTY, 2013). O exame é feito através da palpação das linhas articulares medial e lateral do joelho, enquanto esse é flexionado (WADEY et al., 2007). A sensibilidade de linha articular também é utilizada com alto valor preditivo para avaliação de lesões meniscais, apesar da baixa especificidade (GUPTA et al., 2016).

Outro sinal comum é a redução da amplitude do movimento articular, tanto na mobilização passiva quanto na ativa (MOTA, 2010). Essa alteração decorre da formação de osteófitos, perda cartilaginosa e espasmo ou contratura da musculatura periarticular (L'HERMETTE et al., 2006). Os músculos periarticulares são de extrema importância para a geração de uma força estabilizadora, que garantirá a completa execução do movimento articular (BENELL & HINMAN, 2011).

Em estágios avançados da artrose podem ocorrer deformidades nos membros, que perdem o alinhamento habitual e passam a apresentar alta instabilidade articular (MOTA, 2010). Nas mãos, o aparecimento de nódulos articulares ósseos, resultantes da subluxação óssea e crescimento de osteófitos marginais, representa uma condição associada ao gênero (afeta dez vezes mais mulheres do que homens) e à predisposição genética (KELLGREN & MOORE, 1952). Quando localizadas nas interfalângicas distais, as estruturas são chamadas de “nódulos de Heberden”; quando localizados nas proximais, recebem o nome de “nódulos de Bouchard” (**figura 1A**). Além do crescimento dos nódulos, ocorre desvio palmar e lateral das falanges distais (ABHISHEK & DOHERTY, 2013).

Figura 1 – A) Nódulos articulares ósseos. O aparecimento dos nódulos é mais comum em mulheres, principalmente na pós-menopausa. Na imagem é possível observar os nódulos de Heberden (distais) e os nódulos de Bouchard (proximais). **B) Osteoartrite de joelho unilateral.** Observa-se o aumento do volume articular causado por edema e o arqueamento do joelho esquerdo, afastando-o da linha medial (geno varo).



Fonte: adaptado de American College of Rheumatology Slide Collection (1972-2017)

Fonte: ABHISHEK et al., 2011

A artrose de joelho, também chamada de “gonartrose”, é a maior causa de incapacidade de membros inferiores entre idosos (GINCKEL et al., 2016). O acometimento geralmente é bilateral, mas há casos em que os sintomas são mais pronunciados unilateralmente (DUNCAN et al., 2006). De acordo com TANAMAS e outros (2009), a OA de joelho é mais comum em homens (principalmente os mais jovens) por estar associada a lesões prévias sofridas em atividades relacionadas ao trabalho ou à prática de esportes.

Os achados clínicos incluem sensibilidade da linha articular, dificuldade de flexão, crepitação, edema e desgaste do quadríceps. Nos quadros mais severos, ocorrem o inchaço do joelho (**figura 1B**) e deformidades denominadas de “geno varo” e “geno valgo”, que representam o afastamento dos joelhos em relação à linha média do corpo (“pernas de alicate”) e a aproximação desses (“pernas em X”), respectivamente (SOUZA et al., 2014). Vale salientar que os joelhos varo e valgo podem representar a causa ou a consequência da osteoartrite de joelho, mas também são variações anatômicas que ocorrem fisiologicamente, principalmente em crianças (ZAYER, 2000).

A articulação do quadril é a segunda mais afetada pela artrose, perdendo apenas para os joelhos (ARTHRITIS RESEARCH UK, 2014). Pacientes com osteoartrite de quadril (ou “coxartrose”) frequentemente se queixam de dor na região inguinal, que, no primeiro

momento é intermitente, relacionada à atividade (ao caminhar ou subir escadas, principalmente) e piora no fim do dia (ARESTI et al., 2016). Com o progredir da doença, a dor permanece no repouso. Nos casos mais severos, pode haver o comprometimento da mobilidade e da independência do indivíduo. Os achados clínicos mais comuns incluem sensibilidade nos quadris e dificuldade/dor na rotação interna passiva (BIERMA-ZEINSTRAL et al., 2002).

A princípio, qualquer articulação sinovial do sistema musculoesquelético pode ser afetada pela osteoartrite (ABHISHEK & DOHERTY, 2013). Assim, na coluna vertebral, as estruturas acometidas são as chamadas “articulações zigoapofisárias” ou “facetária” – únicas sinoviais verdadeiras da coluna –, que formam o arco posterior e conectam cada vértebra à sua adjacente (GELLHORN et al., 2013). Por essa razão, esse subtipo é frequentemente chamado de “artrose facetária” (MARASCHIN et al., 2010). Geralmente as vértebras afetadas são as cervicais e lombares baixas (KALICHMAN & HUNTER, 2007).

O quadro cursa com dor lombar e/ou de pescoço, inicialmente localizadas, podendo irradiar-se uni ou bilateralmente para membros inferiores (VAN EERD et al., 2010). É uma condição que frequentemente está associada à degeneração do disco intervertebral e ao meio biopsicossocial, já que fatores neurológicos, como o estresse, são listados como agravantes da dor (GELLHORN et al., 2013).

2.3.3 Comorbidades e qualidade de vida

A osteoartrite, além de ser uma das principais causas de incapacidade e perda da qualidade de vida, traz associada a si diversas comorbidades (REZENDE et al., 2013). Acredita-se, inclusive, que a incapacidade presente em quase 80% dos pacientes esteja relacionada diretamente à essas comorbidades e não à doença em si (DEKKER *et al.*, 2009; GARVER et al., 2014).

Já que a idade é o principal fator etiológico da artrose, a maioria das comorbidades está relacionada ao avanço da idade (SURI et al., 2012). Entre elas podemos citar doença cardiovascular, acidente vascular encefálico (AVE), diabetes mellitus, obesidade, comprometimento cognitivo, transtorno de ansiedade e depressão (TUOMINEN et al., 2007). Essas duas últimas, somadas a uma série de outros fatores neurofisiológicos e cognitivos, são cruciais na mediação dos efeitos deletérios da dor, já que pacientes acometidos por condições similares podem desenvolver processos algícos diferentes (ZAMBON et al., 2016).

A qualidade de vida relacionada à saúde (QVRS) abarca o conceito geral de qualidade de vida, mas leva em consideração também fatores como dor, capacidade funcional e bem-estar emocional (PIETRO & BADIA, 2001). A artrose diminui drasticamente a QVRS ao produzir uma limitação funcional, que, se progredir, pode se tornar permanente e alterar a prática de atividades cotidianas do paciente (BERNARD-PINEDA et al., 2014). A assimilação da doença frequentemente causa impacto psicológico, funcionando como gatilho para o desenvolvimento das, anteriormente citadas, ansiedade e depressão (FERREIRA et al., 2015).

2.4 DIAGNÓSTICO E INSTRUMENTOS DE AVALIAÇÃO FUNCIONAL

Antes de adentrarmos nos critérios diagnósticos da OA, é preciso ressaltar que existe uma grande variabilidade fenotípica, ou seja, o tempo de doença, a sua taxa de progressão e o padrão de comprometimento da articulação são diferentes entre os pacientes e até mesmo entre as articulações do mesmo indivíduo (ABISHEK & DOHERTY, 2013).

O diagnóstico da OA é primariamente clínico e, apesar do grande suporte, os achados radiográficos podem não refletir o real estado do paciente, já que indivíduos com um quadro clínico marcante podem não exibir alterações radiográficas (CHONG et al., 2013).

O *American College of Rheumatology* (ACR) e a *European League Against Rheumatism* (EULAR) subdividem as diretrizes diagnósticas de acordo com a articulação acometida, mas há critérios básicos que devem ser observados no exame clínico:

1. Dor persistente em uma ou mais articulações;
2. Idade ≥ 50 anos;
3. Rigidez matinal < 30 minutos
4. Redução da amplitude do movimento

Para a OA de joelhos, por exemplo, é verificada também a existência de crepitação e sensibilidade na linha articular; na coxartrose, a aplicação de manobras provocativas, como avaliação da rotação interna do quadril ($< 15^\circ$) é uma prática comum.

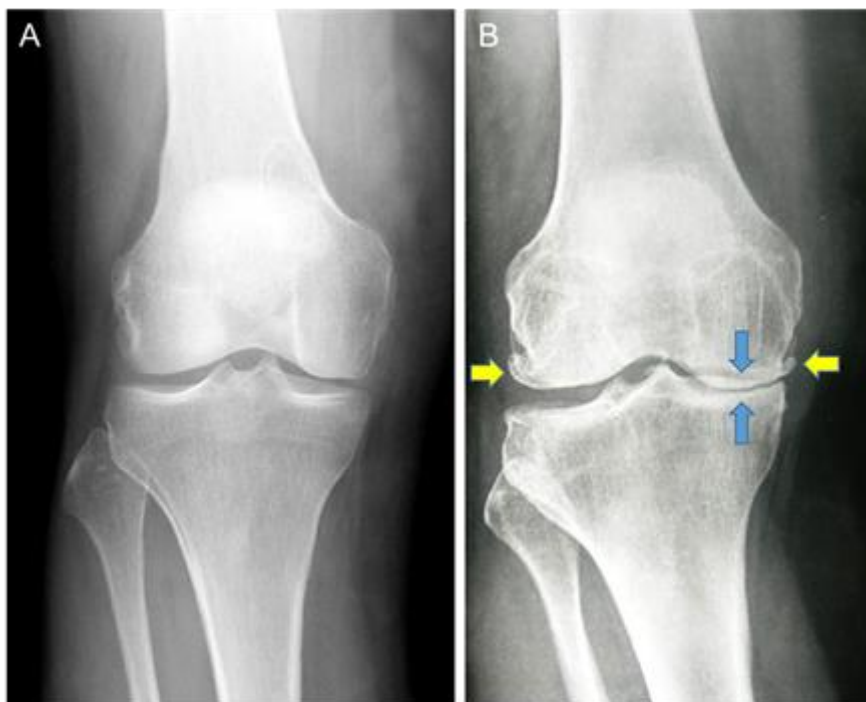
2.4.1 Exames de imagem

Atualmente, diversas técnicas de imagem são empregadas no auxílio do diagnóstico da OA, mas a radiografia segue sendo a mais simples, rápida e acessível (CHEN et al., 2008). O método permite a visualização de características importantes como a formação de osteófitos, a

esclerose subcondral, a formação de cistos subcondrais, e a redução do espaço intrarticular (BRAUN & GOLD, 2012). Essa última, em particular, é considerada o principal indicativo de perda da cartilagem.

A cartilagem é radiolúcida, assim, uma radiografia normal mostra um espaço escuro entre o fêmur e a tíbia; então o que parece um espaço vazio, na verdade, deve ser interpretado como uma cartilagem íntegra (SHAGAM, 2011). Na OA, esse espaço aparece reduzido, indicando a diminuição da espessura cartilaginosa e avanço do tecido ósseo, como mostrado na **figura 2**.

Figura 2 – Radiografia de joelho: diferença entre articulação normal e articulação artrósica. A) Joelho normal; observar o espaço escuro entre o fêmur (superior) e a tíbia (inferior), representando a cartilagem íntegra. **B) Joelho artrósico;** a redução do espaço intrarticular (setas azuis) causa o atrito entre as duas estruturas ósseas, que responde, dentre outras maneiras, com a formação de osteófitos – expansões ósseas em formato de espora (setas amarelas)



Fonte: adaptado de <http://manchesterhipandknee.com> (2018)

A radiografia convencional, no entanto, possui limitações, pois apesar da cartilagem articular ser o principal sítio de investigação clínica, alterações no menisco, nos ligamentos, nos músculos adjacentes e na sinóvia são de grande importância, e não são evidenciadas por esse método (HAYASHI et al., 2016).

A imagem por ressonância magnética (IRM) é um método que vem ganhando espaço e confiabilidade na prática reumatológica e ortopédica, principalmente por proporcionar a análise do joelho como um órgão completo (HUNTER et al., 2007). Apesar disso, os altos

custos que envolvem a técnica são um fator limitante para a sua aplicação na rotina médica (ROEMER et al., 2014). A tomografia computadorizada (CT) e a ultrassonografia (USG) representam métodos menos utilizados no diagnóstico da OA (MOSHER et al., 2013).

2.4.2 Ferramentas laboratoriais

O Colégio Americano de Reumatologia preconiza a utilização de alguns parâmetros laboratoriais no auxílio do diagnóstico da OA, como a velocidade de hemossedimentação (VHS) e análise do fator reumatoide (FR), sendo este indicado principalmente como diagnóstico diferencial para a artrite reumatoide (ABISHEK & DOHERTY, 2013).

Outra ferramenta laboratorial é a análise do fluido sinovial, que auxilia no diagnóstico diferencial de artrite séptica e na verificação da existência de cristais de cálcio na articulação (SHOLTER et al., 2017). O método é realizado através da aspiração do líquido sinovial do joelho – a artrocentese – que possibilita a avaliação, tanto de aspectos macroscópicos (ex: cor, turbidez e viscosidade) quanto de aspectos celulares (ex: quantidade de células e predomínio de polimorfo ou mononucleares) (VALLEJO & RUIZ, 2014).

2.4.3 Instrumentos de avaliação funcional

Como abordado anteriormente, a OA é uma doença que traz um sério comprometimento funcional dos pacientes, incluindo a incapacidade de realização de atividades diárias e limitações do movimento. O estudo da capacidade funcional é importante para avaliar a independência dos indivíduos, principalmente da população idosa (SANTOS et al., 2015). Essa avaliação é feita através da aplicação de questionários, que são respondidos pelos próprios pacientes.

Um desses questionários é o *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index* (WOMAC), que avalia a dor, a rigidez articular e a capacidade funcional do paciente, sendo utilizado, inclusive, como parâmetro em ensaios clínicos (BASARAN et al., 2015). Já o índice Lequesne é um *score* funcional recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela EULAR, cujo foco são parâmetros como dor, desconforto e distância percorrida em caminhadas (SANTOS et al., 2015). Ambos possuem versões traduzidas e validadas para a língua portuguesa (FERNANDES, 2002; MARX et al., 2006).

2.5 PATOGÊNESE

Os mecanismos de desenvolvimento da osteoartrite são complexos e até hoje não foram totalmente elucidados. Inicialmente considerada uma doença “*wear and tear*” (“desgaste pelo uso” em tradução livre), a osteoartrite era tida como consequência unicamente de fatores biomecânicos, que, somados à baixa capacidade reparativa dos condrócitos, aceleravam a diminuição da vida útil da articulação (BERENBAUM, 2013).

Esse paradigma foi quebrado com o advento da Biologia Molecular, que possibilitou a descoberta de diversos mediadores solúveis envolvidos no processo inflamatório (DAGHESTANI & KRAUS, 2015). Hoje, sabe-se que, durante o curso da doença, a cartilagem é submetida tanto ao estresse mecânico quanto ao estresse inflamatório (RANNOU et al., 2010).

A princípio, a osteoartrite é caracterizada por um conjunto de processos fisiopatológicos, como a remodelação do osso subcondral, a inflamação sinovial, a apoptose dos condrócitos e a degeneração progressiva da cartilagem; esses dois últimos, no entanto, são considerados os marcos da doença (THYSEN et al., 2015).

2.5.1 Cartilagem articular

A cartilagem articular é um tecido avascular, aneural e hialino, que tem por função absorver e distribuir adequadamente as cargas nas articulações (DECKER et al., 2015). Enquanto tecido conjuntivo, a cartilagem é composta por uma matriz extracelular, que confere força tênsil e rigidez, e pelos condrócitos (GOLDRING, 2012).

Os condrócitos são a única população celular presente na cartilagem articular (CUCCHIARINI et al., 2016). De morfologia esférico-ovalada e medindo de 10 a 30 µm (STOCKWELL, 1978), estas células são responsáveis pela manutenção da homeostase da cartilagem, através da produção ou degradação da matriz extracelular, a depender das necessidades do microambiente tecidual (GOLDRING & GOLDRING, 2007). Na cartilagem, os condrócitos encontram-se inseridos em uma matriz pericelular (MPC), que desempenha um papel fundamental para sua sinalização intracelular (ZHANG, 2015).

Os condrócitos passam por um processo de diferenciação na fase inicial do seu ciclo, e se estabelecem como células de baixa atividade mitótica (FINDLAY & ATKINS, 2014). Como mencionado anteriormente, os condrócitos mantêm a integridade da cartilagem através de um balanço entre atividades anabólicas e catabólicas. É importante ressaltar que essas

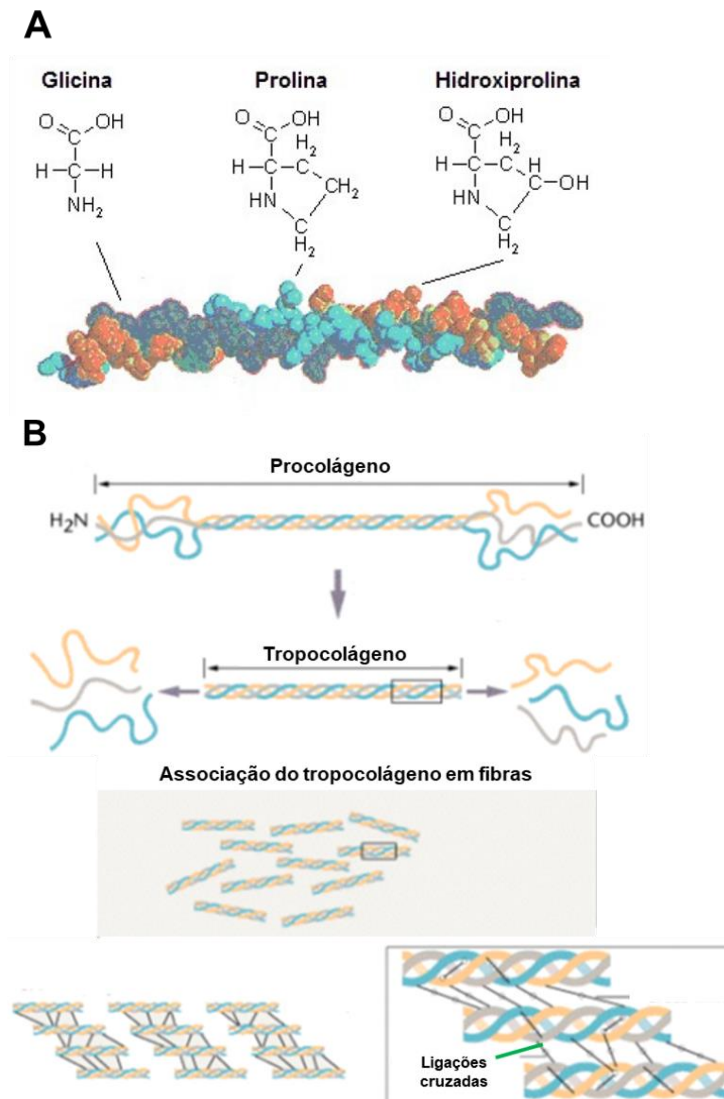
células possuem uma baixa capacidade reparativa, e que o *turnover* de proteoglicanos e fibras colágenas pode durar décadas (FOX et al., 2009).

Na matriz, os condrócitos respondem a alterações bioquímicas e biomecânicas através de receptores de superfície, que interagem fortemente com moléculas da MEC. Entre tais receptores, podem ser citadas as integrinas, o receptor com domínio de discoidina (DDR-2), o anteriormente citado CD44 e o sindecan (LOESER, 2014). Os mecanosensores incluem os cílios primários, a conexina 43, o hedgehog indiano (Ihh) e o receptor vanilóide de potencial transitório 4 (TRPV4) (O'CONOR et al., 2016).

A matriz extracelular da cartilagem é composta principalmente por fibras colágenas, elastina, glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Vários tipos de colágeno podem ser encontrados na matriz, mas o tipo II, em especial, representa mais de 90% da massa proteica (BRODY, 2014). No tecido, as fibras colágenas se entrecruzam para formar um arcabouço de ancoragem para os proteoglicanos.

A síntese do colágeno ocorre no retículo endoplasmático (RER), seguida de modificações pós-traducionais no complexo golgiense (BAYNES & DOMINICZACK, 2015). O colágeno é sintetizado em uma pró-forma (procolágeno) de tripla hélice, constituída por duas hélices $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$ (VOET & VOET, 2013). Cada hélice é formada, em sua maior parte, pela sequência Gly-X-Pro ou Gly-X-Hyp, podendo o “X” ser qualquer um dos 20 aminoácidos primários (SILVA & PENNA, 2012). A tripla hélice é secretada na matriz, onde sofre um processo de clivagem em suas extremidades N e C-terminais por peptidases. Os peptídeos clivados (tropocolágeno), unem-se através ligações covalentes entre os resíduos dos aminoácidos, conhecidas como “ligações cruzadas” (SAEIDI, 2009). (**figura 3**)

Figura 3 – Formação das fibras colágenas. A) Representação da tripla hélice de colágeno. B) Clivagem do procólágeno e formação das fibras colágenas, através de ligações cruzadas



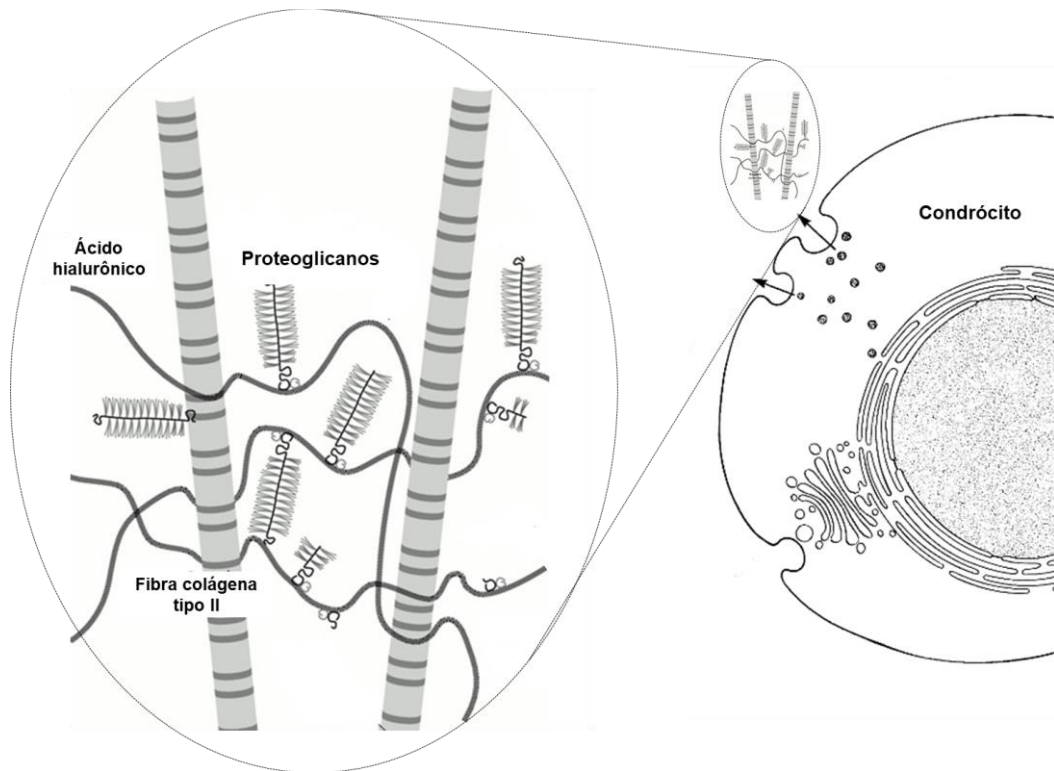
Fonte: adaptado de SAEIDI (2009) e SILVA & PENNA (2012)

Os proteoglicanos – glicosaminoglicanos ligados a um *core* proteico – são moléculas altamente hidrofílicas, cujo poder de retenção de água ajuda na difusão e distribuição de nutrientes pela cartilagem (NOVINCE et al., 2013) (**figura 4**). O agrecan é o principal representante dessa classe de macromoléculas, que desempenham um papel importante na interação condrócito-condrócito e condrócito-matriz, além de serem cruciais para a morfogênese condroesquelética (GAO et al., 2014)

Os glicosaminoglicanos, representados pelo sulfato de condroitina, sulfato de queratano e sulfato de dermatan, são carregados negativamente, o que ajuda na atração de

água, íons Ca^{++} e Na^+ e na manutenção da arquitetura tecidual (JEROSCH, 2011). Os glicosaminoglicanos, quando não estão ligados a um *core* proteico, nem se apresentam sob a forma sulfatada, são chamados de ácido hialurônico (CHOPRA et al., 2014). A glicoproteína CD44, altamente presente na superfície dos condrócitos, é o principal receptor para o ácido hialurônico, o que auxilia na ancoragem das células à matriz (TOEGEL et al., 2010)

Figura 4 – Componentes da matriz cartilaginosa. As fibras de colágeno tipo II, juntamente com os proteoglicanos e glicosaminoglicanos (ácido hialurônico), formam uma rede hialina altamente tênsil e hidrofílica



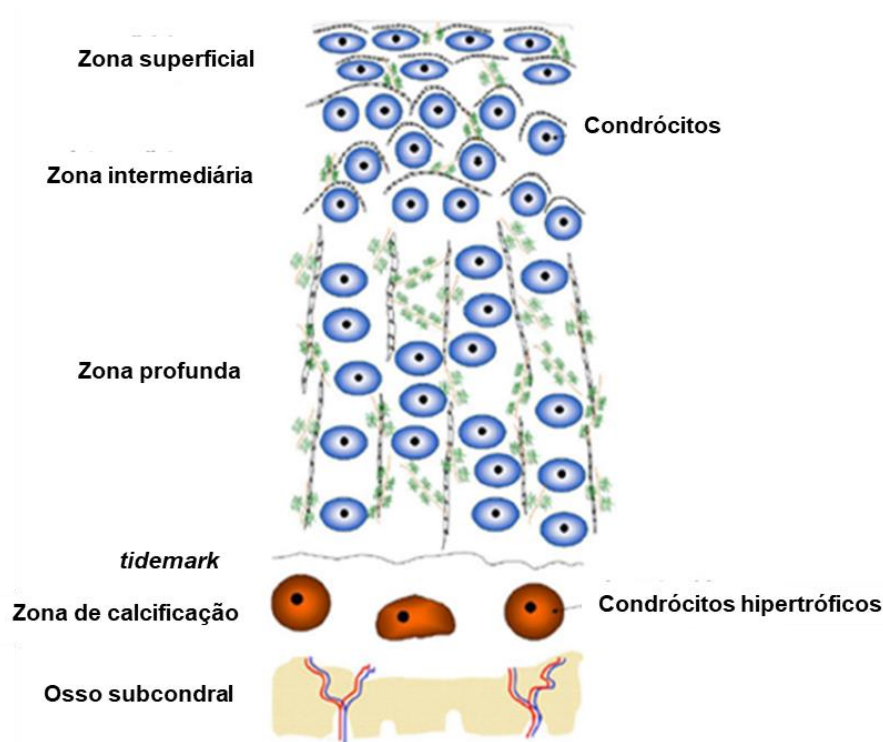
Fonte: adaptado de MANKIN et al. (2000) e POOLE et

Histologicamente, a cartilagem articular é dividida em quatro zonas principais: a) a zona superficial, cujas células e fibras colágenas se encontram organizadas paralelamente à superfície do tecido, b) a zona intermediária, com fibras dispostas de forma aleatória e c) a zona profunda, com distribuição perpendicular do colágeno e formação de colunas proliferativas (BRODY et al., 2014) (**figura 5**).

Por fim, encontra-se a d) camada de calcificação, separada da zona profunda por uma linha basófila chamada de “linha de maré”, que está disposta paralelamente à cartilagem articular, e confere ao sistema uma alta resistência às forças de cisalhamento (LI et al., 2013).

Nessa camada os condrócitos assumem um estado hipertrófico, caracterizado pela deposição de cálcio, pela alta produção de colágeno tipo X e fosfatase alcalina (KRANN & BERG, 2012). É justamente nessa sub-região onde as células sofrem apoptose e o molde de cartilagem sintetizado por elas é mineralizado e substituído por um tecido ósseo trabecular – processo conhecido como ossificação endocondral (MAN-GER & BEIER, 2014)

Figura 5 – Esquema histológico da cartilagem articular. A cartilagem é subdivida em zonas, que diferem quanto ao arranjo das fibras colágenas e a disposição dos condrócitos.



Fonte: adaptado de CUCCHIARINI et al.

2.5.2 Osso subcondral

Localizado logo abaixo da zona de calcificação, o osso subcondral é uma estrutura altamente dinâmica, que, juntamente com a cartilagem articular, forma a “junção osteocondral” e participa do processo de amortização e distribuição das cargas ao longo da articulação (SURI & WALSH, 2012). Ao contrário da cartilagem articular, este é altamente vascularizado, enervado e dotado de canais, que são responsáveis pela estreita relação biomecânica e bioquímica com a cartilagem (LI et al., 2013). Os vasos terminais do osso

subcondral, por exemplo, estão em contato direto com a zona profunda da cartilagem, suprimindo cerca de 50% da sua necessidade de oxigênio e glicose (HENROTIN et al., 2012).

Em comparação à cartilagem articular, o osso subcondral possui um *turnover* muito mais rápido, sofrendo diversos processos de remodelação em resposta às mudanças biomecânicas do meio (ZHEN & CAO, 2014). Além disso, os osteoblastos desse tecido secretam fatores que ajudam na manutenção da matriz cartilaginosa, como o TGF- β e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1) (SANZHEZ et al., 2008).

2.5.3 Membrana sinovial

A membrana sinovial é um tecido conjuntivo que delimita a cápsula sinovial. A sinóvia não só protege a cartilagem articular, mas secreta o fluido que contém substâncias importantes para a sua manutenção e integridade, como a lubricina e o ácido hialurônico, através dos sinoviócitos do tipo B (SCANZELLO & GOLDRING, 2012). É atribuída à membrana sinovial, também, a função de remoção dos subprodutos do metabolismo dos condrócitos, bem como do *turnover* das moléculas da matriz, já que a cartilagem não possui um sistema de drenagem linfática (BRESNIHAN et al., 2009); tal papel é exercido pelos sinoviócitos tipo A, que são semelhantes a macrófagos.

2.5.4 Degradação da cartilagem articular

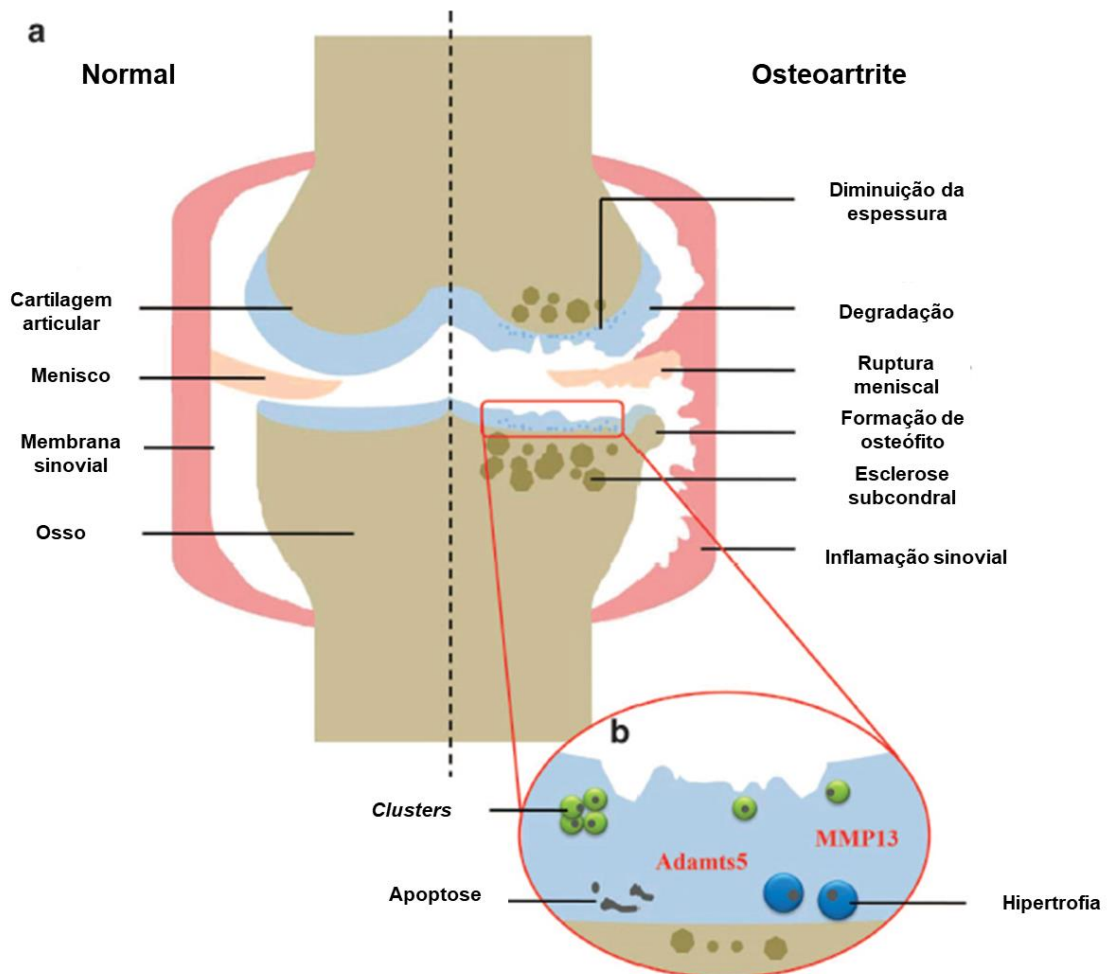
Como mencionado anteriormente, a fisiopatologia da OA é complexa, multifatorial e ainda não totalmente compreendida. Segundo Sherwood e colaboradores (2014), para a degradação da cartilagem articular, os condrócitos sofrem uma subversão das suas funções celulares e passam a produzir mediadores inflamatórios e moléculas catabólicas como interleucinas e metaloproteinases. Esse conjunto de eventos resulta em um *feedback* negativo para as células, que por dependerem da integridade da matriz para sobreviverem, morrem por apoptose (HWANG & KIM, 2015).

Para Cucchiari e colaboradores (2016), a subversão dos condrócitos é iniciada com a alteração das interações entre as células e a matriz pericelular (MPC). Como resultado da lesão da cartilagem por envelhecimento, trauma, alterações estruturais, obesidade, inflamação ou fatores genéticos, as interações entre esses receptores e as moléculas da MPC são alteradas, levando os condrócitos a uma mudança de fenótipo com resposta catabólica totalmente desequilibrada.

A cartilagem sob degradação evoca uma resposta inflamatória também por parte da membrana sinovial e dos osteoblastos no osso subcondral (RANNOU et al., 2010). Este responde à agressão com alterações que vão desde a esclerose subcondral até a formação de osteófitos e invasão vascular (STUPINA et al., 2014), além de secretar altos níveis de fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e IL-6 (SHARMA et al., 2013) (ver **figura 6**).

Os sinoviócitos, sendo células altamente sensíveis aos mediadores inflamatórios, geram um *feedback* de mesma proporção (KOPPIKAR et al., 2015). Assim, a artrose é caracterizada por intensa sinovite (apesar de mais branda se comparada à artrite reumatoide), com presença de infiltrado inflamatório e aumento da secreção de IL-1 β , TNF e fator de crescimento neuronal (NGF) no fluido sinovial, o que colabora para o estabelecimento da dor articular (STOPPIELLO et al., 2014).

Figura 6 – Esquema comparativo entre a articulação normal e a osteoartrite. A cartilagem degradada torna-se mais frágil e menos tênsil, além de sofrer um processo anormal de calcificação e hipertrofia dos condrócitos. Outra característica marcante é a formação de *clusters*, que se concentram principalmente na zona superficial, como forma de diminuir a distância para difusão dos nutrientes do líquido sinovial.



Fonte: adaptado de ZHANG et al., 2016

Como resultado desse conjunto de eventos, a cartilagem torna-se altamente fibrilada em sua região superficial, frágil, desorganizada e com a presença de aglomerados de até 20 condrócitos, chamados de *clusters* (LOTZ et al., 2010). Não se sabe ao certo a função desses *clusters*, mas estudos apontam que estes representam um mecanismo de defesa, com alto potencial proliferativo e expressão de marcadores condrogênicos, como o fator de transcrição SRY-box 9 (SOX9) e o próprio colágeno tipo II (HOSHIYAMA et al., 2015).

2.5.5 Apoptose dos condrócitos

A apoptose é um processo de morte celular altamente regulado, envolvido na homeostase e no envelhecimento dos tecidos (CHILDS et al., 2014). Na ossificação endocondral, por exemplo, é necessário que os condrócitos entrem em apoptose para que o molde de cartilagem seja substituído por um tecido ósseo (MAN-GER & BEIER, 2014).

O processo apoptótico é iniciado e conduzido de duas maneiras: a) pela via extrínseca, ativada por meio de “receptores de morte”, e b) pela via intrínseca ou “via mitocondrial”. Embora representem mecanismos distintos, as duas vias convergem para um caminho comum, envolvendo uma cascata de clivagens proteicas executadas pelas caspases (ELMORE, 2007). Essas são proteases específicas, que além de participarem do estágio final da apoptose, ativam citocinas que são sintetizadas em pró-formas, como a IL-1 β . As caspases podem ser subdivididas em iniciadoras e efetoras; as iniciadoras – caspases 8 e 9 – clivam pró-formas inativas de caspases efetoras – as caspases 3, 6 e 7 – que, por sua vez, clivam outros substratos proteicos da célula, resultado na morte por apoptose (FAN et al., 2005).

A via extrínseca, quando iniciada pelo receptor de morte Fas, pode ocorrer de forma dependente ou independente da mitocôndria. Quando a sinalização é desencadeada pela interação entre esse receptor e seu ligante (FasL), a caspase 8 cliva diretamente a caspase 3. Em outros tipos celulares, a caspase 8 cliva a proteína BID, que induz uma amplificação mitocondrial para posterior ativação da caspase 3 (MEDINA, 2011). Entre outros receptores de morte descritos, podem ser citados o receptor para o TNF (TNF-R1) e o receptor do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) (PARK et al., 2007).

A via mitocondrial é ativada em resposta à danos no DNA, com a liberação do citocromo C, que é uma proteína regulada por mecanismos anti (Bcl-2, Bcl-xl) e pró-apoptóticos (Bax, BID). O citocromo C liga-se, então, à proteína associada à apoptose (Apaf-

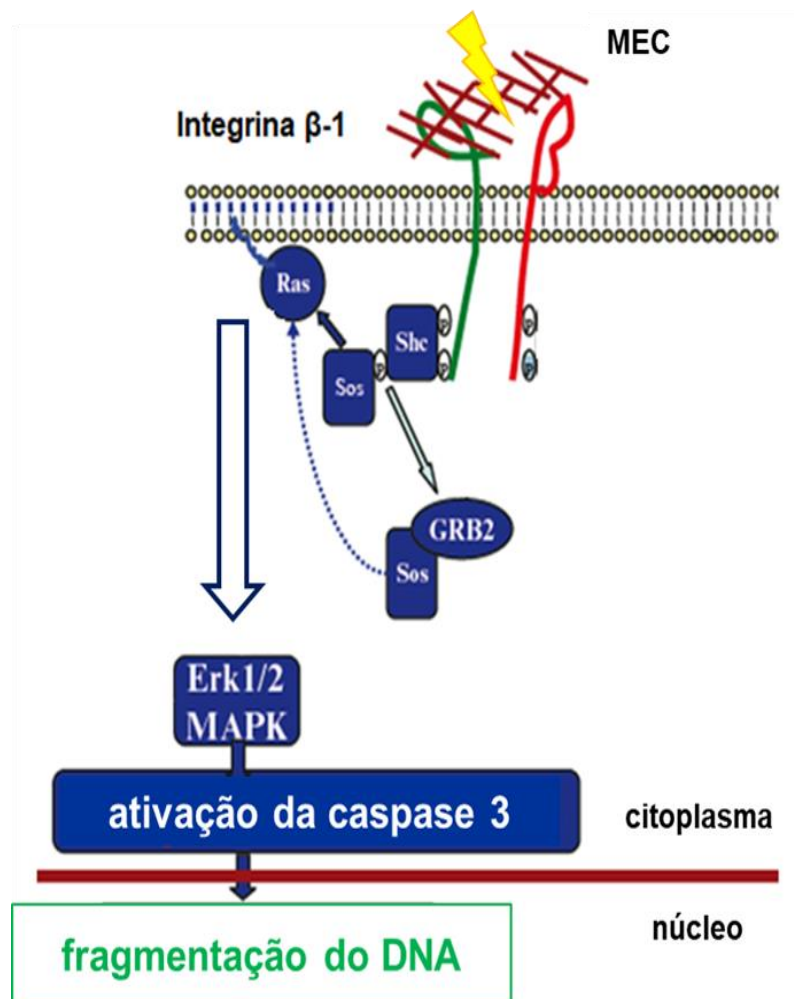
1), ao trifosfato de deoxiadenosina (dATP) e à caspase 9, formando um complexo denominado “apoptossomo” (ANAZETTI & MELO, 2007).

Borrelli (2006) aponta que os condrócitos podem entrar em apoptose por ambas as vias. Na OA, porém, o processo de morte programada é exacerbado, formando um ciclo vicioso com a degradação da matriz, onde a progressão de um agrava o outro (HWANG & KIM, 2015). De fato, vários estudos demonstraram que a degradação da matriz, com consequente perda da adesão celular dos condrócitos, é a principal causa de apoptose na OA (LO & KIM, 2004; ZAMLI & SHARIF, 2011; KUNWAR et al., 2017; HUANG et al., 2017).

A integrina β -1, presente na superfície dos condrócitos, é uma proteína que interage com a matriz cartilaginosa, promovendo a adesão dos condrócitos e mantendo ativa a via de sinalização Ras-MAPK (WHITNEY et al., 2012). Essa via é responsável pela ativação de diversos genes relacionados à diferenciação e sobrevivência celular; a via MAPK inibe, por exemplo, a alteração dos condrócitos para o fenótipo fibroblastóide em culturas de monocamada (CHEN et al., 2014).

A perda da interação entre a integrina β -1 e a MEC, causada pela sobrecarga articular e desarranjo tecidual, resulta na mudança da sinalização da via MAPK, que passa a estimular a atividade da caspase 3, como mostra a **figura 7**. Esse processo é chamado de “mecanotransdução”, ou seja, estímulos mecânicos são convertidos em sinais que evocam respostas intracelulares (SHAKIBAEI et al., 2008). Vale ressaltar que as MAPKs também são altamente responsivas à IL-1 β e ao TNF, o que contribui para o aumento da atividade apoptótica dos condrócitos (TAKEBE et al., 2011)

Figura 7 – Esquema representativo da apoptose nos condrócitos via Ras-MAPK. A perda da interação da integrina β -1 com a MEC muda a sinalização da via MAPK para ativar as caspases 3, que clivando o DNA e outros substratos celulares, levam à morte por apoptose. Sos, She e GRB2 = proteínas envolvidas na transdução de sinais; MEC = matriz extracelular;



Fonte: adaptado de SHAKIBAEI *et al.*, 2008

2.5.6 Citocinas

Diante do que foi exposto, fica evidente a importância dos mediadores inflamatórios, tanto por seu papel na degradação da matriz, como na apoptose dos condrócitos. As citocinas são fortes candidatas a alvos terapêuticos nos estudos da OA, sendo a IL-1 β , a IL-6 e o TNF os destaques da literatura (LAADHAR *et al.*, 2007)

2.5.6.1 IL-1 β

A IL-1 β é uma citocina da família das IL-1, codificada pelo gene IL1B do cromossomo 2. A princípio, é sintetizada como um pró-peptídeo inativo de 31 kDa, que, em condições inflamatórias é clivada pela caspase 1 e liberada como uma proteína ativa de 17 kDa (PALOMO et al., 2015). A citocina ativa pode, então, ligar-se ao seu receptor (IL-1R1) e exercer suas funções. Quando ligada à outra isoforma do seu receptor, IL-1R2, a IL-1 β tem seus sinais intracelulares inibidos, já que este funciona como um regulador negativo (PETERS et al., 2013).

Entre os efeitos biológicos desempenhados pela IL-1 β , destacam-se a indução da liberação do conteúdo granular de neutrófilos (lisozimas, lactoferrina, collagenase), proliferação e ativação de células T CD4⁺, secreção de IL-2 e IL-6, aumento da adesão leucocitária, recrutamento de monócitos e macrófagos, auxílio na eficácia da fagocitose e estímulo da síntese de proteínas de fase aguda nos hepatócitos (GONZAGA & VIEIRA, 2013).

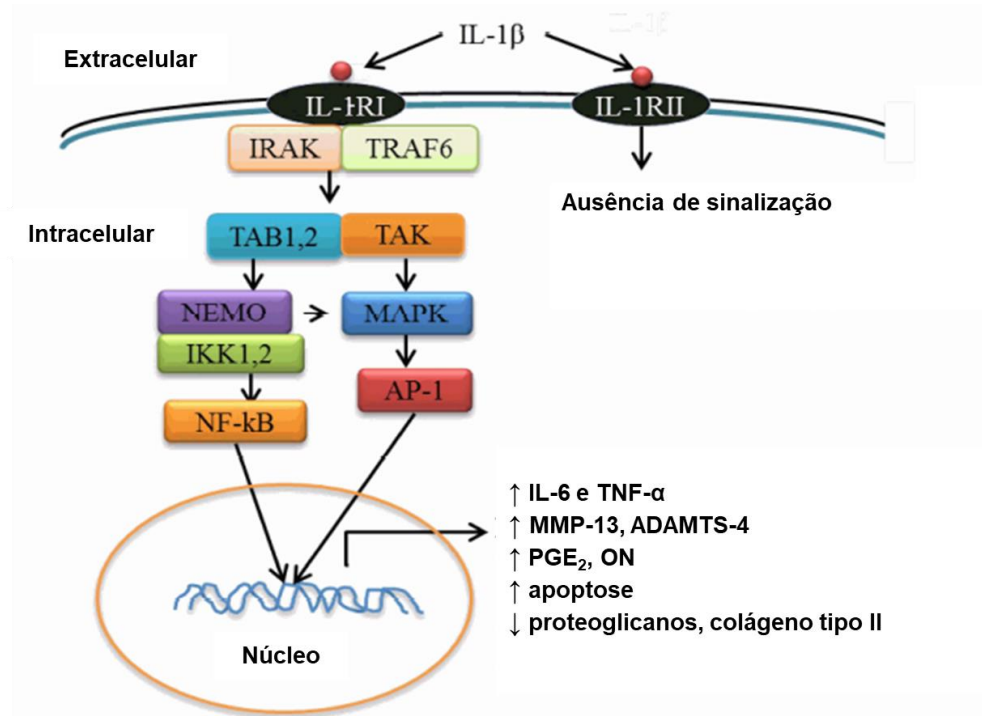
Na OA, os condrócitos passam a produzir a IL-1 β intensamente, que, através de uma sinalização parácrina e autócrina, ativa o NF- κ B e cria um *feedback* positivo, estimulando, além da sua própria síntese, a de outras citocinas como IL-6 e IL-8 (CONDE et al., 2015) a sua própria expressão. A síntese de IL-1 β também é estimulada após sinalização dos receptores *tool-like* (TLRs) (NASI et al., 2017). Essas células expressam as isoformas TLR-1, TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em diferentes fases da sua diferenciação e condrogênese, sendo tais receptores altamente responsivos a produtos de degradação da matriz, como proteoglicanos de baixo peso molecular e fragmentos de fibronectina (SILLAT et al., 2013).

A IL-1 β é apontada como a grande orquestradora dos eventos degradativos da OA principalmente por estimular a síntese de metaloproteinases (MMPs), que são endopeptidases dependentes de zinco, capazes de degradar grande parte dos componentes da matriz extracelular (OZEKI et al., 2014). A principal MMP descrita na patogênese da OA é a MMP-13, que não é expressa constitutivamente nos tecidos, mas passa a ser detectada nas cartilagens artrósicas (PIECHA et al., 2010). A MMP-13 catalisa a quebra da fibra de colágeno em único sítio, o que resulta na formação de pequenos polipeptídeos (LI et al., 2011). Um grupo especial de metaloproteinases também é ativado na OA: as desintegrinas e metaloproteinases com motivo de tromboespondrina (ADAMTS), que são, em sua maioria, quebradoras de proteoglicanos e glicosaminoglicanos (KELWICK et al., 2015).

O ambiente inflamatório na cartilagem articular da OA é, em grande parte, estabelecido pela IL-1 β . Isso porque essa interleucina também é capaz de induzir a expressão da ciclooxygenase-2 (COX-2) e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), o que leva a um aumento na síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) e óxido nítrico (ON), respectivamente (CHENG et al., 2012) (**figura 8**).

Attur e colaboradores (2011) demonstraram que a expressão gênica da IL-1 β está aumentada em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com osteoartrite, e que essa expressão está correlacionada com a piora da dor. Tais propriedades levam, inclusive, à utilização da IL-1 β como agente estimulante pró-inflamatório em modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* (JOHSON et al., 2016; MABEY & HONSAWEK, 2015) e solidificam sua importância para a patogênese da OA.

Figura 8 – Sinalização da IL-1 β . A ligação da IL-1 β ao tipo I do seu receptor gera uma cascata de sinalização que ativa o fator de transcrição NF- κ B. Este, agindo sobre o DNA, estimula a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , além de PGE₂, óxido nítrico (ON) e proteases. A diminuição dos componentes da matriz, por sua vez, inibe a interação dos condrócitos com a sua matriz, levando à morte por apoptose.



Fonte: adaptado de KUMAR et al., 2017

2.5.6.2 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O TNF é uma citocina pleiotrópica, produzida primariamente por monócitos e macrófagos, sob uma pró-forma inativa (26 kDa), que é convertida para a forma ativa (17 kDa) pela enzima conversora de TNF (TNFCE) (ESPOSITO & CUZZOCREA, 2009).

O gene que o codifica está localizado no cromossomo 6 e tem sua expressão regulada por diversos fatores, incluindo o NF- κ B e o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) (PARAMESWARAN & PATIAL, 2010). O TNF desempenha suas funções através da ligação a qualquer uma das isoformas do seu receptor, a saber TNFR1 e TNFR2 (BRADLEY, 2008).

Inicialmente, o TNF foi descoberto por Carswell e colaboradores (1975) como um fator capaz de causar a necrose hemorrágica de um fibrossarcoma induzido por metilcolantreno; de fato, os macrófagos aumentam sua atividade citolítica quando sinalizados pelo TNF (SOUSA et al., 2013). Hoje, sabe-se que em condições inflamatórias, o TNF age também sobre células epiteliais, estimulando a expressão de moléculas para adesão dos leucócitos, (JUNIOR, 2008), e isso faz com que essa citocina exerça um papel fundamental na imunidade inata, principalmente no combate a microorganismos e certos tumores (VUJANOVIC, 2011)

Apesar de tais propriedades, a expressão crônica do TNF está associada ao desenvolvimento da OA, sendo seus efeitos na cartilagem articular muito similares aos da IL-1 β (WODJASIEWICZ *et al.*, 2014). O TNF é capaz de aumentar em condrócitos a expressão da ADAMTS-4, que é a apontada como a principal agrecanase envolvida na degradação da cartilagem (XUE et al., 2013).

É importante ressaltar que, além de colaborar com os eventos degradativos, o TNF está diretamente envolvido com a atividade apoptótica aumentada dos condrócitos, pois, como descrito anteriormente, pertence à classe de ligantes cujos receptores possuem os chamados “domínios de morte”, que ativam a via extrínseca da apoptose (HWANG & KIM, 2015). Além disso, o TNF, juntamente com a IL-1 β e a IL-6, promove a erosão óssea, agindo na diferenciação e maturação dos osteoclastos, o que acelera a remodelação do osso subcondral (VITALE & RIBEIRO, 2007).

2.5.6.3 IL-6

Outro mediador solúvel que é produzido em resposta à processos fisiológicos no organismo é a IL-6. Essa interleucina, também chamada de fator 2 estimulador de células B

(BSF-2), regula processos importantes, como a hematopoiese e a ativação e diferenciação de linfócitos (TANAKA et al., 2014).

O gene IL6, localizado no cromossomo 7p21, codifica uma proteína de 28 kDa que é sintetizada em diversos tipos celulares, como linfócitos T e B, fibroblastos, monócitos, queratinócitos, células mesangiais e até em algumas células tumorais (ATAIE-KACHOIE et al., 2014). O receptor da IL-6, IL-6R, forma um complexo com a glicoproteína 130 (gp130) para ativar as tirosino-quinases JAK (CORNELISSEN et al., 2012).

O papel da IL-6 na fisiopatologia da OA é menos conhecido se comparado ao da IL-1 β e do TNF, mas sabe-se que ela age em sinergia com essas citocinas (SUNDMAN et al., 2013). Os níveis de IL-6 estão significativamente elevados no fluido sinovial de pacientes com OA, estimulando a produção de MMP-13 e inibindo a síntese de colágeno tipo II (KAPOOR et al., 2010). A citocina também está elevada no soro de pacientes com OA, mostrando correlação, inclusive, com achados radiográficos (LIVSHITS et al., 2009).

Segundo Nasi e colaboradores (2015), a IL-6 está envolvida no processo de deposição de cristais de fosfato de cálcio na matriz cartilaginosa, aumentando a expressão de genes envolvidos no processo de calcificação, como o canal transportador de pirofosfato Ank e o co-transportador de sódio/fosfato Pit-1, além de marcadores de hipertrofia condrocítica, como colágeno tipo X e o fator de transcrição Runx2.

Apesar de representar o distúrbio osteoarticular mais comum no mundo todo, a OA ainda não possui nenhum biomarcador incorporado de fato na clínica, nem métodos padronizados para a validação desses biomarcadores (HUNTER et al., 2014), por isso, a busca por moléculas sensíveis, mas, sobretudo, específicas, continua.

2.5.6.4 Outras citocinas

Recentemente, muitos grupos de pesquisa voltaram seus esforços para o estudo de algumas citocinas, que demonstraram potencial como biomarcadores e alvos terapêuticos, não só na OA, mas em outras doenças reumáticas como a artrite reumatoide e a esclerose sistêmica (**tabela 1**).

Tabela 1 – Citocinas estudadas recentemente e suas possíveis implicações na patogênese da osteoartrite.

Citocina	Possíveis implicações na osteoartrite	Referências
IL-16	Os níveis séricos da IL-16 estão elevados em pacientes com OA, se comparados aos controles (1). No entanto, após artroplastia total de joelho, os níveis reduzem significativamente (2). Além disso, polimorfismos no gene que codifica a interleucina estão relacionados com o risco de desenvolvimento de OA (3).	(1) LIU et al., 2015 (2) SINGH et al., 2017 (3) LUO et al., 2015
IL-18	A IL-18 age em sinergia com a PGE ₂ para mediar os eventos da OA (4). Variações na região promotora do gene da IL-18 mostraram relação com o desenvolvimento da OA (5). Seus níveis estão elevados no fluido sinovial, no plasma e na cartilagem articular de pacientes com OA, mantendo correlação com achados radiográficos (6).	(4) WANG et al., 2010 (5) JULIN-CURTIS et al., 2012 (6) WANG et al., 2014
IL-22	A IL-22 é expressa por sinoviócitos inflamados de pacientes com osteoartrite (7), sendo capaz de aumentar a expressão de metaloproteinases nessas células (8). Evidências apontam que a IL-22 está relacionada com a remodelação óssea na artrite psoriática, sendo esse um processo crucial na patogênese da OA (9).	(7) DELIGNE et al., 2014 (8) CARRIÓN et al., 2013 (9) PAINE & RITCHLIN, 2016
IL-31	A IL-31 pertence à família das IL-6 e é capaz de estimular a expressão dessa citocina (10). A IL-31 está relacionada à um fenótipo altamente inflamatório em outras doenças do grupo das artrites (11) (12).	(10) CORNELISSEN et al., 2012 (11) ANDERSSON et al., 2015 (12) ROSINE et al., 2018

Fonte: O autor (2018)

2.6 TRATAMENTO

O tratamento da OA é baseado na associação entre componentes farmacológicos e não-farmacológicos. As estratégias farmacológicas são utilizadas no intuito de controlar a dor e retardar a degradação da cartilagem, enquanto as não-farmacológicas se estendem ao bem-

estar físico e mental dos pacientes (WELLSANDT & GOLITHLY, 2017). Em último caso, falhando a terapia com as abordagens disponíveis, os indivíduos são indicados à intervenção cirúrgica (MCGRORY et al., 2016)

2.6.1 Abordagem não-farmacológica

O tratamento não-farmacológico envolve modificações no estilo de vida, incluindo a perda de peso, exercícios físicos e programas de manutenção da qualidade de vida (EVANIEW & EVANIEW, 2017). São indicados exercícios de combate à fraqueza muscular, à redução da propriocepção e às alterações do controle postural; natação e hidroginástica, por exemplo, são exercícios aeróbicos que não sobrecarregam a articulação, além de ajudar no fortalecimento muscular (HRNACK & BARBER, 2014).

Há evidências de que a intervenção fisioterapêutica também é capaz de aliviar a dor e melhorar a funcionalidade (PAGE et al., 2011). A aplicação da fita Kinésio, por exemplo, melhora o *score* WOMAC e diminui a rigidez dos pacientes (RAHLF et al., 2018). A utilização de *bracings* também tem mostrado potencial no alinhamento, correção de deformidades e fortalecimento de músculos relacionados à OA de joelhos (DUIVENVOORDEN et al., 2015).

Entre as técnicas da medicina alternativa chinesa, a acupuntura é a mais utilizada no auxílio do tratamento da OA, principalmente no que diz respeito ao alívio da dor (MANYANGA et al., 2014). A acupuntura confere a analgesia bloqueando o portão da dor ou controlando a liberação de neurotransmissores (SELFÉ & TAILOR, 2008)

2.6.2 Abordagem farmacológica

Os componentes farmacológicos são subdivididos em fármacos de ação rápida, que incluem analgésicos e anti-inflamatórios, e os de ação lenta, também chamadas “drogas modificadoras da osteoartrite” (BOBACZ, 2013).

2.6.2.1 Ação rápida

2.6.2.1.1 Analgésicos

O acetaminofeno (paracetamol) é considerado o analgésico de primeira escolha para alívio das dores articulares (WISE, 2014). O fármaco diferencia-se dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) clássicos, pois, apesar de apresentar efeitos analgésicos e antipiréticos, não possui efeitos anti-inflamatórios e anti-coagulantes significativos, sendo indicado para pacientes que sofrem de asma brônquica, úlcera péptica, e hemofilia, por exemplo

(JÓZWIAK-BEBENISTA & NOWAK, 2014). O acetaminofeno é administrado por via oral e seus efeitos são desencadeados, em sua maior parte, pela inibição da COX (REID et al., 2013).

Os opióides, representados pelo tramadol, são considerados uma alternativa terapêutica para os pacientes que não respondem aos AINES, mas devem ser prescritos com cautela, devido aos sérios efeitos secundários (CEPEDA et al., 2007). A capsaicina, um componente ativo das pimentas *chili*, era utilizada como analgésico tópico para tratamento de OA de mãos, mas seu uso foi descontinuado pelo ACR, devido às reações persistentes de hipersensibilidade local (GIBBONS et al., 2010).

2.6.2.1.2 AINES

Essa classe de fármacos representa o maior número de prescrições para a OA, sendo mais eficazes que o acetaminofeno no alívio das dores (PELLETIER et al., 2016). Os AINES agem inibindo ambas as COX-2 e COX-1 (ex: ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno e diclofenaco) ou seletivamente a COX-2 (ex: celecoxibe), impedindo, assim, que a PGE₂ seja produzida.

AINES tópicos são amplamente utilizados na clínica, pois proporcionam um alívio local sem a associação de efeitos sistêmicos adversos (DERRY et al., 2015). No entanto, sua aplicação torna-se restrita a condições mais superficiais.

Apesar de eficaz no alívio da dor, a terapia com AINES é passível de questionamento, principalmente pelo seu efeito limitado com o tempo e pela gama de efeitos colaterais que esses fármacos trazem para a população idosa, que é considerada de risco (MCCARBERG, 2013). Todos os AINES têm efeito deletério sobre a pressão arterial e a função renal, o que pode trazer complicações cardiovasculares, além das complicações gastrointestinais, como a formação de úlceras (FOGLEMAN, 2013).

2.6.2.1.3 Glicocorticoides

Os glicocorticoides podem ser utilizados no tratamento da OA, principalmente em pacientes que não respondem à terapia com AINES, sendo aplicados na forma de injeção intrarticular (YUSUF, 2016). Estes fármacos têm efeito anti-inflamatório e imunossupressor, reduzindo a permeabilidade vascular para células do sistema imune, inibindo a produção de metaloproteinases, prostaglandinas e leucotrienos (PERKINS et al., 2017).

Atualmente, existem cinco glicocorticoides injetáveis aprovados pelo FDA: acetato de metilprednisolona, acetato de triancinolona, acetato de betametasona e fosfato sódico de betametasona, hexacetonida de triancinolona e dexametasona (AYHAN et al., 2014). Os glicocorticoides injetáveis não exibem grandes efeitos secundários, mas o seu principal fator limitante é a redução dos efeitos com o passar do tempo, além de não trazerem melhora funcional significativa para os pacientes (COSTA et al., 2016).

2.6.2.2 Ação lenta

2.6.2.2.1 Hidroxicloroquina

Os antimaláricos são fármacos que vêm sendo utilizados no tratamento de doenças reumáticas inflamatórias nos últimos 50 anos, mas seus mecanismos de ação ainda são complexos e controversos (RAINSFORD et al., 2015). A hidroxicloroquina (HCQ) é indicada no tratamento de lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, principalmente por inibir a apresentação de antígenos, modular a expressão de IL-1 β , TNF e IL-6 e inibir a ativação dos TLR (COSTEDOAT-CHALUMEAU et al., 2014)

Já que a dor na OA está relacionada com a inflamação, alguns pacientes são submetidos ao tratamento com HCQ, principalmente os que sofrem de OA de mãos (LEE et al., 2017). No entanto, os dados disponíveis mostram que não há comprovação da melhora dos pacientes após o tratamento com o fármaco (KINGSBURY et al., 2018).

2.6.2.2.2 Diacereína

A diacereína é uma antraquinona que possui ação inibitória sobre a IL-1 β e sua subsequente cascata de sinalização (PAVELKA et al., 2016). O composto é considerado um nutracêutico, ou seja, um produto natural ou parcialmente natural com efeito terapêutico ou benefício para a saúde (SANTOS, 2013).

Apesar de possuir registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a diacereína não é aprovada pelo FDA para o tratamento da OA. De fato, uma revisão sistemática publicada por Fidelix e colaboradores (2014) mostrou que os efeitos anti-inflamatórios e analgésicos são mínimos e que foram evidentes apenas na OA de quadril. Além disso, a diacereína possui um efeito colateral proeminente que é a intensa diarreia

2.6.2.2.3 Óleo insaponificável de abacate e soja (ASU)

O ASU é uma mistura que consiste na fração insaponificável do abacate (1/3) e da soja (2/3), incluindo vitaminas lipossolúveis, esteróis, terpenos e furanos (CHRISTIANSEN et al.,

2015). Henrotin (2008) demonstrou que o ASU é capaz de inibir a produção de IL-1 β , IL-6, IL-8 e metaloproteinasas em condrócitos primários, além de estimular a síntese de agrecan. Em relação à melhora clínica, os dados são conflitantes, mas um estudo recente com modelos murinos mostrou que o nutracêutico tem potencial em aliviar a dor articular e melhorar moderadamente a funcionalidade em ratos Wistar (GOUDARZI et al., 2018).

2.6.2.2.4 *Glicosamina e condroitina*

A glicosamina e a condroitina são um aminoaçúcar e um glicosaminoglicano, respectivamente, que funcionam como substratos para a síntese de moléculas importantes da matriz cartilaginosa, assim, o principal efeito que se espera da sua utilização são mudanças estruturais benéficas para a cartilagem (REGINSTER et al., 2012). No entanto, essas moléculas, que são administradas por via oral nas suas formas sulfatadas (RAGLE & SAWITZKE, 2012), possuem limitações e controvérsias enquanto condroprotetoras, principalmente em relação à sua farmacocinética e seus mecanismos de ação (VASILIADIS & TSIKOPOULOS, 2017).

2.6.2.2.5 *Ácido hialurônico*

O ácido hialurônico é administrado intrarticularmente por injeção, com o intuito de lubrificar a cartilagem e recuperar sua propriedade viscoelástica (REID, 2013); assim, o procedimento é frequentemente chamado de “terapia de viscosuplementação” (HUNTER, 2015). Porém, as evidências apontam que os benefícios para os pacientes são mínimos ou clinicamente irrelevantes (RUTJES et al., 2012).

2.6.3 **Intervenção cirúrgica**

O tratamento cirúrgico para a OA envolve métodos conservadores, nos quais a cartilagem danificada é mantida, e métodos radicais, que consistem na total substituição da cartilagem por uma prótese (L’ESCAPOLIER et al., 2016).

2.6.3.1 Artroscopia

O método conservador mais comum é a artroscopia, que permite a lavagem e debridamento da cartilagem artrósica através da visualização pelo artroscópio (KATZ et al., 2014). O objeto, que nada mais é que um endoscópio, é inserido na cartilagem após uma pequena incisão, transmitindo a imagem da articulação para uma tela. A artroscopia é indicada, inclusive, para pacientes jovens, como forma de retardar ou até prevenir o desenvolvimento da OA (DONELL, 2014). O procedimento não apresenta grandes riscos ou

complicações, mas quando ocorrem (ex: artrite séptica decorrente de artroscopia) podem ser letais (BALATO et al., 2017).

2.6.3.2 Artroplastia total

A substituição da cartilagem por uma prótese é indicada quando o paciente não responde aos tratamentos conservadores ou quando há deformidades extrarticulares associadas (PAREDES-CARNERO et al., 2018). Apesar de ser considerado um método radical, os riscos associados à cirurgia diminuíram nas duas últimas décadas (KATZ et al., 2014), além do que, a artroplastia traz uma melhora bastante significativa do status funcional do paciente (MANEN & MONT, 2012).

2.7 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS E MODELOS DE ESTUDO *IN VITRO*

Uma estratégia que tem ganhado destaque entre as indústrias farmacêuticas e a comunidade científica é o reposicionamento de fármacos. Ashburn e Thor (2004) definiram o reposicionamento como “o processo de descobrir novas utilizações de um fármaco para além da sua indicação original, redirecionando-os, reposicionando-os, reaproveitando-os e reperfilando-os”.

Esse processo traz uma série de vantagens sobre a síntese de novas moléculas – que ainda é o padrão-ouro entre as companhias – incluindo o conhecimento prévio de parâmetros farmacocinéticos e dinâmicos, toxicidade e mecanismos de ação, o que aceleraria o seu desenvolvimento (LANGEDIJK et al., 2015). Através de informações sobre a interação do fármaco com outro, da sua estrutura química e de seu(s) grupo(s) farmacofórico(s), é possível estudar a sua aplicação em outras doenças (ZHOU et al., 2015).

Os estudos de reposicionamento ainda são escassos na OA, se comparados com os de outras doenças reumáticas (GRAMMER & LIPSKY, 2017), mas alguns agentes antiarrítmicos (BERNARD, 2014), imunobiológicos (LEE et al., 2016) e antitussígenos (CHEN et al., 2018) mostraram mecanismos anti-inflamatórios e condroprotetores em modelos *in vitro*.

2.7.1 Modelos *in vitro* de estudo da OA

Modelos *in vitro* são ferramentas importantes na elucidação dos mecanismos moleculares de desenvolvimento da OA, além de proporcionarem a base para os primeiros testes de fármacos (GRENIER et al., 2014). Diversos modelos são utilizados atualmente e, como exemplificado na **tabela 2**, cada um possui suas vantagens e limitações.

Tabela 2 – Modelos de estudo *in vitro* e suas principais vantagens e desvantagens.

Modelo	Variáveis que podem ser aplicadas	Vantagens	Desvantagens
Cultura em monocamada (2D)	Estimulação por citocinas, pressão osmótica	Permite a expansão das células a partir de uma única amostra; investigação de mecanismos distintos separadamente	Alteração do fenótipo celular devido ao isolamento e falta da MEC normal
Co-cultura	Estimulação por citocinas, pressão osmótica	Considera a interação entre diferentes tipos celulares	Alteração do fenótipo celular; diferentes tipos celulares requerem diferentes métodos de cultura
Cultura 3D	Estimulação por citocinas, pressão osmótica, injúria física, regimes de carga	Confere às células um arcabouço muito similar ao do tecido original;	A carga aplicada nos testes é limitada pelo tipo de <i>scaffold</i> ; é necessário isolar e expandir as células antes de inseri-las na matriz
Explante	Estimulação por citocinas, pressão osmótica, injúria física, regimes de carga	Baixo custo; fácil produção; as células são mantidas na matriz original	Morte celular no processo de corte do tecido; baixa replicação celular; podem ser necessários mais de um tipo de tecido para manter sua viabilidade; os atributos físicos podem mudar na cultura

Fonte: JOHNSON et al., 2016

Os modelos de cultura em monocamada são amplamente utilizados, pois permitem a estimulação dos condrócitos com citocinas ou mudanças na pressão osmótica (MIZUNO & OGAWA, 2011), a fim de simular a sobrecarga da articulação. A utilização de citocinas como IL-1 β e o TNF- α se mostrou capaz de induzir efeitos semelhantes à OA nas culturas, incluindo o aumento de enzimas catabólicas e a diminuição de moléculas da matriz cartilaginosa (THYSEN et al., 2015).

Em culturas bidimensionais, os condrócitos tendem a sofrer alterações no seu fenótipo, que estão ligadas à diminuição da expressão de genes condrogênicos por perda da morfologia

esférica original. As células passam a assumir um fenótipo fibroblastóide, com o aumento da expressão de colágeno tipo I e diminuição de colágeno tipo II, por exemplo (DUAN et al., 2015). No entanto, esse problema pode ser contornado com a utilização de meios condrogênicos disponíveis comercialmente ou fluido sinovial coletado, que conferem aos condrócitos todos os fatores necessários para manutenção da sua morfologia original (CALDWELL & WANG, 2015). Além de condrócitos primários, podem ser utilizadas linhagens condrocíticas imortalizadas humanas (ex: SW1353, C28/I8, OUMS27) ou murinas (ex: ATDC5, LTC-RCS) (GREEN et al., 2014).

2.8 MIGLUSTATO

O miglustato (Zavesca[®]) é um aminoaçúcar solúvel em água, utilizado no tratamento da forma moderada da doença de Gaucher e da doença de Niemann-Pick tipo C (European Medicines Agency – EMA, 2013). A doença de Gaucher é um distúrbio inato do metabolismo, caracterizado pela deficiência da enzima β -glicocerebrosidase, que catalisa a quebra dos glicocerebrosídeos em glicose e ceramida (BARTH et al., 2013). Tal deficiência, por sua vez, ocasiona a deposição desses glicolipídeos em diversos órgãos, como fígado, baço e medula óssea, trazendo também quadros neurodegenerativos que podem ser letais (GRABOWSKI, 2008).

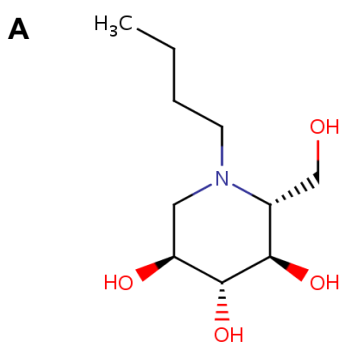
A doença de Niemann-Pick tipo C é resultado da mutação nos genes NPC1 (95% dos casos) e NPC2 (\approx 4%), que codificam proteínas de membrana envolvidas no tráfego intracelular de lipídeos (MAVRIDOU et al., 2014). Como resultado, ocorre o acúmulo dessas moléculas nos lisossomos perinucleares de muitos tecidos (ROSENBAUM et al., 2011).

Se tais doenças decorrem da deposição dos glicocerebrosídeos, o miglustato, por sua vez, age inibindo a enzima responsável por sua síntese – a ceramida glicosil-transferase. Essa enzima catalisa a primeira etapa de formação da maioria dos glicolipídeos de membrana (LYSENG-WILLIAMSON, 2014). Além da depleção dessas moléculas e redução do armazenamento anormal de lipídeos, o tratamento com miglustato regula a endocitose, reverte danos na membrana e protege contra o estresse oxidativo (LACHMANN et al., 2004; MAALOUF et al., 2011; RIBAS et al., 2012).

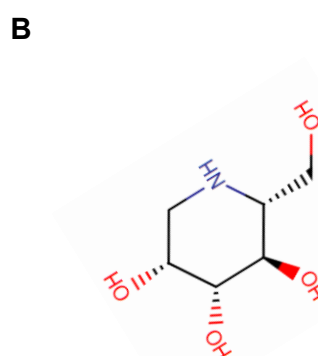
A natureza química do miglustato é semelhante à da deoxinojirimicina, que é um análogo da D-glicose, com a substituição do átomo de hidrogênio por um grupo butil (N-butil-deoxinojirimicina – NB-DNJ) (**figuras 9A e 9B**). As informações sobre a farmacocinética do miglustato são limitadas, mas sabe-se que seu perfil é dose-linear e tempo-

independente (EMA, 2013). Quando administrado oralmente, o fármaco sofre metabolismo de primeira passagem e é totalmente absorvido em cerca de 2 horas, sendo excretado primariamente pelos rins (EMA, 2013). O fármaco possui baixo grau de toxicidade em células normais, sendo a IC-50 para inibição da síntese de glicosilceramida equivalente a 20 μ M (PLATT et al., 1994). Essa dose não causa acúmulo de ceramida e não estimula a apoptose (BIEBERICH et al., 1999).

Figura 9 – A) Estrutura química do miglustato (N-butil-deoxinojirimicina). B) Estrutura química da deoxinojirimicina.



Fonte: <https://www.drugbank.ca>



Fonte: <https://www.drugbank.ca>

Para o tratamento da doença de Gaucher, é recomendada a utilização de uma cápsula de 100 mg 3x/dia; para os pacientes com a doença de Niemann-Pick tipo C, a recomendação é de duas cápsulas 3x/dia (EMA, 2013). Os efeitos colaterais do miglustato incluem tremores, reações gastrointestinais e trombocitopenia, mas esses podem ser facilmente evitados mudando-se o regime de dose (PINEDA & PEREZ-POYATO, 2013).

Muitos pacientes com a doença de Gaucher apresentam manifestações osteoarticulares, incluindo artrite asséptica e osteoartrite secundária (RESORLU et al., 2017). No entanto, o tratamento com o miglustato, ainda que por mecanismos desconhecidos, alivia as dores nas articulações (JAVIER & HACHULLA, 2007). Além disso, os aminoaçúcares são descritos como ótimos imunomoduladores, sendo capazes de regular processos inflamatórios das mais diversas características (HORNE et al., 2011; NASH et al., 2011). De fato, Dehecchi e colaboradores (2011) já evidenciaram que o miglustato é capaz inibir a expressão

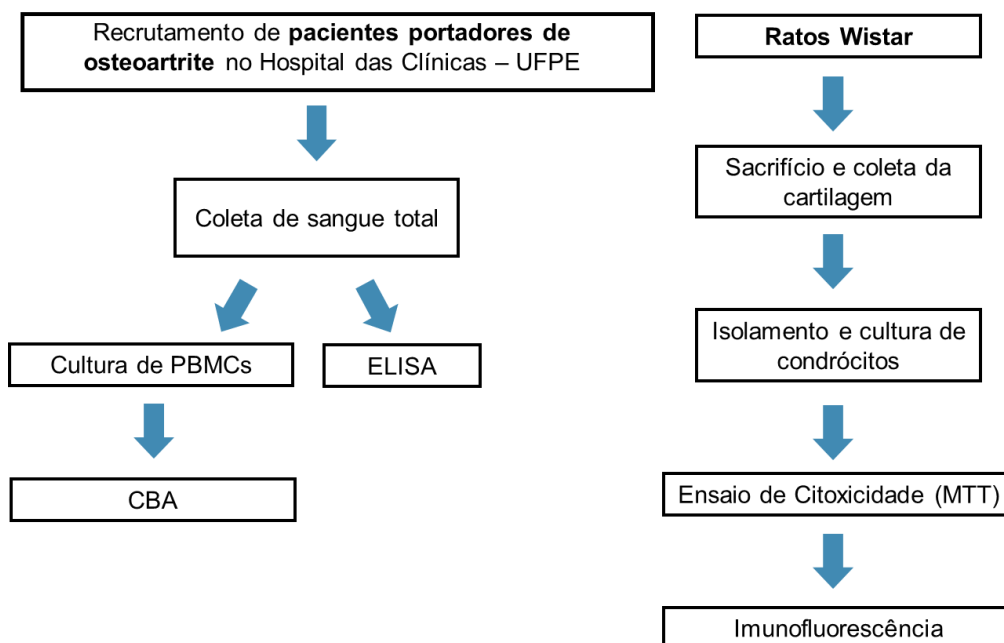
da IL-1 β , IL-6 e TNF em células derivadas do epitélio brônquico de pacientes com fibrose cística.

Um estudo publicado recentemente mostrou que o mecanismo de depleção de glicolipídeos em camundongos com *knockout* do gene GM3, um importante precursor dessas moléculas, inibiu a apoptose dos condrócitos e estimulou o reparo da cartilagem articular (MATSUOKA et al., 2017). O fármaco também já mostrou potencial de inibição da apoptose em estudos prévios que utilizaram células de Purkinje, por exemplo. (STEIN et al., 2012). Assim, a combinação dos efeitos do miglustato com a sua baixa toxicidade, no fornece uma nova óptica para a busca de abordagens terapêuticas mais eficazes na OA – uma doença que cursa com inflamação crônica e intensa apoptose dos condrócitos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Figura 10 – Detalhamento das etapas do estudo



Fonte: O autor (2018)

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a coleta de amostras de pacientes, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, CAAE: 58263116.5.0000.5208, número do parecer: 1.777.025 (ver **Anexo 1**)

Para a realização dos experimentos envolvendo os ratos Wistar, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), localizado no 1º andar do Centro de Biociências da UFPE, processo 0007/2017 (**Anexo 2**).

3.3 RECRUTAMENTO DE PACIENTES

Foram recrutados 78 pacientes, de ambos os sexos, atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, após concordância e assinatura do TCLE (**Apêndices A e B**). Os critérios de inclusão foram o 1) diagnóstico de OA, 2) idade acima de 40 anos; os de exclusão foram 1) não concordância com o TCLE, 2) ser portador de doenças autoimunes, infecções e neoplasias.

Um grupo controle, composto por 83 voluntários sadios, foi estabelecido para fins de comparação dos resultados. Todos eram maiores de 18 anos, de ambos os sexos, sem doenças de caráter inflamatório crônico, infeccioso ou neoplásico e sem uso de qualquer medicação. O consentimento foi registrado através de assinatura do TCLE.

3.4 MIGLUSTATO

O miglustato (Zavesca®) foi adquirido através da Cayman Chemical (USA) sob a forma de sólido de cristal, diluído em água Mili-Q e armazenado a -20°C, como recomenda o fabricante.

3.5 COLETA DE SANGUE TOTAL E OBTENÇÃO DO SORO

De cada paciente foram coletados 4 ml de sangue a vácuo em tubo a seco com gel separador, para obtenção do soro; 23 desses voluntários tiveram 15 ml do seu sangue coletados também em tubo contendo o anticoagulante heparina, para isolamento de PBMCs.

O soro foi obtido após centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos, aliquotado em microtubo para centrifugação (Eppendorf, GER) e armazenado a -80°C.

3.6 CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs)

As PBMCs foram isoladas por centrifugação com Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare, UK) e cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal e 200 U/mL de penicilina/estreptomicina, em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. As células foram plaqueadas e estimuladas por *phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA) (100 ng/ml) e ionomicina (10 µg/ml), sendo cultivadas (10⁶ células/1000 µl) por 24h em condições contendo a metilprednisolona na concentração de 100 µM e o miglustato nas de 10, 50 e 100 µM. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que o miglustato não reduz significativamente a viabilidade das PBMCs, em nenhuma das doses (SANTOS, 2017), assim, não se fez necessário a realização de teste de toxicidade. O sobrenadante da cultura foi coletado para dosagem das citocinas.

3.7 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

A quantificação de IL-16, IL-18, IL-22 e IL-31 no soro dos pacientes foi realizada por ELISA sanduíche (R&D Systems, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Os limites mínimos de detecção para IL-16 e IL-22 eram de 7.8125 pg/ml, enquanto que para a IL-18 e IL-31 eram 46.875 e 62.5 pg/ml, respectivamente.

3.8 CYTOMETRIC BEADS ARRAY (CBA)

As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram quantificadas no sobrenadante de cultura de PBMC pelo ensaio citométrico de esferas ordenadas (CBA), por meio do *Human Inflammatory Cytokine Kit* (Cat. No. 551811) (BD Biosciences), e aquisições no citômetro de fluxo Accuri™ C6 (BD Biosciences). A análise de quantificação por CBA foi realizada pelo BD™ FCAP Array Software v3.0, de acordo com as instruções do fabricante. Os limites mínimos de detecção para a IL-1 β , a IL-6 e o TNF estipulados pelo kit eram de 7.2, 2.5 e 3.7 pg/ml, respectivamente.

3.9 ISOLAMENTO E CULTURA DE CONDRÓCITOS

Os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e eutanasiados com injeção intracardiaca de Kcl (1 ml). Em seguida, foram realizadas a assepsia, tricotomia e incisão do joelho direito, para exposição da cartilagem articular e sua coleta com bisturi. Vale ressaltar que todos os procedimentos foram realizados sob condições estéreis.

As amostras de tecido cartilaginoso foram lavadas com PBS 1X e incubadas *overnight* em meio DMEM (Gibco®) contendo 3 mg/ml de collagenase tipo II (Gibco®) em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, os condrócitos soltos da matriz foram filtrados por uma malha de *nylon* de 70 μ m, que separa os resíduos de matriz extracelular. As células foram, posteriormente, lavadas com PBS 1X e ressuspensas em meio DMEM suplementado L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal e 200 U/ml de penicilina/estreptomicina. As células foram cultivadas a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. Para fins de caracterização das células, foi feita uma imunofluorescência do receptor de ancoragem ao ácido hialurônico CD44 e do colágeno tipo II.

O meio de cultura foi trocado de 2 em 2 dias e, após atingirem 100% de confluência, em um período de 10-12 dias, as células foram plaqueadas (10⁴ células/1000 μ l) para a realização dos ensaios propostos. Todos os poços, exceto o controle, foram estimulados com 1 ng/ml de IL-1 β . A metilprednisolona foi utilizada na dose de 100 μ M e o miglustato nas doses de 10, 50 e 100 μ M.

3.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT)

Foi utilizado o método colorimétrico baseado na conversão do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) em azul de formazan por enzimas

mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. Os condrócitos foram plaqueados (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços e, após 24h, o miglustato foi adicionado nas doses 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M. Após 72 horas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C, foram adicionados 20 μ l da solução de MTT, e a placa foi incubada por 3 horas na estufa. Em seguida, foram adicionados 130 μ l de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% para dissolução do precipitado. A densidade óptica (DO) foi lida em espectrofotômetro de placa a 570 nm. O cálculo de viabilidade celular foi feito através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Média DO composto} - \text{Média DO branco} \times 100}{\text{Média DO célula} - \text{Média DO branco}}$$

3.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os condrócitos foram plaqueados em lamínulas de 13 mm e, após 48 horas, fixados por metanol e acetona (1:1) por 10 minutos e lavados 3 vezes com PBS 1x; então foi adicionada uma solução de bloqueio contendo PBS/BSA 5% por 1 hora. Decorrido esse tempo, os poços foram lavados por mais 3 vezes e os anticorpos primários adicionados para incubação *overnight* a RT. No dia seguinte, após uma lavagem com PBS/BSA 1% , os anticorpos secundários foram incubados (separadamente) por 1 hora a RT. Em seguida, mais uma etapa de lavagem foi realizada, seguida da incubação pelo DAPI por 5 minutos a RT. Após mais uma lavagem, procedeu-se com a montagem das lâminas com Entellan® (Merck) e observação no microscópio invertido Eclipse Ts2 (Nikon®). Os anticorpos primários foram diluídos na seguinte proporção: CD44 (1:100), COL2A1 (1:150), BCL2 (1:200) e Caspase 3 (1:200). A diluição dos anticorpos secundários foi feita de 1:300

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para averiguar a normalidade das variáveis, utilizou-se o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Para comparar a expressão das citocinas no soro de pacientes com a expressão nos soros-controle, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A análise dos efeitos das diferentes doses do miglustato na cultura estimulada de PBMC foi pela por meio do teste pareado não paramétrico de Wilcoxon.

O coeficiente de Spearman foi aplicado para analisar as correlações entre os níveis séricos das citocinas e os parâmetros clínicos. Os resultados foram considerados

significativos quando $p \leq 0.05$. Todos os testes foram realizados pelo *software* GraphPad Prism[®] 6.01 (GraphPad Software).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES

Dos 78 participantes da pesquisa, 74 eram do sexo feminino e 4 do sexo masculino, sendo a média de idade entre eles igual a 59,1 anos (**tabela 3**). No grupo controle, 63 eram mulheres e 20 eram homens; a média de idade entre eles foi de 41,76 anos.

Mais da metade (51,2%) da população de estudo era acometida por OA de joelho e 28,2% por OA de mãos. Outros sítios incluíram o ombro (16%), a coluna (14%), os quadris (11,5%) e, em menor frequência, punhos (7,6%), cotovelos (7,6%) e tornozelos (5,1%) (**tabela 4**). Vale ressaltar que muitos pacientes apresentavam o acometimento simultâneo de duas ou mais articulações.

Tabela 3 – Idade e sexo da população de estudo

	Grupo controle (n = 83)	Pacientes (n = 78)
Idade		
(anos)	41,76 ± 12,87	59,1 ± 9,51
Média ± dp		
Sexo – n		
(%)	63 (75,9)	74 (94,8)
Feminino	20 (24,1)	4 (5,1)
Masculino		

Fonte: O autor (2018)

Uma parcela pequena dos pacientes era de fumantes inativos ou ativos (7,6% e 5,1%, respectivamente). Um total de 80,4% sofria de comorbidades associadas à OA, como hipertensão arterial sistêmica (51,2%), dislipidemias (21,7%), diabetes mellitus (20,5%), hipotireoidismo (11,5%), osteoporose (11,5%) e depressão (10,2%). Um total de 31 pacientes apresentavam alterações radiográficas no momento da coleta, incluindo osteófitos, redução do espaço articular e esclerose subcondral. Na avaliação clínica, 70,5% apresentaram sinais como crepitação, nódulos de Heberden/Bouchard e redução da amplitude dos movimentos, além de se queixarem do principal sintoma, que é a dor articular (78,2%).

Tabela 4 – Características clínicas dos pacientes

Características	Total de pacientes = 78
Articulação acometida – n (%)	
Coluna	11 (14,1)
Cotovelo	6 (7,6)
Joelho	40 (51,2)
Mão	22 (28,2)
Ombro	13 (16,6)
Punho	6 (7,6)
Quadril	9 (11,5)
Tornozelo	4 (5,1)
Avaliação Clínica – n (%)	
Edema	11 (14,1)
Dor	61 (78,2)
Sinais (crepitação, nódulos)	55 (70,5)
Alterações Radiográficas – n (%)	31 (39,7)
Comorbidades – n (%)	61 (80,4)
Dislipidemia	17 (21,7)
Diabetes mellitus	16 (20,5)
Fibromialgia	7 (8,9)
Hipertensão arterial sistêmica	40 (51,2)
Hipotireoidismo	9 (11,5)
Osteoporose	9 (11,5)
TAG/Depressão	8 (10,2)
Outras condições	23 (29,4)
Tabagismo – n (%)	

Nunca	28 (35,8)
Inativo	6 (7,6)
Ativo	4 (5,1)
Tratamento – n (%)	
Farmacológico	42 (53,8)
Analgésicos	28 (35,8)
AINES/glicocorticoides	3 (3,8)
DMOAD	26 (33,3)
Não-farmacológico	17 (21,7)

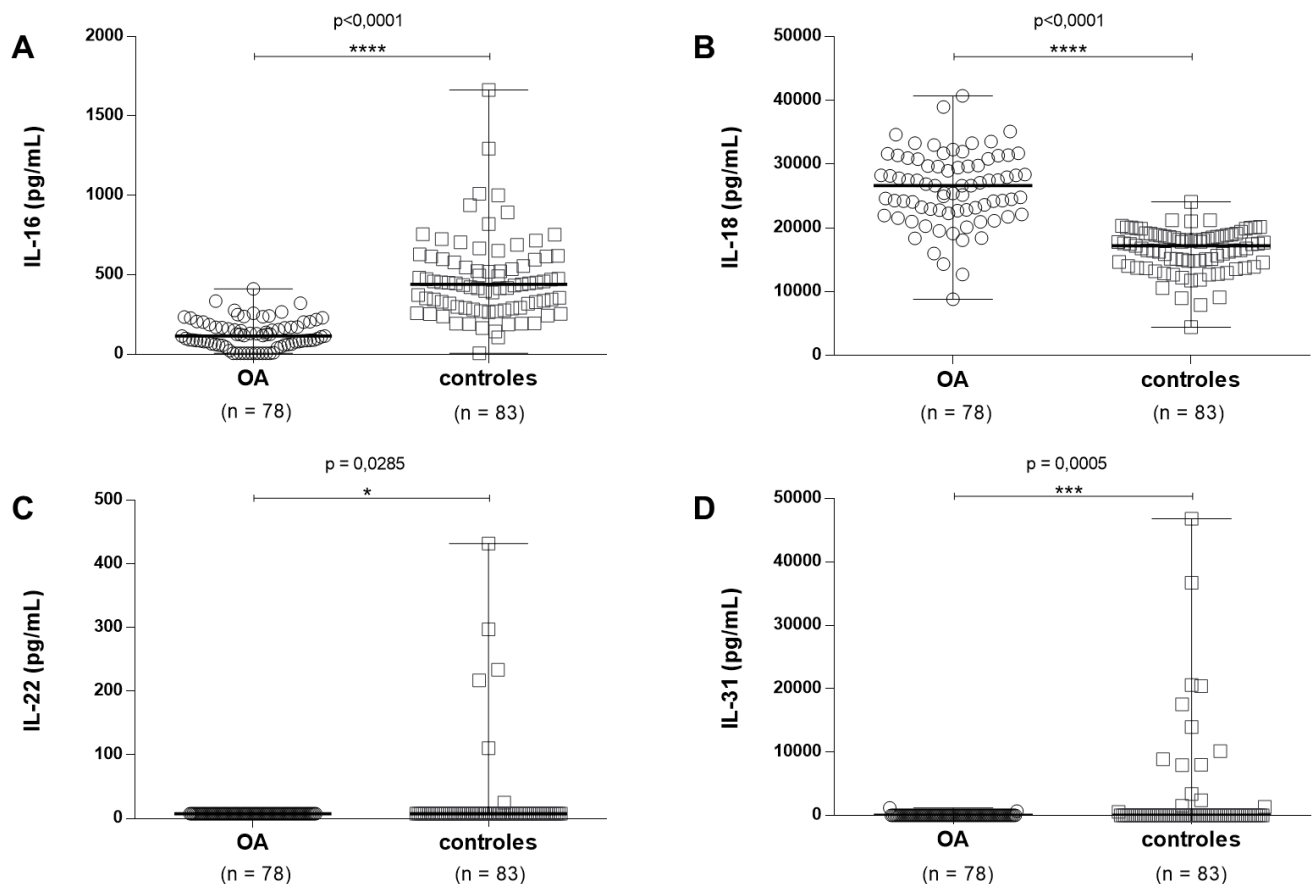
Fonte: O autor (2018)

Em relação ao tratamento, mais da metade (53,8%) utilizava algum fármaco, incluindo analgésicos (35,8%) e drogas modificadoras (33,3%). Curiosamente, apenas 3 pacientes faziam uso de AINES ou corticoides, regular ou irregularmente. Apenas 21,7% estava em associação com o tratamento não-farmacológico, fosse com fisioterapia ou praticando exercícios físicos.

4.2 NÍVEIS SÉRICOS DE IL-16, IL-18, IL-22 E IL-31

Através do ELISA foi possível observar que os níveis séricos da IL-18 estão significativamente elevados nos pacientes com osteoartrite, se comparados aos dos indivíduos saudáveis ($p < 0,0001$) (**figura 11B**). A IL-16 foi detectada em ambos os grupos, porém os voluntários sadios exibiram quantidades significativamente maiores ($p < 0,0001$) (**figura 11A**). Em relação à IL-22 e a IL-31, observamos que, nos pacientes, as citocinas se mostraram abaixo do limite de detecção do kit; no grupo controle controles, porém, alguns voluntários apresentaram níveis elevados ($p = 0,0285$ e $p = 0,0005$, respectivamente).

Figura 11 – Níveis séricos das citocinas em pacientes e indivíduos sadios. A) IL-16; $p < 0,0001$. B) IL-18; $p < 0,0001$. C) IL-22; $p = 0,0285$. D) IL-31; $p = 0,0005$



Fonte: O autor (2018)

4.3 CORRELAÇÃO COM OS PARÂMETROS CLÍNICOS

Os níveis de IL-16 e IL-18 não mostraram ter correlação com a idade dos pacientes ($p = 0,8458$; $r = 0,0226$ e $p = 0,074$; $r = 0,2057$, respectivamente). Ademais, os outros parâmetros clínicos, como a relação com a existência de comorbidades, quantidade de articulações acometidas, realização de tratamento e utilização de anti-inflamatórios, não mostraram relação com os níveis séricos de nenhuma das citocinas.

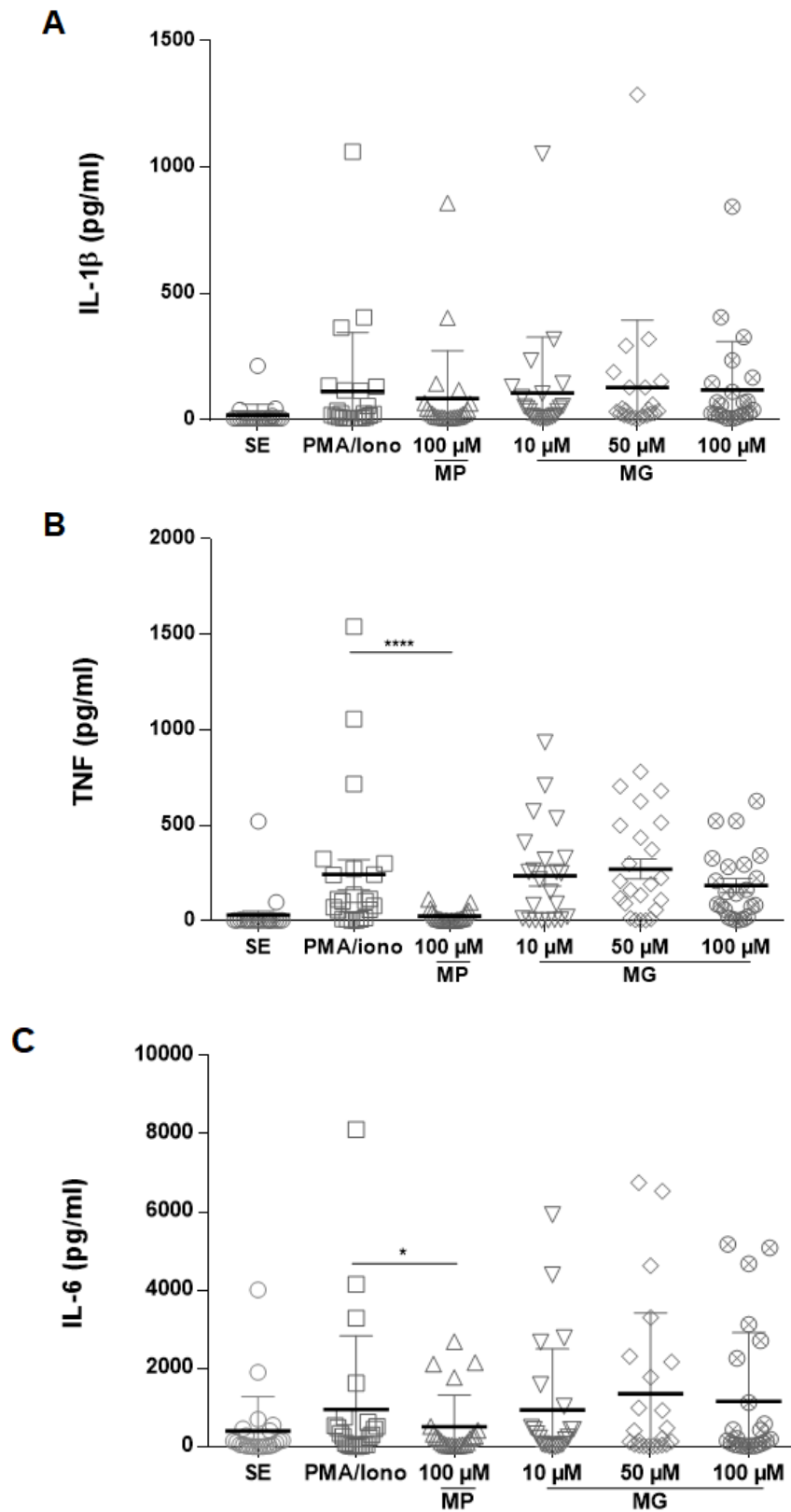
4.4 EFEITO DO MIGLUSTATO NA PRODUÇÃO DE IL-1B, IL-6 E TNF

Na análise dos sobrenadantes das culturas dessas células, o ensaio citométrico com *beads* mostrou que o fármaco não inibiu significativamente a produção dessas citocinas; em alguns pacientes, aliás, os níveis aumentaram (ver **figura 12**).

Na quantificação da IL-1 β , quando comparado à condição de estímulo com PMA/iono, o miglustato nas doses de 10, 50 e 100 μ M mostrou valores de $p = 0,8598$, $p = 0,1870$ e $p = 0,4060$, respectivamente. A metilprednisolona também não reduziu a quantificação da citocina de forma significativa ($p = 0,3408$).

Em relação ao TNF, não houve inibição significativa em nenhuma das concentrações ($p = 0,8736$, $p = 0,6327$ e $p = 0,8697$); o fármaco também não surtiu efeitos significativos na modulação da IL-6 ($p = 0,3931$, $p = 0,2988$ e $p = 0,9168$).

Figura 12 – Quantificação das citocinas no sobrenadante de cultura de PBMCs. A) IL-1 β . B) TNF. C) IL-6;
 SE = sem estímulo; MP = metilprednisolona; MG = miglustato

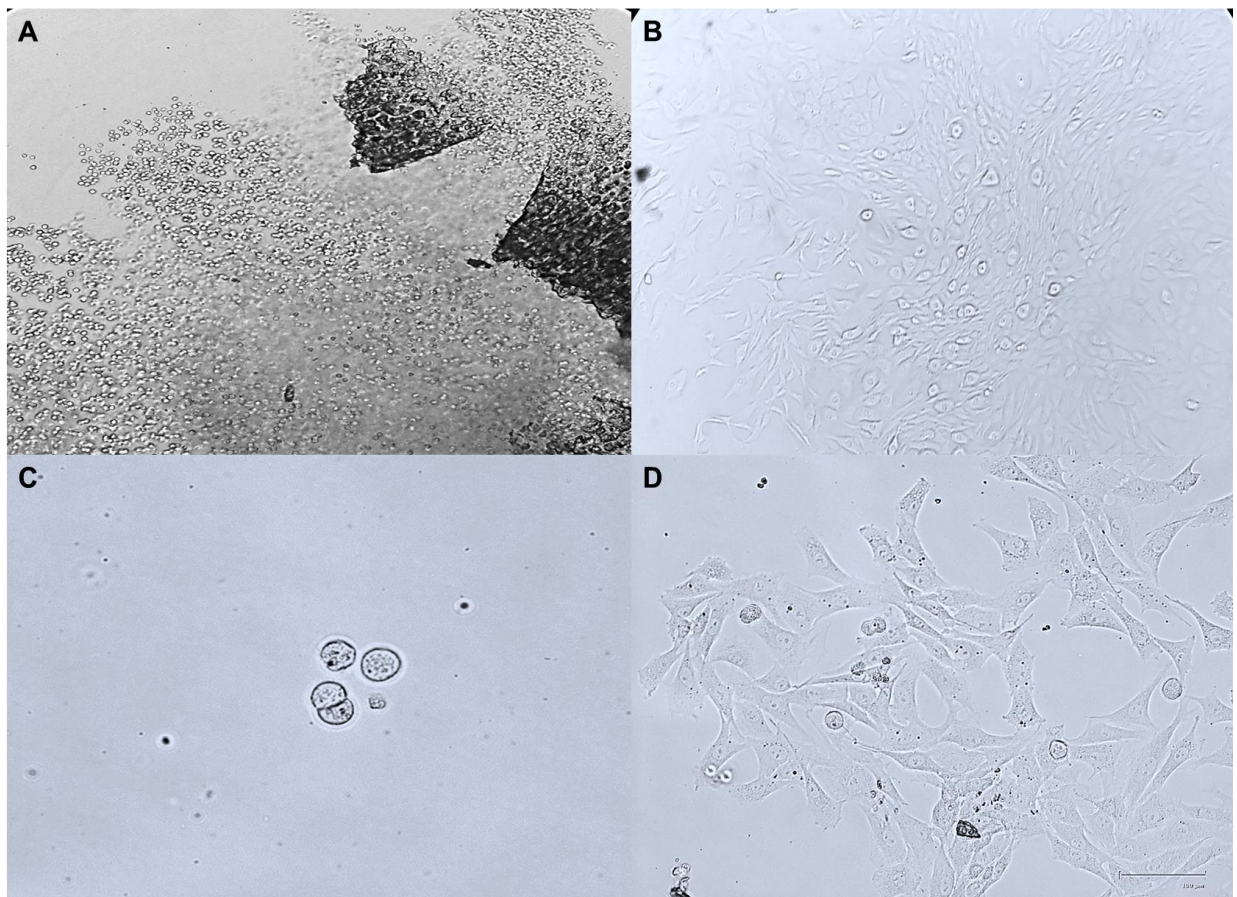


Fonte: O autor (2018)

4.5 ISOLAMENTO E CULTURA DE CONDRÓCITOS

À observação no microscópio, as células recém-isoladas exibiram morfologia esférico-ovalada, como mostra a **figura 13**. Dentro de 5-6 dias pós-isolamento, os condrócitos aderiram à garrafa de cultura e assumiram formatos que variavam entre o poligonal e o levemente alongado, com o citoplasma granular.

Figura 13 – Condrócitos primários. A) Fragmento de cartilagem incubado em meio contendo collagenase tipo II (10x); pode-se observar a liberação de centenas de células com a digestão da matriz. **B) Condrócitos em cultura (10x);** observar a morfologia variando entre poligonal e levemente fusiforme. **C) condrócitos não aderidos (40x).** **D) Condrócitos aderidos (40x)**



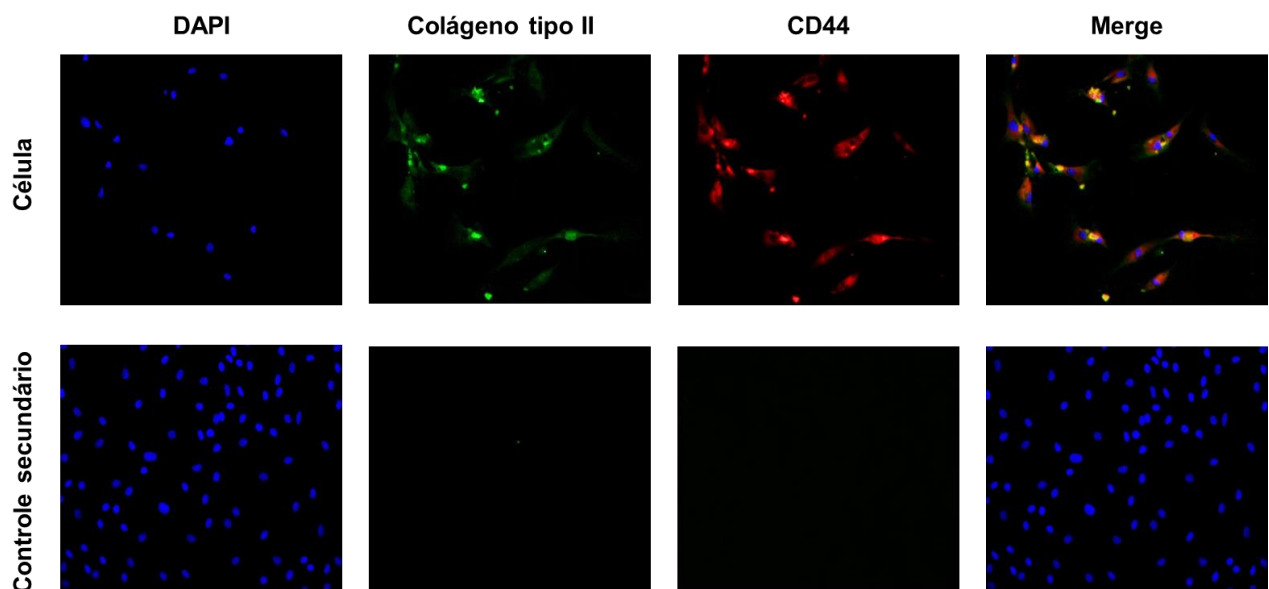
Fonte: O autor (2018)

Somente depois de um período de 10-12 dias, a cultura atingiu sua confluência máxima, então as células puderam ser tripsinizadas e utilizadas nos ensaios. Para garantir a segurança fenotípica das células, só foram utilizadas culturas até, no máximo, a 3º passagem.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS CONDRÓCITOS

A imunofluorescência do receptor que liga os condrócitos ao ácido hialurônico da matriz – o CD44 – e o colágeno tipo II, que é produzido unicamente pelas células da cartilagem, mostrou marcação para ambas, confirmando que as células isoladas eram condrócitos (**figura 14**). O controle secundário, que não é incubado com anticorpos primários, não mostrou fluorescência para as proteínas.

Figura 14 – Imunofluorescência de CD44 e colágeno tipo II. Observar a intensa marcação tanto do colágeno II (verde) quanto do CD44 (vermelho) nas células.



Fonte: O autor (2018)

4.7 ENSAIO DE CITOXICIDADE

O ensaio de viabilidade com o MTT, em três experimentos independentes, não mostrou toxicidade pronunciada do miglustato. Com a dose de 10 μM , a média da viabilidade foi de 91,41%, enquanto que nas doses de 50 μM e 100 μM , 79,64% e 85,59% das células se mantiveram viáveis, respectivamente (**tabela 5**).

Tabela 5 – Viabilidade dos condrócitos frente ao miglustato. Os resultados estão expressos na forma de porcentagem (%)

exp. = experimento independente; dp = desvio padrão

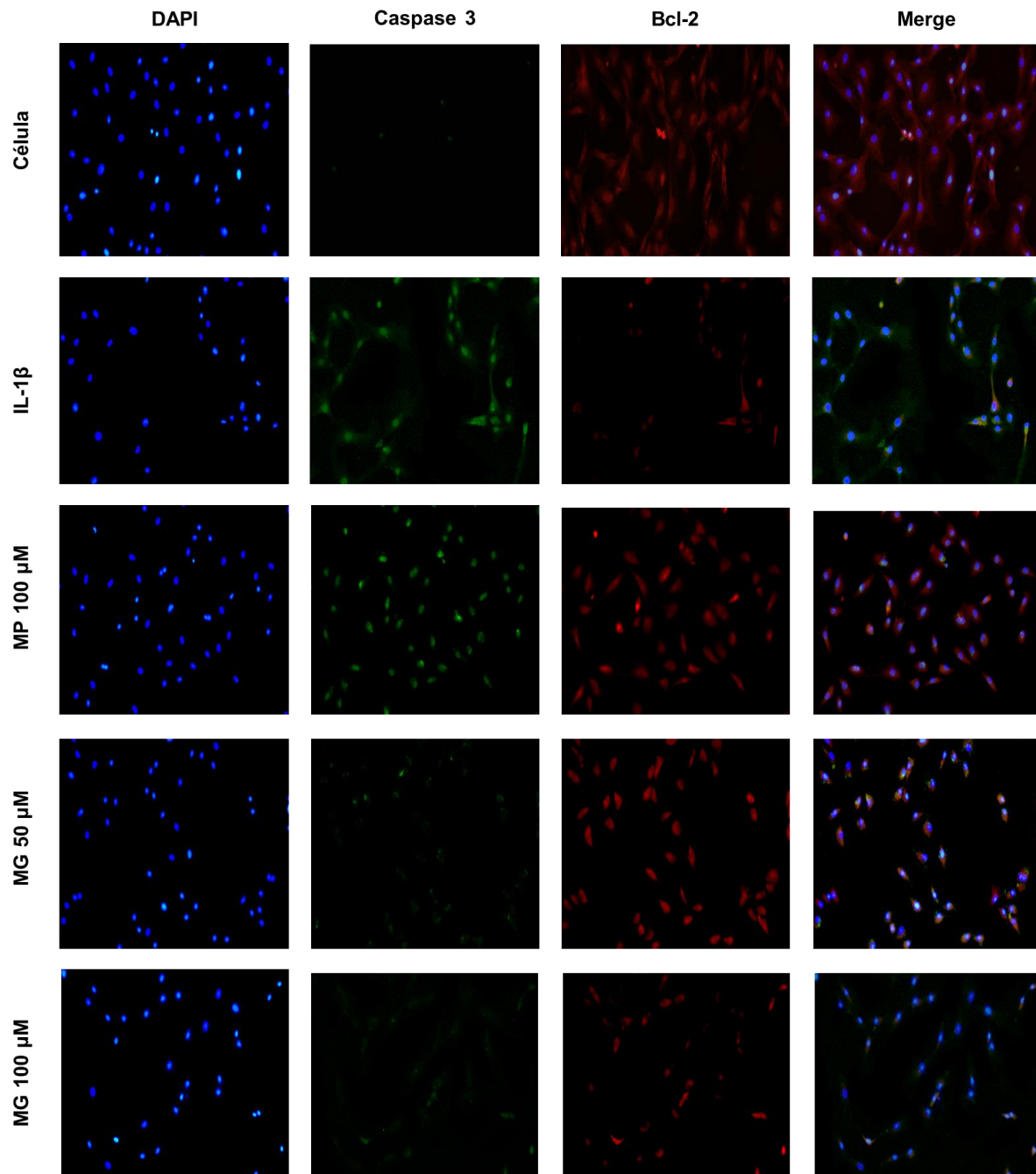
	Viabilidade (%)		
	10 μM	50 μM	100 μM
1° exp.	84,51	76,80	75,50
2° exp.	91,81	84,77	90,57
3° exp.	97,91	77,36	90,71
Média	91,41	79,64	85,59
dp	6,70	4,44	8,74

Fonte: O autor (2018)

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA DE CASPASE 3 E BCL-2

A imunofluorescência com a caspase 3 e o Bcl-2 mostrou que o estímulo com IL-1 β aumentou a atividade apoptótica dos condrócitos, como evidenciado pela intensa marcação citoplasmática e nuclear da caspase. Como mostra a **figura 15**, na dose de 50 μM do miglustato, a produção da caspase 3 foi menor até do que na condição com a metilprednisolona a 100 μM . Além disso, o fármaco aumentou expressivamente a marcação do Bcl-2 em níveis semelhantes aos da condição controle. A dose de 100 μM inibiu a marcação nuclear da caspase, mas não foi tão eficaz no aumento de Bcl-2 quanto a dose anterior. Os resultados foram confirmados com as células de dois animais diferentes.

Figura 15 – Imunofluorescência de caspase 3 e Bcl-2. A IL-1 β provocou a marcação intensa da caspase 3, que não foi observada na condição sem estímulo. O miglustato, na dose de 50 μ M, não só reduziu a marcação da caspase, como também aumentou a expressão de Bcl-2



Fonte: O autor (2018)

5 DISCUSSÃO

A osteoartrite é uma doença reumática, cuja patogênese está relacionada à degradação da cartilagem e apoptose dos condrócitos, e hoje sabe-se que esses eventos são mediados por agentes inflamatórios, como as interleucinas. No entanto, apesar dos avanços no estudo dos mecanismos de desenvolvimento da doença e da descoberta de possíveis alvos terapêuticos, nenhum deles foi, de fato, incorporado à prática clínica, e a terapêutica disponível atualmente ainda é paliativa, controversa e, muitas vezes, falha. Assim, há a necessidade de dar continuidade à busca por estratégias mais eficazes, somando esforços no combate da doença reumática mais comum ao redor do mundo.

A IL-16 é uma proteína com papel pleiotrópico (tanto pró quanto anti-inflamatório), que regula principalmente a ativação e quimiotaxia de células T (LUHESHI et al., 2009). Assim, apesar de estar envolvida em processos inflamatórios, a IL-16 exerce também um papel na homeostase, estimulando a síntese de IL-10, que é primariamente anti-inflamatória (RICHMOND et al., 2014). Isso justifica o fato dos níveis séricos desse mediador estarem elevados em alguns pacientes, mas significativamente maiores nos indivíduos saudáveis ($p < 0,0001$).

Os pacientes apresentaram níveis de IL-18 significativamente elevados no soro, se comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$), corroborando os achados de Wang e colaboradores (2014), que verificaram níveis elevados da citocina no plasma de pacientes com OA; eles também encontraram correlação positiva entre a IL-18 e a severidade da doença. Apesar de termos observado um padrão de aumento da concentração sérica da IL-18 em pacientes mais velhos, o que Tired e colaboradores (2005) confirmaram à nível genético, o resultado não foi significativo ($p = 0,00746$). Talvez a heterogeneidade da nossa população de estudo, a inconsistência de alguns dados clínicos e a presença de pacientes *outliers* tenham dificultado a realização de análises mais precisas.

A IL-22 é uma citocina da família IL-10, que tem função de proteção contra o dano e indução da regeneração (TRIVELLA et al., 2010). Seus níveis séricos elevados em indivíduos sadios ($p = 0,0285$) podem estar relacionados com tais mecanismos de proteção. Muitos estudos evidenciaram sua implicação na progressão de doenças, mas estima-se que seu papel patológico seja ativado apenas com a influência da IL-17 (RUTZ et al., 2013), que tem sido estudada na OA, mas que parece ter uma contribuição relativamente baixa sobre a degradação da cartilagem (HONORATI et al., 2002; LIU et al., 2015).

Este estudo foi o primeiro a avaliar as concentrações da IL-31 no soro de pacientes com osteoartrite e compará-las com indivíduos saudáveis. Todos os pacientes apresentaram níveis abaixo do limite de detecção, enquanto alguns voluntários do grupo controle exibiram grandes concentrações da citocina ($p = 0,0005$). Semelhantemente, Ashari e colaboradores (2014) encontraram níveis séricos elevados IL-31 em controles num estudo comparativo com pacientes com rinite alérgica, embora os resultados não tenham sido significativos ($p = 0,406$). A IL-31 pertence à família da IL-6, que desencadeia efeitos pró-inflamatórios em doenças como dermatite atópica, asma e artrite reumatoide (ZHANG et al., 2008), porém sua contribuição na OA ainda não é conhecida. Alguns estudos trabalhos indicam que seu papel nas espondiloartrites, por exemplo, seja de proteção contra danos estruturais (ROSINE et al., 2018). Vale ressaltar que o limite mínimo de detecção do kit ELISA utilizado no presente estudo é alto, o que pode ter mascarado os níveis da citocina no soro dos pacientes

Os aminoácidos são considerados excelentes imunomoduladores (HORNE et al., 2011). Zhang e colaboradores (2004) testaram um derivado da deoxinojirimicina em PBMCs de indivíduos saudáveis e evidenciaram que esse aminoácido inibiu significativamente a secreção de IL-4 e IFN- γ em concentrações inferiores a 100 μ M. Ademais, neste estudo, pela primeira vez o miglustato foi testado em PBMCs de pacientes com osteoartrite. O fármaco não inibiu significativamente nenhuma das citocinas sabidamente envolvidas na patogênese da OA, e em alguns pacientes gerou um efeito oposto, aumentando a concentração. A bem da verdade, nem a própria metilprednisolona inibiu significativamente a produção de IL-1 β – o que ressalta a problemática de resistência dos pacientes à terapêutica vigente (SAVVIDOU et al., 2018).

Dehecchi e outros (2008, 2011) evidenciaram que o miglustato é capaz de modular a produção de IL-1 β , TNF e IL-6. No entanto, é importante atentar para o fato de que esses estudos testaram o fármaco em culturas primárias tecido-específicas, como células epiteliais do trato respiratório. Assim, torna-se importante avaliar, futuramente, o efeito do fármaco diretamente nos condrócitos, sendo essa uma das limitações do presente estudo.

Em relação à padronização da cultura primária, o protocolo utilizado para isolar os condrócitos (GOSSET et al., 2008) preconizava a utilização de uma membrana de *nylon* de 40 μ m, duas pré-digestões de 45 minutos em meio DMEM contendo collagenase tipo II e uma centrifugação de 400 g por 10 minutos para um rendimento de 10^6 células. No entanto, durante a realização do isolamento, alguns aglomerados celulares ficavam retidos na membrana e a centrifugação não separava bem as células do meio. O problema foi contornado

com a substituição da membrana de 40 μm por uma maior, de 70 μm , e o aumento da velocidade para 2000 rpm (cerca de 800 g) por 3 minutos. O processo também foi encurtado para apenas uma incubação *overnight*, seguindo as diretrizes publicadas por Oseni e colaboradores (2013), com a obtenção do mesmo rendimento celular. Ao final, o isolamento foi confirmado pela marcação do receptor CD44 e do colágeno tipo II nos condrócitos.

Pan e seus colaboradores (2017) demonstraram que o estímulo com IL-1 β é capaz de mimetizar *in vitro* os eventos inflamatórios da OA e que a citocina é capaz de induzir a apoptose dos condrócitos. Não existem estudos prévios publicados sobre testes do miglustato em condrócitos, mas ficou evidente que o aminoaçúcar foi capaz de reduzir expressivamente a marcação da caspase 3 nas células, cuja ativação representa um evento crítico do processo apoptótico (MCILWAIN et al., 2013). O potencial anti-apoptótico do miglustato já foi evidenciado em células de Purkinje (STEIN et al., 2012), e os resultados mostraram que, além de aumentar o número de células viáveis, o fármaco também restaura a arquitetura celular natural.

O miglustato também causou aumento (maior que o da metilprednisolona) da marcação de Bcl-2 nas células, sendo esse um achado muito importante, já que essa proteína anti-apoptótica é uma das reguladoras do balanço contra os fatores pró-apoptóticos nos condrócitos (OSHIMA et al., 2008). Vale ressaltar que a apoptose dessas células é o segundo maior evento, senão o primeiro, da patogênese da osteoartrite (MUSUMECI et al., 2015)

O fato do miglustato não haver inibido a IL-1 β , TNF e IL-6 em PBMCs, mas ter reduzido fortemente a caspase 3 estimulada pela citocina em condrócitos, nos leva a crer que existam outros mecanismos envolvidos na relação inflamação-apoptose e que, a despeito do comprometimento da membrana sinovial e do osso subcondral, a cartilagem é realmente a peça-chave para estudar a doença.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- Os indivíduos que compuseram o grupo de pacientes apresentaram características clínicas muito diferentes entre si, porém é importante destacar que mais da metade possuía OA de joelhos e sintomas e sinais como dor e crepitação; a hipertensão arterial sistêmica foi a comorbidade mais prevalente (51,2%) e apenas 17 dos 78 indivíduos estava sob tratamento com associação não-farmacológica.
- A IL-18 está aumentada no soro dos pacientes com OA, podendo ser uma fonte de investigação na patogênese da doença; a IL-16 se mostrou em baixas quantidades, estando significativamente elevada no soro dos voluntários sadios; a IL-22 e a IL-31, por sua vez, não atingiram o limite mínimo de detecção dos respectivos kits nas amostras dos portadores da doença.
- O miglustato não é significativamente tóxico para os condrócitos de ratos Wistar.
- O fármaco não inibiu a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF em PBMCs, porém se faz necessária uma análise da ação do fármaco sobre os condrócitos para chegarmos a uma conclusão apurada;
- O miglustato mostrou potencial anti-apoptótico em condrócitos primários, diminuindo a caspase 3 induzida pela IL-1 β e aumentando a proteína anti-apoptótica Bcl-2, o que indica a diminuição da atividade apoptótica das células;

7 PERSPECTIVAS

- Quantificar os níveis de IL-1 β , TNF e IL-6 no sobrenadante de cultura de condrócitos;
- Realizar a citometria de fluxo com marcação de Anexina V e 7-AAD, a fim de verificar se o miglustato reduz o percentual de células mortas por apoptose;
- Avaliar, por imunofluorescência, se o miglustato reduz a expressão de outros marcadores inflamatórios (ex: NF- κ B, PAR-4) e do processo apoptótico (ex: caspase 8, Bax, BID)

REFERÊNCIAS

- AABOE, J; BLIDDAL, H; MESSIER, SP; ALKJAER, T; HENRIKSEN, M. Effects of an intensive weight loss program on knee joint loading in obese adults with knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, vol. 19:822–828, 2011.
- ABHISHEK, A.; DOHERTY, Michael. Diagnosis and Clinical Presentation of Osteoarthritis. **Rheum Dis Clin N Am**, vol. 39:45–66, 2013.
- ABHISHEK, A; DOHERTY, M. Disease diagnosis and clinical presentation. In: Henrotin Y, Hunter DJ, Kawaguchi H, editors. OARSI Online Primer. **OARSI**; 2011
- ALLEN, KD; COFFMAN, CJ; GOLIGHTLY, YM. Daily pain variations among patients with hand, hip, and knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, vol. 7(10):1275–82., 2009.
- ALTMAN, R.; E. ASCH; D. BLOCH; G. BOLE; D. BORENSTEIN; K. BRANDT; W. CHRISTY; T. D. COOKE; R. GREENWALD; M. HOCHBERG; D. HOWELL; D. KAPLAN; W. KOOPMAN; S. LONGLEY; H. MANKIN; D. J. McSHANE; T. MEDSGER; JR., R. MEENAN; W. MIKKELSEN, R. MQSKOWITZ; W. MURPHY; B. ROTHCHILD; M. SEGAL; L. SOKOLOFF; F. WOLFE. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, vol. 29(8), 1986.
- AMIN, S; NIU, J; GUERMAZI, A; GRIGORYAN, M; HUNTER, DJ; CLANCY, M; LAVALLEY, MP; GENANT, HK; FELSON, DT. Cigarette smoking and the risk for cartilage loss and knee pain in men with knee osteoarthritis. **Ann Rheum Dis.**, vol. 66(1):18-22, 2007.
- AMOAKO, Aday O.; PUJALTE, George Guntur A. Osteoarthritis in Young, Active, and Athletic Individuals. **Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders**, 7:27–32, 2014.
- ANAZETTI, Maristella Conte; MELO, Patrícia Silva. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
- ANDERSSON, Karin M E; CAVALLINI, Nicola Filluelo; HU, Dan; BRISSLERT, Mikael; Ron CIALIC; Hadi VALADI; Malin C ERLANDSSON; Sofia SILFVERSWÄRD; Rille PULLERITS; Vijay K KUCHROO; Howard L WEINER; Maria I BOKAREWA. Pathogenic Transdifferentiation of Th17 Cells Contribute to Perpetuation of Rheumatoid Arthritis during Anti-TNF Treatment. **Mol Med**, vol. 21: 536-543, 2015.

ANDRIANAKOS, Alexandros A; KONTELIS, Leonidas K; KARAMITSOS, Dimitrios G; ASLANIDIS, Spyros I; GEORGOUNTZOS, Athanasios I; KAZIOLAS, George O; PANTELIDOU, Kyriaki V; Elizabeth V Vafiadou; Petros C Dantis. Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. **The Journal of Rheumatology December**, 33 (12) 2507-2513, 2006.

ARESTI, Nick; KASSAM, Jamila; NICHOLAS, Nick; ACHAN, Pramod. Hip osteoarthritis. **BMJ**, 354:i3405, 2016.

ARTHRITIS RESEARCH UK, 2014. Disponível em: <<http://www.arthritisresearchuk.org>>. Acesso em: 22 abril 2017.

ASHARI, Noor Suryani Mohd; AMIN, Siti Noor Syuhada Mohd; HAMID, Wan Zuraida Wan Abdul; MUSA, Mustaffa; RAHMAN, Azriani Abdul; MOHAMAD, Irfan. Determination of interleukin 31 (IL-31) serum levels in allergic rhinitis patients. **International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine**, vol. 1, 69e72, 2014.

ASHBURN, TT; THOR, KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat Rev Drug Discov.**, vol. 3(8):673-83, 2004.

ATAIE-KACHOIE, Parvin; POURGHOLAMI, Mohammad H; RICHARDSON, Des R; MORRIS, David L. Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). **J Clin Pathol**, vol. 67:932-937, 2014.

ATTUR, Mukundan; BELITSKAYA-LÉVY, Ilana; OH, Cheongeun; KRASNOKUTSKY, Svetlana; GREENBERG, Jeffrey; SAMUELS, Jonathan; SMILES, Stephen; LEE, Sicy; PATEL, Jyoti; AL-MUSSAWIR, Hayf; MCDANIEL, Gary; KRAUS, Virginia Byers; ABRAMSON, Steven B. Increased IL-1 beta gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for progression of symptomatic knee osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, vol. 63(7): 1908-1917, 2011.

AYHAN Egemen; KESMEZACAR, Hayrettin, AKGUN, Isik. Intraarticular injections (corticosteroid, hyaluronic acid, platelet rich plasma) for the knee osteoarthritis. **World J Orthop**, 5(3): 351-361, 2014.

BALATO, G.; DI DONATO, S. L.; ASCIONE, T.; D'ADDONA, A.; SMERAGLIA; DI VICO, F.; G.; ROSA, D. Knee Septic Arthritis after Arthroscopy: Incidence, Risk Factors, Functional Outcome, and Infection Eradication Rate. **Joints**, 5:107-113., 2017.

- BARTH, Brian, M.; SHANMUGAVELANDY, Sriram S.; TACELOSKY, Diana M.; KESTER, Mark; MORAD, Samy A. F.; CABOT, Myles C. Gaucher's Disease and Cancer: a Sphingolipid Perspective. **Crit Rev Oncog.**, 18(3): 221–234, 2013.
- BASARAN, Sibel; GUZEL, Rengin; SEYDAOGLU, Gulsah; GULER-UYSAL, Fusun. Validity, reliability, and comparison of the WOMAC osteoarthritis index and Lequesne algofunctional index in Turkish patients with hip or knee osteoarthritis. **Clin Rheumatol**, 29:749–756, 2010.
- BAYNES, John. DOMINICZAK, Marek H. **Bioquímica Médica**. 4º edição, Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2015, pag. 383.
- BAZZANO, LA; HE, J; MUNTNER, P; VUPPUTURI, S; WHELTON, PK. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. **Ann Intern Med.**, vol. 138(11):891-7, 2003.
- BENELL, Kim L.; HINMAN, Rana S. A review of the clinical evidence for exercise in osteoarthritis of the hip and knee. **Journal of Science and Medicine in Sport**, vol. 14:4–9, 2011.
- BERENBAUM, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis Cartilage**, 21(1):16-21, 2013.
- BERMUDEZ, EA; RIFAI, N; BURING, JE; MANSON, JE; RIDKER, PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. **Am J Cardiol.**, vol. 89(9):1117-9, 2002.
- BERNAD-PINEDA, M.; HERAS-SOTOS, J. de las; GARCÉS-PUENTESC, M. V. Calidad de vida en pacientes con artrosis de rodilla y/o cadera. **Rev Esp Cir Ortop Traumatol.**, 58(5):283-289, 2014.
- BERNARD, Nicholas J. Repositioning verapamil—for Wnt of an OA treatment. **Nature Reviews Rheumatology**, 2014.
- BIEBERICH, E; FREISCHÜTZ, B; SUZUKI, M; YU, RK. Differential effects of glycolipid biosynthesis inhibitors on ceramide-induced cell death in neuroblastoma cells. **J Neurochem.**, 1040-1049, 1999.
- BIERMA-ZEINSTR, SM; OSTER, JD; BERNSEN, RM; VERHAAR, JA; GINAI, AZ; BOHNEN, AM. Joint space narrowing and relationship with symptoms and signs in adults consulting for hip pain in primary care. **J Rheumatol.**, 29:1713-8, 2002.

- BLANEY, DAVIDSON, EN; REMST, DF; VITTERS, EL; VAN BEUNINGEN, HM; BLOM, AB; GOUMANS, MJ; VAN DEN BERG, WB; VAN DER KRAAN, PM. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. **J Immunol.**, 182(12):7937-45, 2009.
- BLASIOLI, Dominick, J.; KAPLAN, David, L. The roles of catabolic factors in the development of osteoarthritis. **Tissue Engineering**, vol. 20, 2014.
- BLIDDAL, H.; LEEDS, A R; CHRISTENSEN, R. Osteoarthritis, obesity and weight loss: evidence, hypotheses and horizons – a scoping review. **Obes Rev.**, 15(7): 578–586, 2014.
- BOBACZ, Klaus. Pharmacologic treatment of hand-, knee and hip-osteoarthritis. **Wien Med Wochenschr**, 163:236–242, 2013.
- BORRELLI, Joseph. Chondrocyte Apoptosis and Posttraumatic Arthrosis. **J Orthop Trauma**, Volume 20, Number 10, November/December, 2006.
- BOS, SD; SLAGBOOM, PE; MEULENBELT, I. New insights into osteoarthritis: early developmental features of an ageing-related disease. **Curr Opin Rheumatol.**, vol. 20(5):553-9, 2008.
- BRADLEY, JR. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol.**, 214(2):149-60, 2008.
- BRAUN, Hillary J.; GOLD, Garry E. Diagnosis of Osteoarthritis: Imaging. **Bone**, vol. 51(2): 278–288., 2012.
- BRESNIHAN, B; FLANAGAN, AM. Synovium. In: Firestein GS, Budd RC, Harris EDJ, McInnes IB, Ruddy S, Sargent JS, editors. Kelley's Textbook of Rheumatology I. **Saunders Elsevier**, pp. 23–36, 2009.
- BRODY, Lori Thein. Knee Osteoarthritis: Clinical Connections to Articular Cartilage Structure and Function. **Physical Therapy in Sport**, 2014.
- CALDWELL, Kenneth L.; WANG, Jinxi. Cell-Based Articular Cartilage Repair: The Link between Development and Regeneration. **Osteoarthritis Cartilage**, 23(3): 351–362, 2015.
- CARAMÉS, B; TANIGUCHI, N; OTSUKI, S; BLANCO, FJ; LOTZ, M. Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related loss is linked with cell death and osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, 62(3):791-801, 2010.
- CARDOSO, Anabela; BRANCO, Jaime C.; SILVA, José António P.; CRUZ, Margarida; COSTA, Maria Manuela. **Regras de ouro em reumatologia**. Lisboa: DGS, 2005.

CARRIÓN, Mar; JUARRANZ, Yasmina; MARTÍNEZ, Carmen; GONZÁLEZ-ÁLVARO, Isidoro; PABLOS, José L.; GUTIÉRREZ-CANAS, Irene; GOMARIZ, Rosa P. IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Rheumatology**, vol. 52:2177-2186, 2013.

CARSWELL, E. A.; L. J. OLD; R. L. KASSEL; S. GREEN; N. FIORE B. WILLIAMSON. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, vol. 72, No. 9, pp. 3666-3670, 1975.

CEPEDA, MS; CAMARGO, F; ZEA, C; VALENCIA, L. Tramadol for osteoarthritis: a systematic review and metaanalysis. **J Rheumatol.**, vol. 34(3):543-55, 2007.

CHAIMOWICZ, Flávio. **Saúde do idoso**. 2ª edição, Belo Horizonte: NESCON UFMG, 2013

CHEN, Jiawei; SHIN, Vivian Y.; SIU, Man T.; HO, John C. W.; CHEUK, Isabella; KWONG, Ava. miR-199a-5p confers tumor-suppressive role in triple-negative breast cancer. **BMC Cancer**, vol. 16:887, 2016.

CHEN, Liv Weichien; LIU, Feng-Cheng; HUNG, Li-Feng; HUANG, Chuan-Yueh; LIEN, Shiu-Bii; LIN, Leou-Chyr; LAI, Jenn-Haung; HO, Ling-Jun. Chondroprotective Effects and Mechanisms of Dextromethorphan: Repurposing Antitussive Medication for Osteoarthritis Treatment. **Int. J. Mol. Sci.**, vol. 19, 825, 2018.

CHEN, Zhijun; YUE, Susan X; ZHOU, Guang; GREENFIELD, Edward M; MURAKAMI, Shunichi. ERK1 and ERK2 Regulate Chondrocyte Terminal Differentiation During Endochondral Bone Formation. **Journal of Bone and Mineral Research**, Vol. 30, No., pp 765–774, 2014.

CHENG, AW; BOLOGNESI, M; KRAUS, VB. DIO2 modifies inflammatory responses in chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, vol. 20(5):440-5, 2012.

CHEUNG, KS; HASHIMOTO, K; YAMADA, N; ROACH, HI. Expression of ADAMTS-4 by chondrocytes in the surface zone of human osteoarthritic cartilage is regulated by epigenetic DNA demethylation. **Rheumatol Int.**, 29:525e34, 2009.

CHILDS, Bennett G; BAKER, Darren J; KIRKLAND, James L; CAMPISI, Judith; DEURSEN, Jan M van. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? **EMBO Reports**, 15: 1139–1153, 2014.

CHIOLERO, A, FAEH, D; PACCAUD, F; CORNUZ, J. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. **Am J Clin Nutr.**, vol. 87(4):801-9, 2008.

CHONGA, Timothy; DONA, Darren W.; KAOA, Ming-Chih; WONGA, Dexter; MITRA, Raj. The value of physical examination in the diagnosis of hip osteoarthritis. **Journal of Back and Musculoskeletal Rehabilitation**, vol. 26:397–400, 2013.

CHOPRA, Anant; MURRAY Maria E.; BYFIELD, Fitzroy J.; MENDEZ, Melissa G. Augmentation of integrin-mediated mechanotransduction by hyaluronic acid. **Biomaterials**, vol. 35:71e82, 2014.

CHRISTIANSSEN, Blaine A.; BHATTI, Simrit.; GOUDARZI, Ramin.; EMAMI, Shahin Management of Osteoarthritis with Avocado/Soybean Unsaponifiables. **Cartilage**, Vol. 6(1) 30–44, 2015.

CIRILLO, DJ; WALLACE, RB; WU, L; YOOD, RA. Effect of hormone therapy on risk of hip and knee joint replacement in the Women's Health Initiative. **Arthritis Rheum.**, vol. 54(10):3194-204, 2006.

CONDE, Javier; Morena SCOTECE; Vanessa ABELLA; Ana LOIS; Verónica LÓPEZ; Tomás GARCÍA-CABALLERO; Jesús PINO; Juan Jesús GÓMEZ-REINO; Rodolfo GÓMEZ; Francisca LAGO; Oreste GUALILLO. IL-36 α : a novel cytokine involved in the catabolic and inflammatory response in chondrocytes. **Scientific Reports**, 5:16674, 2015.

CORNELISSEN, Christian; LÜSCHER-FIRZLAFF, Juliane; BARONB, Jens Malte; LÜSCHERA, Bernhard. Signaling by IL-31 and functional consequences. **European Journal of Cell Biology**, 91:552– 566, 2012.

COSTA, Bruno R. da; HARI, Roman; JÜNI, Peter. Intra-articular Corticosteroids for Osteoarthritis of the Knee. **JAMA**, Volume 316, Number 24, 2016.

COSTEDOAT-CHALUMEAU, Nathalie; Bertrand DUNOGUÉ; Nathalie MOREL; Véronique Le GUERN; Gaëlle GUETTROT-IMBERT. Hydroxychloroquine: A multifaceted treatment in lupus. **Presse Med.**, 43: e167–e180, 2014.

CUCCHIARINI, Magali; GIROLAMO, Laura de; FILARDO, Giuseppe; OLIVEIRA, J. Miguel; ORTH, Patrick; PAPE, Dietrich; REBOUL, Pascal. Basic science of osteoarthritis. **Journal of Experimental Orthopaedics**, vol. 3:22, 2016.

DA SILVA, MA; YAMADA, N; CLARKE, NM; ROACH, HI. Cellular and epigenetic features of a young healthy and a young osteoarthritic cartilage compared with aged control and OA cartilage. **J Orthop Res.**, vol. 27:593-601, 2009.

DAGHESTANI, H.N.; KRAUS, V.B. Inflammatory biomarkers in osteoarthritis.

Osteoarthritis and Cartilage, 23:1890e1896, 2015.

DATASUS. M15-M19, Artroses. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 06 abril 2017.

DAVIES, Peter SE; GRAHAM, Simon M.; MACFARLANE, Robert J.; LEONIDOU, Andreas; MANTALARIS, Athanasios; TSIDIRIS, Eleftherios. Disease-modifying osteoarthritis drugs: in vitro and in vivo data on the development of DMOADs under investigation. **Expert Opin. Investig. Drugs**, 2013.

DAVIES-TUCK, ML; WLUKA, AE; FORBES, A; WANG, Y; ENGLISH, DR; GILES, GG; CICUTTINI, F. Smoking is associated with increased cartilage loss and persistence of bone marrow lesions over 2 years in community-based individuals. **Rheumatology (Oxford)**, vol. 48(10):1227-31, 2009.

DECHECCHI, Maria Cristina; NICOLIS, Elena; MAZZI, Paola; CIOFFI, Federica; BEZZERRI, Valentino; LAMPRONTI, Ilaria; HUANG, Song; Ludovic WISZNIEWSKI; Roberto GAMBARI; Maria Teresa SCUPOLI; BERTON, Giorgio; CABRINI, Giulio. Modulators of Sphingolipid Metabolism Reduce Lung Inflammation. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, vol 45, pp 825–833, 2011.

DECHECCHI, Maria Cristina; NICOLIS, Elena; NOREZ, Caroline; BEZZERRI, Valentino; BORGATTI, Monica; MANCINI, Irene; RIZZOTTI, Paolo; RIBEIRO, Carla M.P.; GAMBARI, Roberto; BECQ, Frederic; CABRINI, Giulio. Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells. **Journal of Cystic Fibrosis**, vol. 7, 555–565, 2008.

DECKER, RS; KOYAMA, E; PACIFICI, M. Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. **Curr Osteoporos Rep**, vol. (6):407-14, 2015.

DEKKER, J; van DIJK, GM; VEENHOF C. Risk factors for functional decline in osteoarthritis of the hip or knee. **Curr Opin Rheumatol.**, 21(5):520-4, 2009.

DELIGNE, C.; S. CASULLI; A. PIGENET; C. BOUGAULT; L. CAMPILLO-GIMENEZ; G. NOURISSAT; F. BERENBAUM; C. ELBIM; X. HOUARD. Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 23, 1843e1852, 2015.

- DERRY, S; MOORE, RA; GASKELL, H; MCINTYRE, M; WIFFEN, PJ. Topical NSAIDs for acute musculoskeletal pain in adults. **Cochrane Database Syst Rev.**, vol. (6):CD007402, 2015.
- DING, YS; ZHANG, L; JAIN, RB; JAIN, N; WANG, RY; ASHLEY, DL. Levels of tobacco-specific nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from different tobacco varieties. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, vol. 17:3366-3371, 2008.
- DONELL, Simon. Arthroscopy in the management of knee osteoarthritis. **The Knee**, 21:351–352, 2014.
- DUAN, Li; MA, Bin; LIANG, Yujie; CHEN, Jielin; ZHU, Weimin; LI, Mingtao; WANG, Daping. Cytokine networking of chondrocyte dedifferentiation in vitro and its implications for cell-based cartilage therapy. **Am J Transl Res**, vol. 7(2):194-208, 2015.
- DUIVENVOORDEN, T; BROUWER, RW; van RAAIJ, TM; VERHAGEN, AP; VERHAAR JAN; BIERMA-ZEINSTRA, SMA. Braces and orthoses for treating osteoarthritis of the knee (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Issue 3. Art. No.: CD004020, 2015.
- DUNCAN, RC; HAY, EM; SAKLATVALA, J; CROFT, PR. Prevalence of radiographic osteoarthritis--it all depends on your point of view. **Rheumatology (Oxford)**, 45(6):757-60, 2006.
- ELMORE, Susan. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol.**, vol. 35(4): 495–516, 2007.
- ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. TNF-Alpha as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases, Ischemia-Reperfusion Injury and Trauma. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 16, 3152-3167, 2009.
- etiologia em revisão. **Fisioter. Mov.**, 23(4), p. 627-639, 2010
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Relatório Público Europeu de Avaliação. Disponível em < [http://ema.europa.eu/Find medicine/Human medicines/European public assessment reports](http://ema.europa.eu/Find%20medicine/Human%20medicines/European%20public%20assessment%20reports)>. Acesso em: 25 março 2018.
- EVANGELOU et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip. **Ann Rheum Dis.**, vol. 73:2130–2136, 2014.
- FAN, Ting-Jun; HAN, Li-Hui; CONG, Ri-Shan; LIANG, Jin. Caspase Family Proteases and Apoptosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, vol. 37(11): 719–727, 2005.

FELSON, DT; LAWRENCE, RC; DIEPPE, PA; HIRSCH, R, HELMICK, CG; JORDAN, JM; KINGTON, RS; LANE, NE; NEVITT, MC; ZHANG, Y; SOWERS, M; MCALINDON, T; SPECTOR, TD; POOLE, AR; YANOVSKI, SZ; ATESHIAN, G; SHARMA, L; BUCKWALTER, JA; BRANDT, KD; FRIES, JF. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. **Ann Intern Med.**, 133(8):635-46, 2000.

FELSON, DT; ZHANG, Y. Smoking and osteoarthritis: a review of the evidence and its implications. **Osteoarthritis Cartilage**, vol. (3):331-3, 2015

FERNANDES, Marcos Ivanovith. **Tradução e validação do questionário de qualidade de vida específico para osteoartrose WOMAC (*Western Ontario and McMaster Universities*) para a língua portuguesa**. São Paulo, 2002.

FERREIRA, Alyne Hevellen; GODOY, Priscilla Brandi Gomes; OLIVEIRA, Nara Rejane Cruz de; DINIZ, Roger Amorim Santos; DINIZ, Ricardo Edésio Amorim Santos; PADOVANI, Ricardo da Costa; SILVA, Regina Cláudia Barbosa da. Investigação da ansiedade, depressão e qualidade de vida em pacientes portadores de osteoartrite no joelho: um estudo comparativo. **Rev Bras Reumatol.**, vol. 5(5):434–438, 2015.

FIDELIX, TS; MACEDO, CR; MAXWELL, LJ; FERNANDES, Moça Trevisani V. Diacerein for osteoarthritis (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Issue 2. Art. No.: CD005117, 2014.

FINDLAY, David M.; ATKINS, Gerald J. Osteoblast-Chondrocyte Interactions in Osteoarthritis. **Curr Osteoporos Rep**, vol. 12:127–134, 2014.

FOGLEMAN, COREY D. Analgesics for Osteoarthritis. **American Family Physician**, vol. 87, 2013.

FONSECA, Rodrigo Jardim Monteiro da. **Estudo de reposicionamento de fármacos para doenças negligenciadas causadas por protozoários através da integração de bases de dados biológicas usando Web Semântica**. Rio de Janeiro, 2013. 176 f. Tese (Doutorado em Biologia Computacional e Sistemas). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

FOX, Alice J. Sophia; BEDI, Asheesh; RODEO, Scott A. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. **Orthopaedics**, vol. 1(6), 2009.

GAO, Yue; Shuyun LIU; Jingxiang HUANG; Weimin GUO; Jifeng CHEN; Li ZHANG; Bin ZHAO; Jiang PENG; Aiyuan WANG; Yu WANG; Wenjing XU; Shibi LU; Mei YUAN;

- Quanyi GUO. The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes. **Biomed Res Int.**, 2014: 648459, 2014.
- GARVER, Matthew J.; FOCHT, Brian C; DIALS, Justin; ROSE, Mark; LUCAS, Alexander R.; DEVOR, Steven T.; EMERY, Charles F.; HACKSHAW, Kevin V.; REJESKI, W. Jack. Weight Status and Differences in Mobility Performance, Pain Symptoms, and Physical Activity in Older, Knee Osteoarthritis Patients. **Arthritis**, Article ID 375909, 2014.
- GELLHORN, Alfred C., KATZ, Jeffrey N.; SURI, Pradeep. Osteoarthritis of the spine: the facet joints. **Nat. Rev. Rheumatol.**, 9, 216–224, 2013.
- GIBBONS, Christopher H.; WANG, Ningshan; FREEMAN, Roy. Capsaicin Induces Degeneration of Cutaneous Autonomic Nerve Fibers. **American Neurological Association**, 2010.
- GILL, Tiffany K.; HILL, Catherine L. Smoking and osteoarthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, vol. 16: 766–767, 2013.
- GINCKEL, Van A; BENNELL, KL; CAMPBELL, PK; WRIGLEY, TV; HUNTER, DJ; HINMAN, RS. Location of knee pain in medial knee osteoarthritis: patterns and associations with self-reported clinical symptoms. **Osteoarthritis Cartilage**, 24(7):1135-42, 2016.
- GOLDRING, Mary B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. **Ther Adv Musculoskel Dis.**, 4(4) 269–285, 2012.
- GOLDRING, MARY B.; GOLDRING, STEVEN R. Osteoarthritis. **J. Cell. Physiol.** 213: 626–634, 2007.
- GONZAGA, Daniel Vinícius Barbosa; VIEIRA, Francisco de Oliveira. **Interleucina – 1: Revisão de literatura das funções biológicas dos membros da família IL – 1**. Minas Gerais, 2013.
- GOSSET, Marjolaine; BERENBAUM, Francis; THIRION, Sylvie; JACQUES, Claire. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. **Nature Protocols**, vol. 3(8), 2008.
- GOUDARZI, Ramin; REID, Allison; MCDUGALL, Jason J. Evaluation of the novel avocado/soybean unsaponifiable Arthrocen to alter joint pain and inflammation in a rat model of osteoarthritis. **PLOS One**, 2015.
- GRABOWSKI, Gregory A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher’s disease. **Lancet**, 372: 1263–71, 2008

- GRAMMER, C.; LIPSKY, Peter E. Drug Repositioning Strategies for the Identification of Novel Therapies for Rheumatic Autoimmune Inflammatory Diseases. **Rheum Dis Clin N Am**, 3:467–480, 2017.
- GREEN, J.A.; DAVIDSON, R.K.; Gardner, S.; OTERO, M.; GOLDRING, M.B.; CASSIDY A.; BAOY, Y.; CLAR I.M. Identifying diet-derived chondroprotective compounds in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 22,S57–S489, 2014.
- GRENIER, Stephanie; BHARGAVA, Madhu M.; TORZILLI, Peter A. An in vitro model for the pathological degradation of articular cartilage in osteoarthritis. **Journal of Biomechanics**, vol. 47:645–652, 2014.
- GULLAHORN, L; LIPPIELLO, L; KARPMAN, R. Smoking and osteoarthritis: differential effect of nicotine on human chondrocyte glycosaminoglycan and collagen synthesis. **Osteoarthritis Cartilage**, vol. 13(10):942-3, 2005.
- GUPTA, Yogendra; MAHARA, Deepak; LAMICHHANE, Arjun. McMurray’s Test and Joint Line Tenderness for Medial Meniscus Tear: Are They Accurate? **Ethiop J Health Sci.**, vol. 26, 2016.
- HANNA, FS; WLUKA, AE; BELL, RJ; DAVIS, SR; CICUTTINI, FM. Osteoarthritis and the postmenopausal woman: Epidemiological, magnetic resonance imaging, and radiological findings. **Semin Arthritis Rheum.**, vol. 34(3):631-6, 2004.
- HASAN, Manal; SHUCKETT, Rhonda. Clinical features and pathogenetic mechanisms of osteoarthritis of the hip and knee. **BC Medical Journal**, vol. 52(8), 2010.
- HAYASHI, D.; ROEMER, F.W.; GUERMAZI, A. Imaging for osteoarthritis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, vol. 59:161–169, 2016.
- HENROTIN, Y.; PESESSE, L.; SANCHEZ, C.. Subchondral bone and osteoarthritis: biological and cellular aspects. **Osteoporos Int.**, vol. 23 (Suppl 8):S847–S851, 2012.
- HINTERHOLZ, Everton Luís; MUHLEN, Carlos Alberto Von. Osteoartrose. **Revista Brasileira de Medicina**, 2003.
- HOAGLUND, Franklin T. Primary Osteoarthritis of the Hip: A Genetic Disease Caused by European Genetic Variants. **J Bone Joint Surg Am.**, 95:463-8, 2013.

- HONORATI, M. C.; BOVARA, M.; CATTINI, L.; PIACENTINI, A.; FACCHINI, A. Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 10, 799–807, 2002.
- HOSHIYAMA, Yoshiaki; OTSUKI, Shuhei; Shuhei ODA; Yoshitaka KUROKAWA; Mikio NAKAJIMA; Tsuyoshi JOTOKU; Ryuichi TAMURA; Yoshinori OKAMOTO; Martin K. LOTZ; Masashi Neo. Expression Pattern and Role of Chondrocyte Clusters in Osteoarthritic Human Knee Cartilage. **J Orthop Res.**, 33(4): 548–555, 2015.
- HRNACK, Scott A.; BARBER, F. Alan. Managing the Pain of Knee Osteoarthritis. **The Physician and Sports Medicine**, Volume 42, Issue 3, 2014.
- HUANG, Yihui; ZHOU, Jun; HAKAMIVALA, Amirhossein; WU, Jinglei; HONG, Yi; BORRELLI, Joseph; TANG, Liping. An optical probe for detecting chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. **Scientific Reports**, 7: 10906, 2017.
- HUI, Michelle; DOHERTY, Michael; ZHANG, Weiya. Does smoking protect against osteoarthritis? Meta-analysis of observational studies. **Ann Rheum Dis.**, vol. 70:1231–1237, 2011.
- HULIN-CURTIS, S. L.; BIDWELL, J. L.; PERRY, M. J. Evaluation of IL18 and IL18R1 polymorphisms: genetic susceptibility to knee osteoarthritis. **International Journal of Immunogenetics**, vol. 39, 106–109, 2012.
- HUNTER, D J; G H Lo; D GALE; A J GRAINGER; A GUERMAZI; P G CONAGHAN. The reliability of a new scoring system for knee osteoarthritis MRI and the validity of bone marrow lesion assessment: BLOKS (Boston–Leeds Osteoarthritis Knee Score). **Ann Rheum Dis**, 67:206–211, 2007.
- HUNTER, David J. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee. **N Engl J Med**, 372:1040-7, 2015.
- HUNTER, DJ; FELSON, DT. Osteoarthritis. **BMJ**, 332(7542):639-42, 2006.
- HUSSAIN, Monira; WANG, Y; CICUTTINI, FM; SIMPSON, JA; GILES, GG; GRAVES, S; WLUKA, AE. Incidence of total knee and hip replacement for osteoarthritis in relation to the metabolic syndrome and its components: a prospective cohort study. **Semin Arthritis Rheum.**, vol. 43(4):429-36, 2014.
- HWANG, Hyun S.; KIM, Hyun, A. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis. **Int J Mol. Sci.**, 16, 26035–26054, 2015.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Projeção da População. Disponível em: <<http://ww2.ibge.gov.br>> Acesso em: 06 abril 2017.

JAVIER, RM; HACHULLA, E. Osteoarticular manifestations of Gaucher disease in adults: pathophysiology and treatment. **Presse Med.**, 36:1971-84, 2007.

JEROSCH, Jörg. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. **Int J Rheumatol.**, 2011.

JOHANNSEN, A; SUSIN, C; GUSTAFSSON, A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. **Periodontol** 2000, vol. 64(1):111-26, 2014.

JOHNSON, Craig I.; ARGYLE, David J.; CLEMENTS, Dylan N. In vitro models for the study of osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, vol. 209:40–49, 2016.

JOHNSON, Victoria L.; HUNTER, David J. The epidemiology of osteoarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, 28:5–15, 2014.

JÓZWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Pol Pharm.**, 71(1):11-23, 2014.

JÚNIOR, Hélio Galindo. **Produção de fator de necrose tumoral (TNF) em hemoculturas humanas induzida por agonistas de TLR2 (toll-like receptor 2): modulação pelo fator ativador de plaquetas (PAF)**. Goiânia, 2008.

KALICHMAN, Leonid; LI, Ling; KIM, David H.; GUERMAZI, Ali; BERKIN, Valery; O'DONNELL, Christopher J.; HOFFMANN, Udo; COLE, Rob; HUNTER, David J. Facet Joint Osteoarthritis and Low Back Pain in the Community-Based Population. **SPINE**, vol. 33(23), pp 2560–2565, 2008.

KAPOOR, Mohit; MARTEL-PELLETIER, Johanne; LAJEUNESSE, Daniel; PELLETIER, Jean-Pierre; FAHMI, Hassan. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.** 7, 33–42, 2011.

KARSDAL, M. A.; MICHAELIS, M.; LADEL, C.; SIEBUHR, A. S.; BIHLET, A. R.; ANDERSEN, J. R. GUEHRING, H.; CHRISTIANSEN, C.; BAY-JENSEN, A. C. KRAUS, V. B. Disease-modifying treatments for osteoarthritis (DMOADs) of the knee and hip: lessons learned from failures and opportunities for the future. **Osteoarthritis and Cartilage**, 24:2013-2021, 2016.

KATZ, Jeffrey N.; BROWNLEE, Sarah A.; JONES, Morgan H. The role of arthroscopy in the management of knee osteoarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, 28:143–156, 2014.

KELLGREN, J. H.; MOORE, R. Generalized osteoarthritis and Heberden's nodes. **British Medical Journal**, 1952;

KELWICK, Richard; DESANLIS, Ines; WHEELER, Grant N; EDWARDS, Dylan R. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. **Genome Biology**, vol. 16:113, 2015.

KIM, J; XU, M; XO, R; MATES, A; WILSON, GL; PEARSALL, AW 4th; GRISHKO, V. Mitochondrial DNA damage is involved in apoptosis caused by pro-inflammatory cytokines in human OA chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, 18(3):424-32., 2010

KINGSBURY, SR; THARMANATHAN, P; KEDING, A; RONALDSON, SJ; GRAINGER, A; WAKEFIELD, RJ; ARUNDEL, C; BIRRELL; F , DOHERTY, M , VINCENT, T; WATT, FE; DZIEDZIC, K; O' NEILL, TW; ARDEN, NK; SCOTT, DL; DICKSON, J; GARROOD, T; GREEN, M; MENON, A; SHEERAN, T; TORGERSON, D; CONAGHAN, PG. Hydroxychloroquine Effectiveness in Reducing Symptoms of Hand Osteoarthritis: A Randomized Trial. **Ann Intern Med.**, 168(6):385-395, 2018.

KOPPIKAR, Soumya J; KULKARNI, Priya G; INGALE, Dhanashri R; SHINDE, Dattatray; NarendraKumar WAGH; DESHPANDE, Shantanu; MOGHE, Alpana S; RANJEKAR, Prabhakar K; HARSULKAR, Abhay M. Inflammatory response of cultured rat synoviocytes challenged with synovial fluid from osteoarthritis patients correlates with their radiographic grading: a pilot study. **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal**, vol. 51:843–850, 2015.

KRAAN, P.M. van der; BERG, W.B. van den. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 20:223e232, 2012.

KUMAR, Amit; ARSHAD, Md; SINGH, Ajai; JAFRI, Asif; ALI, Sabir; Manish; YADAV, SWAROOP, Suchit. Role of Interleukin-I Super Family in Progression of Osteoarthritis. **Journal of Ecophysiology and Occupational Health**, Vol 17(1&2), 2017.

L'ESCALOPIER, Nicolas de; ANRACT, Philippe; BIAU, David. Surgical treatments for osteoarthritis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, 59, 227–233, 2016.

L'HERMETTE, M; POLLE, G; TOURNY-CHOLLET, C; DUJARDIN, F. Hip passive range of motion and frequency of radiographic hip osteoarthritis in former elite handball players. **Br J Sports Med**, vol. 40:45–49, 2006.

LAADHAR, L.; ZITOUNI, M.; KALLE-SELLAMI, M.; MAHJOUB, M.; SELLAMI, S.; MAKNI, S. Physiopathologie de l'arthrose. Du cartilage normal au cartilage arthrosique: facteurs de prédisposition et mécanismes inflammatoires. **La Revue de médecine interne.**, 28 531–536, 2007.

LACHMANN, Robin H.; VRUCHTE, Danielle; LLOYD-EVANS, Emyr; REIKENSMEYER, Gabriele; SILENCE, Daniel J.; FERNANDEZ-GUILLEN, Luisa; DWEK, Raymond A.; BUTTERS, Terry D.; COX, Timothy M.; PLATT, Frances M. Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann–Pick disease type C. **Neurobiology of Disease**, 16:654– 658, 2004.

LANE, N.E.; BRANDT, K.; HAWKER, G.; PEEVA, E.; SCHREYER, E.; TSUIJ, W.; HOCHBERG, M.C. OARSI-FDA initiative: defining the disease state of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 19(5): 478-482, 2011.

LANGEDIJK, Joris; MANTEL-TEEUWISSE, Aukje K.; SLIJKERMAN, Diederick S.; SCHUTJENS, Marie-Hélène D.B. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. **Drug Discovery Today**, 2015.

LEAL, V. de O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 419, p. 87-94, 2013.

LEE, Soojung; NEMEÑO, Judee Grace E., LEE, Jeong Ik. Repositioning Bevacizumab: A Promising Therapeutic Strategy for Cartilage Regeneration. **Tissue Engineering: Part B**, vol. 22(5), 2016.

LEE, Weiching; Liesbeth RUIJGROK; Bianca Boxma-de KLERK; Marc R. KOK; Margreet KLOPPENBURG; Andreas GERARDS; Margriet HUISMAN; Mieke HAZES; Peter de SONNAVILLE; Bart GRILLET; Angelique WEEL; Natalja BASOSKI. Efficacy of hydroxychloroquine in hand osteoarthritis: a randomized, double blind, placebo controlled trial. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, 2017.

LEUNG, Y.-Y.; ANG, L.-W.; THUMBOO, J.; WANG, R.; YUAN, J.-M.; KOH, W.-P.. Cigarette smoking and risk of total knee replacement for severe osteoarthritis among Chinese

in Singapore e the Singapore Chinese health study. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 22:764e770, 2014.

LI, Guangyi; YIN, Jimin; GAO, Junjie; CHENG, Tak S; PAVLOS, Nathan J; ZHANG, Changqing; ZHENG, Ming H. Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. **Arthritis Research & Therapy**, vol. 15:223, 2013.

LI, N.-G.; Z.-H. SHI; Y.-P. TANG; Z.-J. WANG; S.-L. SONG; L.-H. QIAN; D.-W. QIAN; A. DUAN. New Hope for the Treatment of Osteoarthritis Through Selective Inhibition of MMP-13. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 18, 977-1001, 2011.

LITWIC, Anna; EDWARDS, Mark; DENNISON, Elaine; COOPER, Cyrus. Epidemiology and Burden of Osteoarthritis. **Br Med Bull.**, 105: 185–199, 2013.

LIU, Yingsong; PENG, Hao; MENG, Zhao; WEI, Mingzhu. Correlation of IL-17 Level in Synovia and Severity of Knee Osteoarthritis. **Med Sci Monit**, vol. 21: 1732-1736, 2015.

LIU, Zhibao; MA, Li; QIU, Shenqiang; JIA, Tanghong. Genetic polymorphisms of interleukin-16 are associated with susceptibility to primary knee osteoarthritis. **Int J Clin Exp Med**, 8(1):1401-1405, 2015.

LIVSHITS, Gregory; ZHAI, Guangju; HART, Deborah J.; KATO, Bernet S.; WANG, Huizhong; WILLIAMS, Frances M. K.; SPECTOR, Tim D. Interleukin-6 Is a Significant Predictor of Radiographic Knee Osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, Vol. 60, No. 7, pp 2037–2045, 2009.

LO, Marvin Y.; KIM, Hubert T. Chondrocyte apoptosis induced by collagen degradation: inhibition by caspase inhibitors and IGF-1. **Journal of Orthopaedic Research**, vol. 22:140—144, 2004.

LOESER, RF. Integrins and chondrocyte-matrix interactions in articular cartilage. **Matrix Biol**, 39:11–16, 2014.

LOESER, Richard F. Aging and Osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol.**, vol. 23(5): 492–496, 2011

LOTZ, Martin K.; OTSUKI, Shuhei; GROGAN, Shawn P.; SAH, Robert; TERKELTAUB, Robert; D’LIMA, Darryl. Cartilage cell clusters. **Arthritis Rheum.**, 62(8): 2206–2218, 2010.

LUHESHI, N. M.; ROTHWELL, N. J.; BROUGH, D. Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: implications for anti-interleukin-1 therapy. **British Journal of Pharmacology**, vol. 157, 1318–1329, 2009.

LUO, Shi-Xing; Shan Li; Xue-Hui ZHANG; Jun-Jing ZHANG; Guang-Hua LONG; Gui- Fu DONG; Wei SU; Yan DENG; Yanqiong LIU; Jin-Min ZHAO; Xue QIN. Genetic Polymorphisms of Interleukin-16 and Risk of Knee Osteoarthritis. **PLoS ONE**, 10(5): e0123442, 2015

LYSENG-WILLIAMSON, Katherine A. Miglustat: A Review of Its Use in Niemann-Pick Disease Type C. **Drugs**, vol. 74:61–74, 2014.

MAALOUF, K.; DAS, AM.; NAIM, HY. M.; Niemann-Pick type C: restoration of lipid rafts and other biochemical anomalies by N-butyl-deoxinojirimycin. **J Inherit Metab Dis.**, 34 (Suppl 3):193, 2011

MABEY, Thomas, HONSAWEK, Sittisak. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. **World J Orthop.**, 18; 6(1): 95-105, 2015.

MALEKI-FISCHBACH, M.; JORDAN, JM. New developments in osteoarthritis. Sex differences in magnetic resonance imaging-based biomarkers and in those of joint metabolism. **Arthritis Res Ther.**, vol. 12(4):212, 2010

MANEN, Mike D. Van; NACE, James; MONT, Michael A. Management of Primary Knee Osteoarthritis and Indications for Total Knee Arthroplasty for General Practitioners. **J Am Osteopath Assoc.**, vol. 112(11):709-715, 2012.

MAN-GER, Margaret Sun; BEIER, Frank. Chondrocyte Hypertrophy in Skeletal Development, Growth and Disease. **Birth Defects Research (Part C)**, vol. 102:74–82, 2014.

MANKIN, H. J.; MOW, V. C.; BUCKWALTER, J. A.; IANNOTTI, J. P.; RATCLIFFE, A: Articular cartilage structure, composition, and function, in Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR (eds): **Orthopaedic Basic Science: Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System**, ed 2. Rosemont, IL, American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000, pp 443-470.)

MANKIN, HJ; MOW, CV; BUCKWALTER, JA; IANNOTTI, JP; RATCLIFFE, A. Articular cartilage structure, composition, and function. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR, editors. , eds. **Orthopaedic Basic Science**. 2nd ed Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 443-470, 2000.

MANYANGA, Taru; FROESE, Maria; ZARYCHANSKI, Ryan; ABOU-SETTA, Ahmed; FRIESEN, Carol; TENNENHOUSE, Michael; SHAY, Barbara L. Pain management with acupuncture in osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 14:312, 2014.

MARASCHIN, Renata; VIEIRA, Péricles Saremba; LEGUISAMO, Camila Pereira; DAL'VESCO, Fracieli; SANTI, Juceléia Pertile. Dor lombar crônica e dor nos membros inferiores em idosas:

MARX, Felipe C.; OLIVEIRA, Leda Magalhães de; BELLINI, Cintia G.; RIBEIRO, Michele Cristina C. Tradução e Validação Cultural do Questionário Algofuncional de Lequesne para Osteoartrite de Joelhos e Quadris para a Língua Portuguesa. **Rev Bras Reumatol**, v. 46, n.4, p. 253-260, jul/ago, 2006.

MATSUOKA, Masatake; ONODERA, Tomohiro; HOMAN, Kentaro, SASAZAWA, Fumio; FURUKAWA, Jun-ichi; MOMMA, Daisuke; BABA, Rikiya; HONTANI, Kazutoshi; JOUTOKU, Zenta; Shinji MATSUBARA, YAMASHITA, Tadashi; IWASAKI, Norimasa. Depletion of gangliosides enhances articular cartilage repair in mice. **Scientific Reports**, 7:43729, 2017.

MAVRIDOU, I; COZAR, M; DOUZGOU, S; XAIDARA, A; LIANOU, D; VANIER, MT; DIMITRIOU, E; GRINBERG, D; VILAGELIU, L; MICHELAKAKIS, H. Niemann-Pick type C disease: a novel NPC1 mutation segregating in a Greek island. **Clin Genet.**, 85(6):543-7, 2014.

MCCARBERG, Bill H. NSAIDs in the Older Patient: Balancing Benefits and Harms. **Pain Medicine**, 14: S43–S44, 2013.

MCEVOY, John W.; NASIR, Khurram; DEFILIPPIS, Andrew P.; LIMA, Joao A.C.; BLUEMKE, David A.; HUNDLEY, W. Gregory; GRAHAM BARR, R.; BUDOFF, Matthew J.; SZKLO, Moyses; NAVAS-ACIEN, Ana; POLAK, Joseph F.; BLUMENTHAL, Roger S.; POST, Wendy S.; BLAHA, Michael J. Relationship of Cigarette Smoking With Inflammation and Subclinical Vascular Disease: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, vol. 35:1002-1010, 2015.

MCGRORY, Brian J.; WEBER, Kristy L.; JEVSEVAR, David S.; SEVARINO, Kaitlyn. Surgical Management of Osteoarthritis of the Knee: Evidence-based Guideline. **J Am Acad Orthop Surg**, 24:e87-e93, 2016. EVANIEW, Allison L; EVANIEW Nathan. Knee

osteoarthritis: Therapeutic alternatives in primary care. **World J Orthop**, 8(2): 187-191, 2017.

MCILWAIN, David R.; BERGER, Thorsten; MAK, Tak W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, 5:a008656, 2013.

MEDINA, Luciana Paroneto. **Modulação da morte mediada por Fas em células tipo I e tipo II**. São Paulo, 2011.

MESSIER, SP; GUTEKUNST, DJ; DAVIS, C; DEVITA, P. Weight loss reduces knee-joint loads in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, vol. 52:2026–2032, 2005.

MILLER, Rachel E.; MILLER, Richard J.; MALFAIT, Anne-Marie. Osteoarthritis joint pain: The cytokine connection. **Cytokine**, 70 185–193, 2014.

MIYAKI, S; NAKASA, T; OTSUKI, S; GROGAN, SP; HIGASHIYAMA, R; INOUE, A; KATO, Y; SATO, T; LOTZ, MK; ASAHARA, H. MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. **Arthritis Rheum.**, 60(9):2723-30, 2009.

MIYAMOTO, Y; MABUCHI, A; SHI, D; KUBO, T; TAKATORI, Y; SAITO, S; FUJIOKA, M; SUDO, A; UCHIDA, A; YAMAMOTO, S; OZAKI, K; TAKIGAWA, M; TANAKA, T; NAKAMURA, Y; JIANG, Q; IKEGAWA, S. A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to osteoarthritis. **Nat Genet.**, vol. (4):529-33, 2007.

MIZUNO, Shuichi; OGAWA, Rei. Using changes in hydrostatic and osmotic pressure to manipulate metabolic function in chondrocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, 300: C1234–C1245, 2011.

MOBASHERI, A. Osteoarthritis year 2012 in review: biomarkers. **Osteoarthritis and Cartilage**, 20:1451-1464, 2012.

MOSHER, T.J.; WALKER, E.A.; PETSCAVAGE-THOMAS, J.; GUERMAZI, A.. Osteoarthritis year 2013 in review: imaging. **Osteoarthritis and Cartilage**, 21:1425e1435, 2013.

MOTA, L. M. H. M. Osteoartrite. In: SHINJO, S. K. **Reumatologia**. 1º edição, São Paulo: Atheneu, 2010, cap.8, p.73-90.

MURPHY, Louise; HELMICK, Charles. The Impact of Osteoarthritis in the United States: A Population-Health Perspective. **American Journal of Nursing**, vol. 112:3, 2012.

MUSUMECI, Giuseppe; CASTROGIOVANNI, Paola; TROVATO, Francesca Maria; WEINBERG, MARTINA, Annelie; AL-WASIYAH, Mohammad K.; ALQAHTANI, Mohammed H.; MOBASHERI, Ali. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. **Int. J. Mol. Sci.**, 16, 20560-20575, 2015.

NASI, Sonia; EA, Hang-Korng; SO, Alexander; BUSSO, Nathalie. Revisiting the Role of Interleukin-1 Pathway in Osteoarthritis: Interleukin-1a and -1b, and NLRP3 Inflammasome Are Not Involved in the Pathological Features of the Murine Menisectomy Model of Osteoarthritis. **Front. Pharmacol.** 8:282, 2017.

NASI, Sonia; SO, Alexander; COMBES, Christèle; DAUDON, Michel; BUSSO, Nathalie. Interleukin-6 and chondrocyte mineralisation act in tandem to promote experimental osteoarthritis. **Ann Rheum Dis**, vol. 75:1372–1379, 2016.

NEOGI, Tuhina. The Epidemiology and Impact of Pain in Osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, vol. 21(9): 1145–1153, 2013.

NEVITT, MC; FELSON, DT; WILLIAMS, EN; GRADY, D. The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis Rheum.**, vol. 44(4):811-8, 2001.

NOVINCE, Chad M.; ENTEZAMI Payam; WILSON, Christopher G.; WANG, Jason; OH, Seo; KOH, Amy J.; MICHALSKI, Megan N.; SINDER, Benjamin P.; KOZLOFF, Kenneth M.; TAICHMAN, Russell S.; MCCAULEY, Laurie K.. The Impact of Proteoglycan-4 and Parathyroid Hormone on Articular Cartilage. **Orthop Res.**, 31(2): 183–190, 2013.

O'CONOR, CJ; RAMALINGAM, S; ZELENSKI ,NA; BENEFIELD, HC; RIGO, I; LITTLE, D; WU, CL; CHEN, D; LIEDTKE, W; MCNULTY, AL; GUILAK, F. Cartilage-specific knockout of the mechanosensory ion channel TRPV4 decreases age-related osteoarthritis. **Sci Rep**, 6:29053, 2016.

OSENI, Adelola O.; BUTLER, Peter E.; SEIFALIAN, Alexander M. Optimization of chondrocyte isolation and characterization for large-scale cartilage tissue engineering. **Journal of Surgical Research**, vol. 181, 41-28, 2013.

OSHIMA, Yasushi; AKIYAMA, Toru; HIKITA, Atsuhiko; IWASAWA, Mitsuyasu; NAGASE, Yuichi; NAKAMURA, Masaki; WAKEYAMA, Hidetoshi; KAWAMURA, Naohiro; IKEDA, Toshiyuki; CHUNG, Ung-il; HENNIGHAUSEN, Lothar; KAWAGUCHI, Hiroshi; NAKAMURA, Kozo; TANAKA, Sakae. Pivotal Role of Bcl-2 Family Proteins in the Regulation of Chondrocyte Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 283(39), pp. 26499–26508, 2008.

OZEKI, N; YAMAGUCHI, H; KAWAI, R; HIYAMA, T; NAKATA, K; MOGI, M; NAKAMURA, H. Cytokines induce MMP-3-regulated proliferation of embryonic stem cell-derived odontoblast-like cells. **Oral Dis.**, vol. 20(5):505-13, 2014.

PACCA, Daniel Moreira; DE-CAMPOS, Gustavo Constantino; ZORZI, Alessandro Rozin; CHAIM, Elinton Adami; DE-MIRANDA, João Batista. Prevalência de dor articular e osteoartrite na população obesa brasileira. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, vol. 31(1):e1344, 2018

PAGE, Carolyn J.; HINMAN, Rana S.; BENNELL, Kim L. Physiotherapy management of knee osteoarthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**; 14: 145–151, 2011.

PAINE, Ananta; RITCHLIN, Christopher. Bone remodeling in psoriasis and psoriatic arthritis: an update. **Curr. Opin. Rheumatol.**, 28:66–75, 2016.

PALOMO, Jennifer; DIETRICH, Damien; MARTIN, Praxedis; PALMER, Gaby; GABAY, Cem. The interleukin (IL)-1 cytokine family – Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. **Cytokine**, 76:5–37, 2015.

PAN, Tianlong; SHI, Xuchao; CHEN, Huan; CHEN, Rong; WU, Dengying; LIN, Zeng; ZHANG, Jingdong; PAN, Jun. Geniposide Suppresses Interleukin-1 β -Induced Inflammation and Apoptosis in Rat Chondrocytes via the PI3K/Akt/NF- κ B Signaling Pathway.

Inflammation, 2017.

PARAMESWARAN, Narayanan; PATIAL, Sonika. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**, vol. 20(2): 87–103, 2010.

PAREDES-CARNERO, ESCOBAR, X.; J., GALDO, J.M.; BABÉ, J.G. Total knee arthroplasty for treatment of osteoarthritis associated with extra-articular deformity. **Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma**, vol. 9:125–132, 2018.

PARENTI, Giancarlo; ANDRIA, Generoso; VALENZANO, Kenneth J. Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the

Treatment of Lysosomal Storage Disorders. **Molecular Therapy**, vol. 23(7): 1138–1148, 2015.

PARK, Hyun Ho; LO, Yu-Chih; LIN, Su-Chang; WANG, Liwei; YANG, Jin Kuk; WU, Hao. The Death Domain Superfamily in Intracellular Signaling of Apoptosis and Inflammation. **Annu. Rev. Immunol.**, vol. 25:561–86, 2007.

PAVELKA, Karel; Olivier BRUYÈRE; Cyrus COOPER; John A. KANIS; Burkhard F. LEEB; Emmanuel MAHEU, Johanne MARTEL-PELLETIER, Jordi MONFORT, Jean-Pierre PELLETIER; René RIZZOLI; Jean-Yves REGINSTER. Diacerein: Benefits, Risks and Place in the Management of Osteoarthritis. An Opinion-Based Report from the ESCEO. **Drugs Aging**, 33:75–85, 2016.

PEARCE, Fiona; HUI, Michelle; DING, Changhai; DOHERTY, Michael; ZHANG, Weiya. Does Smoking Reduce the Progression of Osteoarthritis? Meta-Analysis of Observational Studies. **Arthritis Care & Research**, vol. 65:1026–1033, 2013.

PEDADDA, Krishi V.; PEDDADA, Kranti Venkata; SHUKLA, Surendra K.; MISHRA, Anusha; VERMA, Vivek. Role of curcumin in common musculoskeletal disorders: a review of current laboratory, translational, and clinical data. **Orthopaedic Surgery**, 7:222–231, 2015.

PELLETIER, Jean-Pierre; MARTEL-PELLETIER, Johanne; RANNOU, François; COOPER, Cyrus. Efficacy and safety of oral NSAIDs and analgesics in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 45:S22–S27, 2016.

PERKINS, Celine; WHITING, Bethan; LEE, Paul YF. Steroids and Osteoarthritis, **J Arthritis**, 6:3, 2017.

PETERS, VA; JOESTING, JJ; FREUND, GG. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation. **Brain Behav Immun.**, 32:1-8, 2013.

PIECHA, Dorothea; WEIK, Jürgen; KHEIL, Heike; BECHER, Gabriele; TIMMERMANN, Andreas; JAWORSKI, Andreas; BURGER, Maren; HOFMANN, Michael W.. Novel selective MMP-13 inhibitors reduce collagen degradation in bovine articular and human osteoarthritis cartilage explants. **Inflamm. Res.**, vol. 59:379–389, 2010.

PINEDA, Mercedes; PEREZ-POYATO, Maria del Socorro. Current and future therapies for Niemann–Pick C disease. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, 2013.

- PLATT, FM; NEISES, GR; KARLSSON, GB; DWEK, RA; BUTTERS, TD. N-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect N-linked oligosaccharide processing. **J Biol Chem.**, vol. 269, 27108-27114., 1994.
- POOLE, A. R.; KOBAYASHI, M.; YASUDA, T.; LAVERTY, S.; MWALE, F.; KOJIMA, T.; SAKAI, T.; WAHL, C.; EL-MAADAWY, S.; WEBB, G.; TCHETINA, E.; WU, W. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. **Ann Rheum Dis**, vol. 61(Suppl II):ii78–ii81, 2002.
- PRIETO, L.; BADIAA, X. Cuestionarios de salud: concepto y metodología. **Atención Primaria**, Vol. 28. Núm. 3. Julio-agosto, 2001
- RAGLE, Ryan L.; SAWITZKE, Allen D. Nutraceuticals in the Management of Osteoarthritis: A Critical Review. **Drugs Aging**, 29:717–731, 2012.
- RAHLF, Anna Lina; BRAUMANN, Klaus-Michael; ZECH, Astrid. Kinesio Taping Improves Perceptions of Pain and Function of Patients with Knee Osteoarthritis. A Randomized, Controlled Trial. **Journal of Sport Rehabilitation**, 2018.
- RAINSFORD, K. D.; PARKE, Ann L.; CLIFFORD-RASHOTTE, Matthew; KEAN, W. F. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. **Inflammopharmacol**, 2015.
- RANNOU, François; SELLAM, Jeremy; Francis Berenbaum. Physiopathologie de l'arthrose : conceptions actuelles. **Presse Med.**, 39: 1159–1163, 2010.
- REGINSTER, Jean-Yves; Audrey NEUPREZ; Marie-Paule LECART; Nathalie Sarlet; Olivier BRUYERE. Role of glucosamine in the treatment for osteoarthritis. **Rheumatol Int.**, 32:2959–2967, 2012.
- REID, M. Carrington. Viscosupplementation for Osteoarthritis: a Primer for Primary Care Physicians. **Adv Ther.**, 30:967–986, 2013.
- RESORLU, Mustafa; AYLANC, Nilufer; KARATAG, Ozan; TOPRAK, Canan Akgun. Gaucher's disease in a patient presenting with hip and abdominal pain. **Rev Ass oc Med Bras**, 63(12):1025-1027, 2017.
- REZENDE, Márcia U. de; CAMPOS, Gustavo C. de; PAILO, Alexandre F. Conceitos Atuais em Osteoartrite. **Acta Ortop Bras.**, 21(2): 120-2, 2013.

RIBAS, Graziela S.; PIRES, Ricardo; COELHO, Janice C.; RODRIGUES, Daiane; MESCKA, Caroline P.; VANZIN, Camila S.; BIANCINI, Giovana B.; NEGRETO, Giovanna; WAYHS, Carlos A. Y.; WAJNER, Moacir; VARGAS, Carmen R. Oxidative stress in Niemann-Pick type C patients: a protective role of N-butyl-deoxynojirimycin therapy. **Int. J. Devl Neuroscience**, 30:439–444, 2012.

RICHMOND, Jillian; TUZOVA, Marina, CRUIKSHANK, William; CENTER, David. Regulation of Cellular Processes by Interleukin-16 in Homeostasis and Cancer. **J. Cell. Physiol.** 229: 139–147, 2014.

ROACH, HI; YAMADA, N; CHEUNG, KS; TILLEY, S; CLARKE, NM; OREFFO, RO. Association between the abnormal expression of matrix degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. **Arthritis Rheum.**, vol. 52:3110-24, 2005.

ROSENBAUM, Anton I; MAXFIELD, Frederick R. Niemann-Pick type C disease: mechanisms and potential therapeutic approaches. **J. Neurochem.**, vol. 116, 789–795, 2011.

ROSINE, Nicolas; ETCHETO, Adrien; HENDEL-CHAVEZ, Houria; SEROR, Raphaële; BRIOT, Karine; MOLTO, Anna; CHANSON, Philippe; TAOUFIK, Yassine; Daniel; WENDLING, Lories; BERENBAUM, Francis; BERG, Rosaline van den; CLAUDEPIERRE, Pascal; FEYDY, Antoine; DOUGADOS, Maxime; ROUX, Christian; MICELI-RICHARD, Corinne. Increase In IL-31 Serum Levels Is Associated With Reduced Structural Damage In Early Axial Spondyloarthritis. **Scientific Reports**, 8:7731, 2018.

RUTJES, Anne W.S.; JÜNI, Peter; COSTA, Bruno R. da; TRELLE, Sven; NÜESCH, Eveline; REICHENBACH, Stephan. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review and Meta-analysis. **Ann Intern Med.**, 157:180-191., 2012.

RUTZ, Sascha; EIDENSCHENK, Céline; OUYANG, Wenjun. IL-22, not simply a Th17 cytokine. **Immunological Reviews**, vol. 252: 116–132, 2013.

SAEIDI, N. A. **On the control of collagen fibril organization and morphology.** (Dissertação de mestrado). Boston (MA): Northeastern University; 2009.

SANCHEZ, Christelle; DEBERG, Michelle A.; BELLAHCNE, Akeila; CASTRONOVO, Vincent; MSIKA, Philippe; DELCOUR, P.; CRIELAARD, J. M.; HENROTIN, Yves E.. Phenotypic Characterization of Osteoblasts From the Sclerotic Zones of Osteoarthritic Subchondral Bone. **Arthritis & Rheumatism**, Vol. 58, No. 2, pp 442–455, 2008.

- SANDELL, Linda J. Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. **Nat. Rev. Rheumatol.**, vol. 8:77–89, 2012.
- SANTOS, Fânia C.; BERSANI, Ana Laura de Figueiredo; MORAES, Niele Silva. Como Diagnosticar e Tratar Doenças articulares no idoso. **Revista Brasileira de Medicina**, 2013.
- SANTOS, João Paulo M.; ANDRAUS, Rodrigo A. C.; PIRES-OLIVEIRA, Deise A. A.; FERNANDES, Marcos T. P.; FRÂNCICA, Mayra C.; POLI-FREDERICO, Regina Célia; FERNANDES, Karen B. P. Análise da funcionalidade de idosos com osteoartrite. **Fisioter Pesq.**, 22(2):161-168, 2015.
- SAVVIDOU, Olga; MILONAKI, Mandy; GOUMENOS, Stavros; FLEVAS, Dimitrios; PAPAGELOPOULOS, Panayiotis; MOUTSATSOU, Paraskevi. Glucocorticoid signaling and osteoarthritis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2018.
- SCANZELLO, Carla R.; GOLDRING, Steven R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, vol. 51:249–257, 2012.
- SCHIPHOF, D.; MIDDELKOOP, M. van; KLERK, B.M. de; OEI, E.H.G.; HOFMAN, A.; KOES, B.W.; WEINANS, H.; BIERMA-ZEINSTRAS, S.M.A. Crepitus is a first indication of patellofemoral osteoarthritis (and not of tibiofemoral osteoarthritis). **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 22:631e638, 2014.
- SELF, Terry Kit; TAYLOR, Ann Gill. Acupuncture and Osteoarthritis of the Knee: A Review of Randomized, Controlled Trials. **Fam Community Health**, 31(3): 247–254, 2008.
- SENNA, E. R.; DE BARROS, A. L.; SILVA, E. O.; COSTA, I. F.; PEREIRA, L. V.; CICONELLI, R. M.; FERRAZ, M. B. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **J Rheumatol.**, (3):594-7, 2004.
- SHAGAM, Janet Yagoda. Medical Imaging and Osteoarthritis of the Knee. **Radiologic Technology**, vol. 83(1), 2011.
- SHARMA, AR; JAGGA, S; LEE, SS; NAM, JS. Interplay between cartilage and subchondral bone contributing to pathogenesis of osteoarthritis. **Int J Mol Sci.**, vol.14(10):19805-30, 2013.
- SHERWOOD, Joanna C.; BERTLAND, Jessica; ELDRIDGE, Suzanne E.; DELL'ACCIO, Francesco. Cellular and molecular mechanisms of cartilage damage and repair. **Drug Discovery Today**, vol. 19, 2014.

SHOLTER, Dalton E; RUSSELL, Anthony S. Synovial fluid analysis. Disponível em: <<http://www.uptodate.com>>. Acesso em 28 outubro 2017.

SILLAT, Tarvo; BARRETO, Gonalo; CLARIJS, Paul; SOININEN, Antti; AINOLA, Mari; PAJARINEN, Jukka; KORHONEN, Matti; KONTTINEN, Yrj  T; SAKALYTE, Regina; HUKKANEN, Mika; YLINEN, Pekka; NORDSTR M, Dan C E. Toll-like receptors in human chondrocytes and osteoarthritic cartilage. **Acta Orthopaedica**, vol. 84 (6): 585–592, 2013.

SILVA, Tatiane Ferreira da; PENNA, Ana L cia Barreto. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo**, vol. 71(3):530-9, 2012.

SINGH, Jasvinder A.; NOORBALOOCHI, Siamak; KNUTSON, Keith L. Cytokine and neuropeptide levels are associated with pain relief in patients with chronically painful total knee arthroplasty: a pilot study. **BMC Musculoskeletal Disorders**, 18:17, 2017.

SOUSA, Jorge Rodrigues de; SILVA, Paulo Ygor Agrassar da; SOARES, Luis Paulo Miranda Araújo; AARÃO, Tinara Leila de Souza; PINTO, Denise da Silva; FUZII, Hellen Thais; QUARESMA, Juarez Ant nio Simões. Imunoexpress o de TNF-  e TGF-é em lesões de pacientes nas diversas formas clínicas da hanseníase por meio da técnica de imunoistoquímica. **Rev Pan-Amaz Saude**, 4(2):45-53, 2013.

SOUSA, Lucas Gabriel Sousa. **Avalia o in vitro da atividade imunomoduladora e antineoplásica do Zavesca  (Miglustato)**. Recife, 2017.

SOUZA, Erlaine Da Silva; MORAIS, Silvia Helena; CHIAPETA, Andr s Valente; de OLIVEIRA, Thamires Germany. Fatores biomecânicos do joelho e quadril como causa de osteoartrite. **Anais VI SIMPAC - Volume 6 - n. 1 - Viçosa-MG - p. 313-320**, 2014.

STEIN, V. M.; CROOKS, A.; DING, W.; PROCIUK, M.; O'DONNELL, P.; BRYAN, C.; SIKORA, T.; DINGEMANSE, J.; VANIER, M. T.; WALKLEY, S. U.; VITE, C. H. Miglustat improves purkinje cell survival and alters microglial phenotype in feline Niemann-Pick disease type C. **J Neuropathol Exp Neurol.**, vol. 71(5):434-48, 2012.

STEPHANIE TANAMAS; FAHAD S. HANNA; FLAVIA M. CICUTTINI; ANITA E. WLUKA; PATRICIA BERRY, DONNA M. URQUHART. Does Knee Malalignment Increase the Risk of Development and Progression of Knee Osteoarthritis? A Systematic Review. **Arthritis & Rheumatism**, vol. 61 (4), pp 459–467, 2009.

STOCKWELL, R. A. Chondrocytes. **J. clin. Path.**, 31, Suppl. (Roy. Coll. Path.), 12, 7-13, 1952.

STOPPIELLO, Laura A.; MAPP, Paul I.; WILSON, Deborah; HILL, SCAMMELL, Roger; BRIGITTE, E.; WALSH, David A.. Structural Associations of Symptomatic Knee Osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatology**, vol. 66(11), pp 3018–3027, 2014.

STUPINA, T. A.; STEPANOV, M. A.; TEPLEN’KII, M. P. Role of Subchondral Bone in the Restoration of Articular Cartilage. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, vol. 158, No. 6, 2015.

SUNDMAN, Emily A.; COLE, Brian J.; KARAS, Vasili; VALLE, Craig Della; TETREAULT, Mathew W.; MOHAMMED, Hussni O.; FORTIER, Lisa A.. The Anti-inflammatory and Matrix Restorative Mechanisms of Platelet-Rich Plasma in Osteoarthritis. **The American Journal of Sports Medicine**, Vol. 42, No. 1, 2013.

SURI, Pradeep; MORGENROTH, David C.; HUNTER, David J. Epidemiology of Osteoarthritis and Associated Comorbidities. **PM R**;4:S10-S19, 2012.

SURI, S; WALSH, DA. Osteochondral alterations in osteoarthritis. **Bone**, vol. (2):204-11, 2012.

TAKEBE, Ken; NISHYIAMA, Takayuiki; HAYASHI, Shinya; HASHIMOTO, Shingo; FUJISHIRO, Takaaki; KANZAKI, Noriyuki; KAWAKITA, Kohei; IWASA, Kenjiro; KURODA, Ryosuke; KUROSAKA, Masahiro. Regulation of p38 MAPK phosphorylation inhibits chondrocyte apoptosis in response to heat stress or mechanical stress. **International Journal of Molecular Medicine**, 27: 329-335, 2011.

TANAKA, Toshio; NARAZAKI, Masashi; KISHIMOTO, Tadamitsu. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, vol. 6:a016295, 2014.

THOMPSON, LR; BOUDREAU, R; HANNON, MJ; NEWMAN, AB; CHU, CR; JANSEN, M; NEVITT, MC; KWOH, CK. The knee pain map: reliability of a method to identify knee pain location and pattern. **Arthritis Rheum.**, vol. 15;61(6):725-31, 2009.

THYSEN, Sarah; LUYTEN, Frank P.; LORIES, Rik J. U. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. **Dis Model Mech.**, vol. 8(1): 17–30, 2015.

TIRET, Laurence; GODEFROY, Tiphaine; LUBOS, Edith; NICAUD, Viviane; TREGOUET, David-Alexandre; BARBAUX, Sandrine; SCHNABEL, Renate; BICKEL, Christoph; ESPINOLA-KLEIN, Christine; POIRIER, Odette; PERRET, Claire; MÜNDEL, Thomas;

- RUPPRECHT, Hans-Jurgen; LACKNER, Karl; CAMBIEN, François; BLANKENBERG, Stefan. Genetic Analysis of the Interleukin-18 System Highlights the Role of the Interleukin-18 Gene in Cardiovascular Disease. **Circulation**, vol. 112:643-650, 2005.
- TOEGEL, S; M PABST; SQ WU; J GRASS; GOLDRING, MB. Phenotype-related differential α -2,6- or α -2,3-sialylation of glycoprotein N-glycans in human chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, 18(2): 240, 2010.
- TREVISANI, Virgínia F. M.; FIDELIX, Tânia S. de A. Como diagnosticar e tratar a osteoartrite. **Revista Brasileira de Medicina**, vol 66 (12) 51-59, 2009.
- TRIVELLA, Daniela Barretto Barbosa; FERREIRA-JÚNIOR, José Ribamar; DUMOUTIER, Laure; RENAULD, Jean-Christophe; POLIKARPOV, Igor. Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family. **Cell. Mol. Life Sci.**, vol. 67:2909–2935, 2010.
- TSEZOU, A. Osteoarthritis Year in Review 2014: genetics and genomics. **Osteoarthritis and Cartilage**, 22:2017e2024, 2014.
- VALDES, AM; SPECTOR, TD. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. **Nat Rev Rheumatol.**, vol. 7(1):23-32, 2011.
- VALLEJO, Francisco Javier Gallo; RUIZ, Vicente Giner. Diagnóstico. Examen del líquido sinovial. **Aten Primaria.**, 46 Supl 1:29-31, 2014.
- VAN EERD, Maarten; PATIJN, Jacob; LATASTER, Arno; ROSENQUIST, Richard W.; VAN KLEEF, Maarten; MEKHAIL, Nagy; ZUNDERT, Jan Van. Cervical Facet Pain. **Pain Practice**, vol. 10 (2)20113–123, 2010.
- VASILADIS, Haris S; TSIKOPOULOS, Konstantinos. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. **World J Orthop**, 18; 8(1): 1-11, 2017.
- VINCENT, KR; CONRAD, BP; FREGLY, BJ; VINCENT, HK. The pathophysiology of osteoarthritis: a mechanical perspective on the knee joint. **PM R.**, 4(5 supplement), 2012.
- VITALE, Rodrigo Faller; RIBEIRO, Fernando de Andrade Quintanilha. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. **Rev Bras Otorrinolaringol.**, 73(1):123-7, 2007.
- VOET, Donald; VOET, Judith G. **Bioquímica**. 4ª edição, Porto Alegre: ARTMED EDITORA, 2013, cap. 8, pa. 239.

VUJANOVIC, Nikola L. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity. **Immunol Res**, vol. 50:159–174, 2011.

WADEY, Veronica M.R.; MOHTADI, Nicholas G.H.; BRAY, Robert C.; FRANK, Cyril B. Positive predictive value of maximal posterior joint-line tenderness in diagnosing meniscal pathology: a pilot study. **J can chir**, vol. 50(2), 2007.

WALLACE, Ian J.; WORTHINGTON, Steven; FELSON, David T.; JURMAIN, Robert D.; WREN, Kimberly T.; MAIJANEN, Heli; WOODS, Robert J.; LIEBERMAN, Daniel E. Knee osteoarthritis has doubled in prevalence since the mid-20th century. **Proc Natl Acad Sci USA**, 114(35):9332-9336, 2017.

WANG, P.; ZHU, F.; KONSTANTOPOULOS, K. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinasedependent NF- κ B activation. **American Journal of Physiology—Cell Physiology**, vol. 298, no. 6, pp. C1445–C1456, 2010.

WANG, X.; HUNTER, D.; XU, J.; DING, C. Metabolic triggered inflammation in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 23:22-30, 2015.

WANG, Youhua; XU, Dawei; LONG, Long; DENG, Xiaolong; TAO, Ran; HUANG, Guicheng. Correlation between plasma, synovial fluid and articular cartilage Interleukin-18 with radiographic severity in 33 patients with osteoarthritis of the knee. **Clin Exp Med**, vol.14:297–304, 2014.

WELLSANDT, Elizabeth; GOLIGHTLY, Yvonne. Exercise in the management of knee and hip osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol**, 29:000–000, 2017.

WENDELBOE, AM; HEGMANN, KT; BIGGS, JJ; COX, CM; PORTMANN, AJ; GILDEA, JH; GREN, LH; LYON, JL. Relationships between body mass indices and surgical replacements of knee and hip joints. **Am J Prev Med**, vol. 4:290-5, 2003

WHITNEY, Nicholas P., ALLYSON C. LAMB, TOBIAS M. LOUW, and ANURADHA SUBRAMANIAN. Integrin-mediated mechanotransduction pathway of low-intensity continuous ultrasound in human chondrocytes. **Ultrasound in Med. & Biol.**, Vol. 38, No. 10, pp. 1734–1743, 2012.

WISE, Jacqui. NICE keeps paracetamol in UK guidelines on osteoarthritis. **BMJ**, 348:g1545, 2014.

WOJDASIEWICZ, Piotr; PONIATOWSKI, Lukasz A.; SZUKIEWICZ, Dariusz. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis.

Mediators of Inflammation, 561459, 2014.

XU, J; LIAO, L; NING, G; YOSHIDA-KOMIYA, H; DENG, C; O'MALLEY, BW. The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development.

Proc Natl Acad Sci USA, vol. 97:6379–84, 2000.

XUE, Juan; WANG, Jianlong; LIU, Qiang; LUO, Aijing. Tumor necrosis factor- α induces ADAMTS-4 expression in human osteoarthritis chondrocytes. **Molecular Medicine Reports**, 8: 1755-1760, 2013

YING, X; CHENG, S; SHEN, Y; CHENG, X; AN ROMPIS, F; WANG, W; LIN, Z; Chen, Q; ZHANG, W; KOU, D; PENG, L; TIAN, XQ; LU, CZ. Nicotine promotes proliferation and collagen synthesis of chondrocytes isolated from normal human and osteoarthritis patients.

Mol Cell Biochem., vol. 359:263–269, 2012.

YU, Shirley P.; HUNTER, David J. Managing osteoarthritis. **Aust Presc.**, 38:115–9, 2015.

YUSUF, Erlangga. Pharmacologic and Non-Pharmacologic Treatment of Osteoarthritis. **Curr Treat Options in Rheum**, 2:111–125, 2016.

ZAMBON, Sabina; SIVIERO, Paola; DENKINGER, Michael; LIMONGI, Federica; CASTELL, Maria Victoria; PAS, Suzan van der; OTERO, Angel; EDWARDS, Mark H. RICHARD peter; NANCY L. Pedersen; MERCEDES Sanchez-Martinez; ELAINE M. Dennison; ANTONELLA Gesmundo; LAURA A. Schaap; DORLY J. H. Deeg; NATASJA M. VAN Schoor; STEFANIA Maggi. Role of Osteoarthritis, Comorbidity, and Pain in Determining Functional Limitations in Older Populations: European Project on Osteoarthritis. **Arthritis Care & Research**, Vol. 68, No. 6, pp 801–810, 2016.

ZAMLI, Zaitunnatakhin; SHARIF, Mohammed. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? **International Journal of Rheumatic Diseases**, 14: 159–166, 2011.

ZAYER, M. Long-term results after physiological genu varum. **J Pediatr Orthop B.**, vol. 4:271-7, 2000.

ZHANG, Qing; PUTHETI, Prabhakar; ZHOU, Qiang; LIU, Quansheng; GAO, Wenda. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, vol. 19(5-6): 347–356, 2008.

ZHANG, W; DOHERTY, M; PEAT, G; BIERMA-ZEINSTRA, MA; ARDEN, NK; BRESNIHAN, B. EULAR evidence-based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis. **Ann Rheum Dis**, vol. 69(3):483e9, 2010.

ZHANG, Wei; OUYANG, Hongwei; DASS, Crispin R; XU, Jiake. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. **Bone Res.**; 4: 15040, 2016.

ZHANG, Zijun. Chondrons and the Pericellular Matrix of Chondrocytes. **Tissue engineering: Part B**, vol. 21(3), 2015.

ZHEN, Gehua; CAO, Xu. Targeting TGFb signaling in subchondral bone and articular cartilage homeostasis. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol. 35, No. 5, 2014.

ZHOU, Bin; WANG, Rong; WU, Ping; KONG De-Xin. Drug Repurposing Based on Drug–Drug Interaction. **Chem Biol Drug Des**; 85:137–144, 2015.

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE

CENTRO DE BIOCÊNCIAS- CB

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA- PPGIT

LABORATÓRIO DE IMUNOMODULAÇÃO E NOVAS ABORDAGENS

TERAPÊUTICAS - LINAT

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa *Avaliação in vitro e in vivo dos mecanismos imunomodulatórios da curcumina e de novos derivados tiazolidínicos em pacientes portadores de Osteoartrite de Joelho*, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Priscilla Stela Santana de Oliveira vinculada ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas- LINAT localizado no 1º andar do Prédio da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo-DINE, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE, fone: (81) 9 99686596, e-mail: priusan@gmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira, Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, Dra. Andrea Tavares Dantas e o mestrando Simão Kalebe de Paula. Este projeto está sob a orientação da Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Telefone/fax: (81) 2126-8346, e-mail: mgrpitta@gmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

A Osteoartrite (OA) é popularmente conhecida como artrose e é uma desordem degenerativa das articulações. O número de pessoas com artrose está em ascensão devido ao envelhecimento populacional e o aumento da prevalência de fatores de risco como obesidade e sedentarismo. A terapia recomendada envolve a utilização de antiinflamatórios não esteroides (AINES), analgésicos, fitoterápicos entre outros. Em casos mais graves, é necessária a colocação de uma prótese. A falta de medicamentos alternativos mais eficazes gera grandes custos para o sistema único de saúde. Dessa forma, a busca por novos medicamentos é necessária e é o principal objetivo desta pesquisa.

Nosso interesse pela sua participação neste estudo é porque o (a) Sr. (a) é portador da doença. Sua colaboração será através da doação voluntária de células do seu sangue e/ou da sua cartilagem. Será colhido aproximadamente 12 ml de sangue, correspondente a quase 1 colher de sopa e será feita por um profissional capacitado. Se após a avaliação clínica for constatada indicação para a remoção da sua cartilagem, este procedimento será realizado conforme a rotina ambulatorial dos serviços de reumatologia/ortopedia e nós só iremos recolher o material biológico após a sua autorização.

Os riscos envolvidos nesse projeto se referem à coleta de sangue, que pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. As amostras de cartilagem serão obtidas de peças cirúrgicas após artroplastia total de joelho, tendo este procedimento sido indicado e realizado por médico ortopedista no serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas (HC) da UFPE. A técnica cirúrgica utilizada é padronizada e utilizada pelo referido serviço não sofrendo nenhuma alteração de técnica ou indicação em função deste projeto. Não há necessidade de termo de consentimento para obtenção dessas amostras por se tratar de um material resultante do procedimento de implante da prótese e não para definição diagnóstica. Este material (amostra da cartilagem) é considerado resto cirúrgico encaminhado como lixo hospitalar

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivos, sob a responsabilidade da pesquisadora **Priscilla Stela Santana de Oliveira** vinculada ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas- LINAT localizado no 1º andar do Prédio

da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo - DINE, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE , pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

Priscilla Stela Santana de Oliveira

(Pesquisadora responsável)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo *Avaliação in vitro e in vivo dos mecanismos imunomodulatórios da curcumina e de novos derivados tiazolidínicos em pacientes portadores de Osteoartrite de Joelho*, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA ADULTOS IMPOSSIBILITADOS DE ASSINAR (RESOLUÇÃO 466/12)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA ADULTOS IMPOSSIBILITADOS DE ASSINAR O TCLE - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa *Avaliação in vitro e in vivo dos mecanismos imunomodulatórios da curcumina e de novos derivados tiazolidínicos em pacientes portadores de Osteoartrite de Joelho*, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Priscilla Stela Santana de Oliveira vinculada ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas- LINAT localizado no 1º andar do Prédio da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo-DINE, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE, fone: (81) 9 99686596, e-mail: priusan@gmail.com. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira, Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, Dra. Andrea Tavares Dantas e o mestrando Simão Kalebe de Paula. Este projeto está sob a orientação da Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta, Telefone/fax: (81) 2126-8346, e-mail: mgrpitta@gmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

A Osteoartrite (OA) é popularmente conhecida como artrose e é uma desordem degenerativa das articulações. O número de pessoas com artrose está em ascensão devido ao envelhecimento populacional e o aumento da prevalência de fatores de risco como obesidade e sedentarismo. A terapia recomendada envolve a utilização de antiinflamatórios não esteroides (AINES), analgésicos, fitoterápicos entre outros. Em casos mais graves, é necessária a colocação de uma prótese. A falta de medicamentos alternativos mais eficazes

gera grandes custos para o sistema único de saúde. Dessa forma, a busca por novos medicamentos é necessária e é o principal objetivo desta pesquisa.

Nosso interesse pela sua participação neste estudo é porque o (a) Sr. (a) é portador da doença. Sua colaboração será através da doação voluntária de células do seu sangue e/ou da sua cartilagem. Será colhido aproximadamente 12 ml de sangue, correspondente a quase 1 colher de sopa e será feita por um profissional capacitado. Se após a avaliação clínica for constatada indicação para a remoção da sua cartilagem, este procedimento será realizado conforme a rotina ambulatorial dos serviços de reumatologia/ortopedia e nós só iremos recolher o material biológico após a sua autorização.

Os riscos envolvidos nesse projeto se referem à coleta de sangue, que pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. As amostras de cartilagem serão obtidas de peças cirúrgicas após artroplastia total de joelho, tendo este procedimento sido indicado e realizado por médico ortopedista no serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas (HC) da UFPE. A técnica cirúrgica utilizada é padronizada e utilizada pelo referido serviço não sofrendo nenhuma alteração de técnica ou indicação em função deste projeto. Não há necessidade de termo de consentimento para obtenção dessas amostras por se tratar de um material resultante do procedimento de implante da prótese e não para definição diagnóstica. Este material (amostra da cartilagem) é considerado resto cirúrgico encaminhado como lixo hospitalar.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivos, sob a responsabilidade da pesquisadora **Priscilla Stela Santana de Oliveira** vinculada ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas- LINAT localizado no 1º andar do Prédio da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo - DINE, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE , pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente

decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

Priscilla Stela Santana de Oliveira

(Pesquisadora responsável)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo *Avaliação in vitro e in vivo dos mecanismos imunomodulatórios da curcumina e de novos derivados tiazolidínicos em pacientes portadores de Osteoartrite de Joelho*, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

A _____ rogo de _____, que é _____ (não

alfabetizado/juridicamente incapaz/deficiente visual), eu _____

_____ assino o presente documento que autoriza a sua participação neste estudo

Local e data _____ Assinatura do participante:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
-------	-------

Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE C – FICHA OSTEOARTRITE

FICHA OSTEOARTRITE

Nome:		
Idade		Fone:
Estado civil: <input type="checkbox"/> solteiro <input type="checkbox"/> casado/união consensual <input type="checkbox"/> viúvo <input type="checkbox"/> divorciado		
Profissão:		
Escolaridade: <input type="checkbox"/> ensino fundamental incompleto <input type="checkbox"/> ensino fundamental completo <input type="checkbox"/> ensino médio incompleto <input type="checkbox"/> ensino médio completo <input type="checkbox"/> superior incompleto <input type="checkbox"/> superior completo <input type="checkbox"/> pós-graduação		
Renda familiar: <input type="checkbox"/> < 1 SM <input type="checkbox"/> 1 a 3 SM <input type="checkbox"/> acima 3 SM		
Atividade física regular: <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual:		
Doenças associadas		
<input type="checkbox"/> gota <input type="checkbox"/> condrocalcinose <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> DLP <input type="checkbox"/> DAC <input type="checkbox"/> IRC <input type="checkbox"/> DPOC <input type="checkbox"/> obesidade <input type="checkbox"/> hipertireoidismo <input type="checkbox"/> hipotireoidismo <input type="checkbox"/> gastrite/ulcera/DRGE <input type="checkbox"/> depressão <input type="checkbox"/> osteoporose <input type="checkbox"/> fibromialgia <input type="checkbox"/> lombalgia <input type="checkbox"/> tendinite/bursite OUTRAS: _____		
Tabagismo: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Tempo:	Quantidade: _____ cigarros/dia	Inativo: _____ anos
Medicações em uso		
Nome		Dose
Diacereina	Sim () Não ()	
Dipirona	Sim () Não ()	
Glucosamina	Sim () Não ()	
Glucosamina + condroitina	Sim () Não ()	
Hidroxyclorequina	Sim () Não ()	
Metotrexato	Sim () Não ()	
Paracetamol	Sim () Não ()	
Vitamina D		

Localização	
Mãos <input type="checkbox"/> Rizartrose <input type="checkbox"/> Heberden <input type="checkbox"/> Bouchard	Joelho <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E Quadril <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E
Imagem/data	
Mãos (/ /) ()	Redução espaço () Esclerose () Osteopenia () Cistos () Osteófitos
Joelhos(/ /) ()	Redução espaço () Esclerose () Osteopenia () Cistos () Osteófitos
Quadril(/ /) ()	Redução espaço () Esclerose () Osteopenia () Cistos () Osteófitos
Prótese	
Joelho <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E	Quadril <input type="checkbox"/> D <input type="checkbox"/> E

APÊNDICE D – FICHA CLÍNICA EVOLUTIVA

FICHA CLÍNICA EVOLUTIVA

Nome:	Data:
Com relação á ultima consulta, indique como você está se sentindo:	
<input type="checkbox"/> muito melhor <input type="checkbox"/> melhor <input type="checkbox"/> a mesma coisa <input type="checkbox"/> pior <input type="checkbox"/> muito pior	
Medicações em uso: <input type="checkbox"/> as mesmas <input type="checkbox"/> mudou em relação à primeira consulta ANOTAR	
Nome	Dose

EVA de avaliação global do paciente:

Considerando todas as formas como a artrite afeta sua vida, indique como você está se sentindo neste momento:

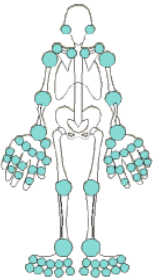
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
☺Muito bem										☹Muito mal☹

Está fazendo fisioterapia? ☐ Sim ☐ Não **Quantas vezes/semana?** ☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ou mais

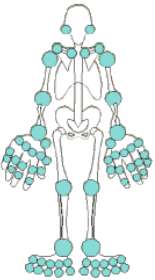
Acha que a fisioterapia está trazendo beneficios para sua doença? ☐ Sim ☐ Não

Por que?

Exame Físico:



DOR



EDEMA

TA=

Auscul

cárdio/pulmonar

MOVIMENTO

Traz exames laboratoriais? ☐ Sim ☐ Não (Anotar)

Traz exames de imagem? ☐ Sim ☐ Não (Anotar)

Conduta:

APÊNDICE E – QUANTIFICAÇÃO DE IFN- γ NAS CULTURAS DE PBMCS

Amostra	Condição	Tempo	Concentração (pg/ml)
OA26	☐	48 h	437,90
	PMA/iono	48 h	716,13
	MP 100 μ M	48 h	4,68
OA29	☐	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	337,10
	MP 100 μ M	48 h	4,68
OA30	☐	48 h	413,71
	PMA/iono	48 h	2732,26
	MP 100 μ M	48 h	240,32
OA40	☐	48 h	236,29
	PMA/iono	48 h	320,97
	MP 100 μ M	48 h	143,55
OA49	☐	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	4,68
	MP 100 μ M	48 h	4,68
OA51	☐	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	561,00
	MP 100 μ M	48 h	247,67
OA52	☐	48 h	17,67
	PMA/iono	48 h	507,67
	MP 100 μ M	48 h	337,67
OA54	☐	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	4119,17
	MP 100 μ M	48 h	85,83
OA59	☐	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	877,50
	MP 100 μ M	48 h	4,68

OA62	℄	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	344,33
	MP 100 µM	48 h	111,00
OA64	℄	48 h	485,83
	PMA/iono	48 h	1319,17
	MP 100 µM	48 h	610,83
OA65	℄	48 h	669,17
	PMA/iono	48 h	5919,17
	MP 100 µM	48 h	927,50
OA68	℄	48 h	27,50
	PMA/iono	48 h	894,17
	MP 100 µM	48 h	60,83

APÊNDICE E – QUANTIFICAÇÃO DE IFN- γ NAS CULTURAS DE PBMCS

OA70	℄	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	64,33
	MP 100 μM	48 h	4,68
OA72	℄	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	37,67
	MP 100 μM	48 h	4,68
OA73	℄	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	361,00
	MP 100 μM	48 h	4,68
OA74	℄	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	621,00
	MP 100 μM	48 h	4,68
OA76	℄	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	11165,00
	MP 100 μM	48 h	1440,00
OA77	℄	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	17315,00
	MP 100 μM	48 h	5306,67
OA78	℄	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	7990,00
	MP 100 μM	48 h	240,00
OA79	℄	48 h	4,68
	PMA/iono	48 h	13048,33
	MP 100 μM	48 h	4698,33
OA80	℄	48 h	298,33
	PMA/iono	48 h	20906,67
	MP 100 μM	48 h	9556,67
OA82	℄	48 h	123,33
	PMA/iono	48 h	9515,00
	MP 100 μM	48 h	5148,33

APÊNDICE F – ARTIGO A SER SUBMETIDO COMO *BRIEF REPORT*

Increased serum levels of IL-18 in Brazilian patients with osteoarthritis

Simão Kalebe Silva de Paula¹, Priscilla Stela Santana de Oliveira¹, Vanessa Mylenna Florêncio de Carvalho¹, Michelly Cristiny Pereira¹, Ângela Luzia Branco Pinto Duarte², Ivan da Rocha Pitta¹, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹, Maira Galdino da Rocha Pitta^{1*}

1 – Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT-SG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

2 – Hospital das Clínicas da UFPE, Recife, Brazil.

* Author's contact e-mail: mgrpitta@gmail.com

Phone: +55 81 96717788

Fax: +55 81 21267524

Address: Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, Cidade Universitária, UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Recife, PE- Brazil. 50670-901.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a rheumatic disease that affects the joints. Its physiopathology is characterized by cartilage degradation and chondrocyte's apoptosis, through mediation of inflammatory agents. Cytokines IL-16, IL-18, IL-22 and IL-31 have been suggested as part of OA mechanisms, therefore we quantified them by ELISA. The study population included 78 patients from a hospital in northeast region of Brazil and 83 healthy volunteers. Their sera were collected to IL-16, IL-18, IL-22 and IL-31 quantification by ELISA. Seventy fours patients were female, whereas only 4 were male; mean age was 59,1 years; 51,2% patients had knee OA, 78,2% had joint pain and 70,5% showed signals like crepitus and nodules; most of them (80,4%) had comorbidities and over a half (53,8%) were under pharmacological treatment. Serum IL-18 was significantly increased in patients ($p < 0,0001$), whereas IL-16, IL-22 and IL-31 were higher in control group ($p < 0,0001$, $p = 0,0285$ e $p = 0,0005$, respectively). These concentrations did not show any correlation with clinical features. The present study showed that IL-18 is significantly increased in serum of OA patients from northeast region of Brazil than those in healthy individuals. Despite of lacking correlation with clinical features,

this cytokine could be an important source of investigation to understand the complex pathogenesis of OA.

Introduction

Osteoarthritis (OA), also called arthrosis, is a disabling rheumatic disease that causes a significant decreasing in quality of life (REZENDE et al., 2013). It is the most common musculoskeletal disorder, affecting mainly women over 50 years of age (LITWIC, 2013). Besides the health problems, OA is responsible for many social and economic issues, including absence from work and disabling retirement (LAIRES et al., 2018). In Brazil, despite OA represents 40% of total medical appointment in rheumatology clinics (Brazilian Society of Rheumatology, 2017), epidemiologic data is still fragile and inconstant, possibly due to its heterogenic phenotypes.

Knees, hands, hips and vertebral column are the main sites affected by OA (PEDDADA et al., 2015), which is characterized by articular cartilage degradation, osteophytes formation, bone remodelling, subchondral bone sclerosis and synovium inflammation (THYSEN et al., 2015). These are complex and not totally understood mechanisms, but it is known that, beyond being only a “wear and tear” consequence, they result from an inflammatory component (RANNOU et al., 2010).

Basically, the inflammatory environment on arthrosic cartilage is established by chondrocytes, which (through genetic, biomechanical or inflammatory ways) start to produce cytokines and other catabolic molecules, as IL-1 β , TNF and metalloproteinases (SHERWOOD et al., 2014). Synovium membrane, normally specialized in the production of a nutritive fluid to maintain cartilage, also undergoes important alterations, which includes hosting an intense inflammatory infiltrate and production of catabolic agents (STUPINA et al., 2014). Other several mediators seem to be involved in this multifactorial pathogenesis, like IL-16, IL-18, IL-22 and IL-31.

However, despite the scientific progress, none of these mediators was incorporated in clinical practice as a diagnosis, prognosis or therapeutic response biomarker. Thus, the search for representative molecules to help drug development and incorporation of innovative therapeutic approaches goes on, with an increasing need of studies.

IL-16 is a pleiotropic interleukin essential to T CD4⁺ cells activation and maturation (LUHESHI et al., 2009). Liu and others (2015) showed that IL-16 serum levels are increased

in Chinese population; Luo and collaborators found a polymorphism correlated with an increased risk to develop OA. In addition, IL-16 serum levels decrease significantly after total knee arthroplasty (SINGH et al., 2017).

Interleukin 18 (IL-18) is a proinflammatory mediator from the IL-1 superfamily that synergizes with prostaglandin E2 (PGE2) to mediate events in OA (WANG et al., 2010). Its increased levels in synovial fluid and articular cartilage of OA patients is correlated to radiographic findings (WANG et al., 2014) and its action is thought to be related to calcium hydroxyapatite's deposition on cartilage (JIN, 2011).

Primarily anti-inflammatory cytokines may even exert an opposite role in rheumatic diseases (KIM et al., 2012). Interleukin 22, an IL-10-related protein, is involved in both innate and adaptive immune system regulation and tissue repair (ZENEWICZ & FLAVELL, 2011), but can be pathogenic depending on the target tissue (RUTZ et al., 2013). It is expressed by synoviocytes of patients with OA (DELIGNE et al., 2014), thus increasing metalloproteinase expression (CARRIÓN et al., 2013). In addition, IL-22 promotes bone remodelling (PAINE & RITCHLIN, 2016), which is an important process in OA.

Interleukin 31 (IL-31) is a pleiotropic cytokine produced preferentially by activated Th2 cells, which has the regulation of immune response and haematopoiesis as biological functions (ZHANG et al., 2008). Despite of being highly capable of induce IL-6 expression (CORNELISSEN et al., 2012), IL-31's role in inflammation is still unknown and controversial, as its activity seems to be tissue-specific (SAITO et al., 2017). Increased serum levels of IL-31 seems to be correlated to a low mineral density of bones in other arthritis group's diseases (ROSINE et al., 2018). Andersson and colleagues (2015) showed that IL-31 can be produced by Th17 cells of patients with rheumatoid arthritis.

In this context, we aimed to quantify the serum levels of IL-16, IL-18, IL-22 and IL-31 in OA patients from a hospital in northeast region of Brazil, also evaluating the correlation with their clinical features.

Materials and methods

Study Participants and sample collection

This study was approved by Human Ethics Committee of the Health Sciences Center (process number: 58263116.5.0000.5208), located at Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil. We recruited 78 patients with OA diagnosis, attended in the Rheumatology Outpatient Clinic (UFPE). They were both male and female over 45 years of age, without autoimmune, infectious or neoplastic diseases. The sera of 83 healthy aged volunteers were used as the control group. They were free of any inflammatory conditions, including neoplastic, autoimmune or infectious diseases; also, they were not under any pharmacological usage. Each respondent donated 9 ml of blood, which was centrifuged at 2000 rpm during 10 minutes for serum separation and collection.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Cytokines quantification was performed by sandwich ELISA (R&D Systems®, Minnesota, USA), according to the manufacturer's guidelines. Minimum limits for detection of IL-16, IL-18, IL-22 and IL-31 were 7.8125 pg/ml, 46.875 pg/ml, 7.8125 pg/ml and 62.5 pg/ml, respectively.

Statistical analysis

To evaluate the normality of data, we applied the D'Agostino-Pearson omnibus normality test; in order to compare the cytokine quantification of patients with levels in the control group we used the Mann-Whitney test. Cytokine values and clinical features correlations were evaluated through Spearman's rank correlation test. Results were considered significant when $p < 0,05$.

Results

Patients' characterization

Out of 78 patients, 74 were female and only 4 were male, whereas the mean age between them were 59,1 years. As showed in table 2, 51% were affected by knee OA and 28,2% by hand OA. Shoulders (16%), column (14%) and hips (11,5%) represent less affected sites. It is worth pointing out that many of these patients have simultaneous impairment of two or more articulation.

Only 4 patients (5,1%) were active smokers, and 80,4% had some OA associated comorbidity, as systemic arterial hypertension (SAH) (51,2%), dyslipidemia (21,7%),

diabetes mellitus (20,5%) or depression (10,2%). At the moment of appointment, fifty five patients (70,5%) showed signals as crepitus and Heberden/Bouchard nodes, whereas 39,7% had radiographic findings (e.g.: articular space narrowing, subchondral sclerosis and osteophytes

Regarding the treatment, over half of them (53,8%) were under pharmacological management, but only a few (21,7%) had physiotherapy or some kind of physical activity. Curiously, only 3 were using some NSAID or glucocorticoid.

Table 1 – Social characteristics of respondents

	Healthy control (n = 83)	Patients (n = 78)
Age (years)		
Mean \pm SD	41,76 \pm 12,87	59,1 \pm 9,51
Sex – n (%)		
Female	63 (75,9)	74 (94,8)
Male	20 (24,1)	4 (5,1)

Values with a Gaussian distribution are represented by mean \pm sd.

Table 2 – Clinical features of patients

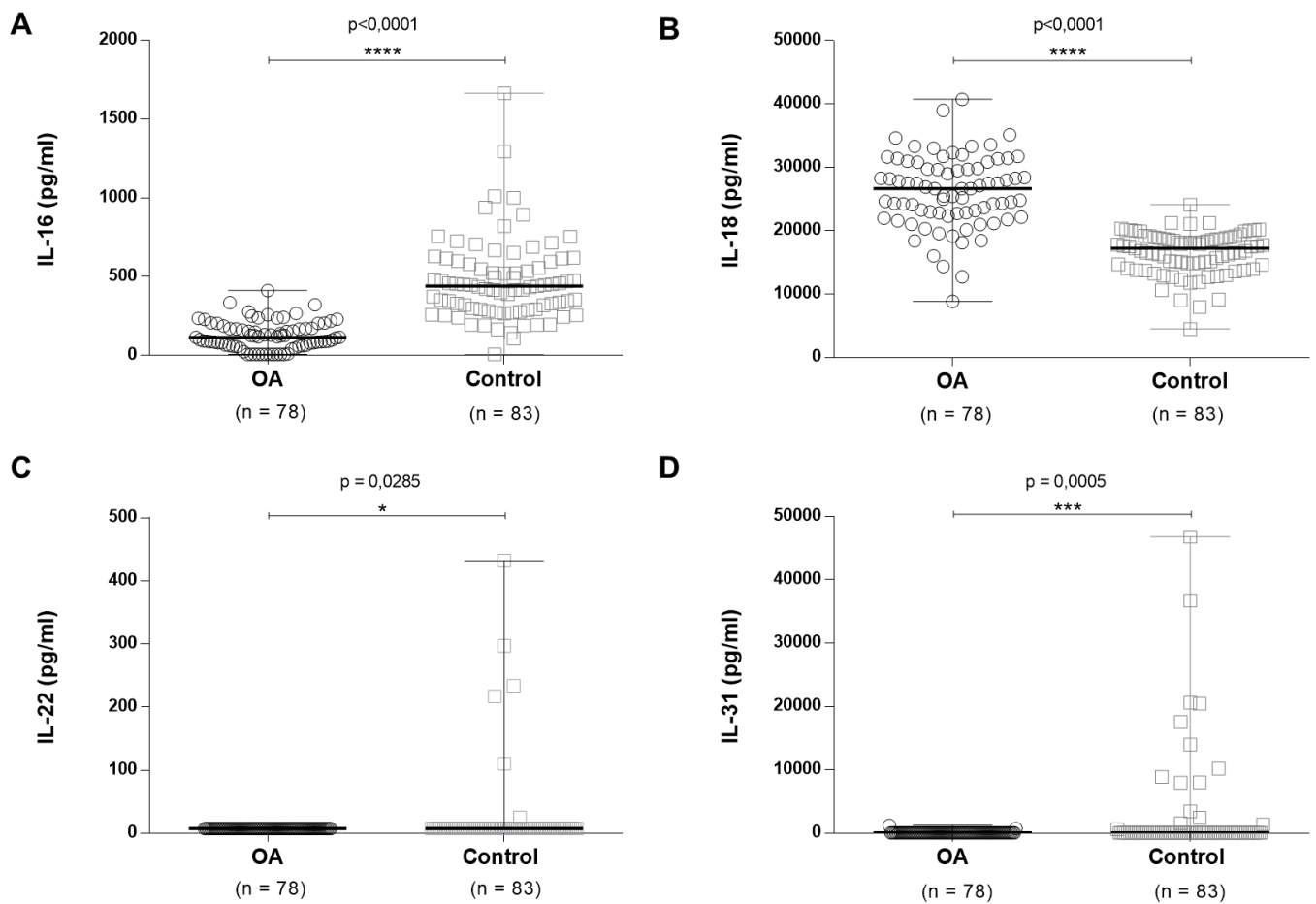
Features	Patients (n = 78)
Affected joint – n (%)	
Vertebral column	11 (14,1)
Elbow	6 (7,6)
Knee	40 (51,2)
Hand	22 (28,2)
Shoulder	13 (16,6)
Fist	6 (7,6)
Hip	9 (11,5)
Ankle	4 (5,1)
Smoke habit – n (%)	
Never	28 (35,8)
Inactive	6 (7,6)
Active	4 (5,1)
Clinical examination – n (%)	
Edema	11 (14,1)
Pain	61 (78,2)
Signals (crepitus, nodules)	55 (70,5)
Radiographic findings – n (%)	
	31 (39,7)
Comorbidities – n (%)	
	61 (80,4)
Dyslipidemia	17 (21,7)
Diabetes mellitus	16 (20,5)
Fibromyalgia	7 (8,9)
Systemic arterial hypertension	40 (51,2)
Hypothyroidism	9 (11,5)
Osteoporosis	9 (11,5)

Anxiety/Depression	8 (10,2)
Other conditions	23 (29,4)
Treatment – n (%)	
Pharmacological	42 (53,8)
Analgesic	28 (35,8)
NSAID/glucocorticoid	3 (3,8)
DMOAD	26 (33,3)
Non-pharmacological	17 (21,7)

IL-18, but not IL-16, IL-22 or IL-31, is increased in serum of patients

We found significant increased levels of IL-18 in sera of patients when compared with control group ($p < 0,0001$), as depicted in figure 1B. IL-16 were detected in both group, although it was higher in healthy volunteers ($p < 0,0001$). Neither IL-22 or IL-31 were detected in samples of patients, but showed higher levels in some control sera ($p = 0,0285$ and $p = 0,0005$, respectively)

Figure 1 – Serum levels of cytokines in patients and control group



Correlation with clinical features

Neither IL-16 ($p = 0,8458$; $r = 0,0226$) or IL-18 ($p = 0,074$; $r = 0,2057$) levels showed significant correlation with the age of patients. Moreover, the other clinical features, like comorbidities, quantity of affected articulations or type of treatment, for example, did not show to be correlated with any of these two cytokines concentrations.

Discussion

OA is a rheumatic disease whose pathogenesis is characterized by cartilage degradation – a process highly mediated by inflammatory agents, like interleukins. However, none of these mediators was incorporated in clinical practice as a diagnosis, prognosis or therapeutic response biomarker. This study aimed to contribute with the search of a representative molecule to OA, which is the most common rheumatic disease.

IL-16 is a pleiotropic cytokine, exerting both pro and anti-inflammatory roles (LUHESHI et al., 2009). Therefore, although involved in inflammatory processes, this interleukin can stimulate synthesis of IL-10 and contribute to homeostasis (RICHMOND et al., 2014). It could justify the fact that IL-16 is present in serum of OA patients, but is significantly elevated in healthy volunteers ($p < 0,0001$). Moreover, in a comparative study, Murota and colleagues (2016) found higher concentrations of IL-16 in patients with RA than in those with OA.

The patients of our study showed significantly increased levels of IL-18 when compared to control group ($p < 0,0001$), corroborating the findings of Wang and others (2014), in which IL-18 was significantly concentrated in plasma of OA patients; they also found a positive correlation with disease severity. Even though we noticed a pattern of higher levels of IL-18 in older patients, something that Tired and colleagues (2005) observed at genetic level, the result was not significant ($p = 0,00746$). The heterogeneity of our patients may have prevented the achievement of an accurate analysis.

IL-22 is a member of IL-10 family, whose functions include protection against damage and repair induction (TRIVELLA et al., 2010). The increased levels we found in healthy volunteers may be related to these protector mechanisms. Several studies showed that IL-22 can act and participate in diseases, but this pathological role is thought to be activated only under influence of IL-17 (RUTZ et al., 2013), a pro-inflammatory cytokine that apparently gives a higher contribution to RA pathogenesis than to OA (HONORATI et al., 2002; LIU et al., 2015).

Our study was the first to evaluate the serum concentration of IL-31 in patients with OA and to compare it with healthy individuals. All the patients showed undetectable values, whereas some volunteers of control group exhibited high levels of this cytokine ($p = 0,0005$). Similarly, Ashari and colleagues (2014) found high levels of IL-31 in healthy volunteers. IL-31 is an IL-6 superfamily interleukin, secreted mainly by T helper CD4+ cells, which trigger pro-inflammatory effects in diseases like atopic dermatitis, asthma and RA (ZHANG et al.,

2008). Its contribution to OA is still unknown, but it seems to exert a dual role in spondyloarthritis, for example, increasing bone resorption and protecting against damage at the same time (ROSINE et al., 2018).

Conclusion

In summary, the present study showed that IL-18 is significantly increased in serum of OA patients from northeast region of Brazil than those in healthy individuals. Despite lacking correlation with clinical features, this cytokine could be an important source of investigation to understand the complex pathogenesis of OA.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

We acknowledge the support by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Instituto de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if).

References

ANDERSSON, Karin M E; CAVALLINI, Nicola Filluelo; HU, Dan; BRISSLERT, Mikael; Ron CIALIC; Hadi VALADI; Malin C ERLANDSSON; Sofia SILFVERSWÄRD; Rille PULLERITS; Vijay K KUCHROO; Howard L WEINER; Maria I BOKAREWA. Pathogenic Transdifferentiation of Th17 Cells Contribute to Perpetuation of Rheumatoid Arthritis during Anti-TNF Treatment. **Mol Med**, vol. 21: 536-543, 2015.

ASHARI, Noor Suryani Mohd; AMIN, Siti Noor Syuhada Mohd; HAMID, Wan Zuraida Wan Abdul; MUSA, Mustaffa; RAHMAN, Azriani Abdul; MOHAMAD, Irfan. Determination of interleukin 31 (IL-31) serum levels in allergic rhinitis patients.

International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine, vol. 1, 69e72, 2014.

BRAZILIAN SOCIETY OF RHEUMATOLOGY, 2017. Available at:

<<https://www.reumatologia.org.br>>. Accessed in: 16 July 2018.

CARRIÓN, Mar; JUARRANZ, Yasmina; MARTÍNEZ, Carmen; GONZÁLEZ-ÁLVARO, Isidoro; PABLOS, José L.; GUTIÉRREZ-CANAS, Irene; GOMARIZ, Rosa P. IL-22/IL-

22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Rheumatology**, vol. 52:2177-2186, 2013.

CORNELISSEN, Christian; LÜSCHER-FIRZLAFF, Juliane; BARONB, Jens Malte; LÜSCHERA, Bernhard. Signaling by IL-31 and functional consequences. **European Journal of Cell Biology**, 91:552– 566, 2012.

COSTA, Bruno R. da; HARI, Roman; JÜNI, Peter. Intra-articular Corticosteroids for Osteoarthritis of the Knee. **JAMA**, Volume 316, Number 24, 2016.

DELIGNE, C.; S. CASULLI; A. PIGENET; C. BOUGAULT; L. CAMPILLO-GIMENEZ; G. NOURISSAT; F. BERENBAUM; C. ELBIM; X. HOUARD. Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 23, 1843e1852, 2015.

HONORATI, M. C.; BOVARA, M.; CATTINI, L.; PIACENTINI, A.; FACCHINI, A. Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol. 10, 799–807, 2002.

JIN, C.; FRAYSSINET, P.; PELKER, R.; CWIRKA, D.; HU, B.; VIGNERY, A.; EISENBARTH, S. C.; FLAVELL, R. A. NLRP3 inflammasome plays a critical role in the pathogenesis of hydroxyapatite-associated arthropathy. **Proc Natl Acad Sci USA**, vol., 108(36):14867-72, 2011.

KIM, Kyoung-Woon; KIM, Hae-Rim; PARK, Jin-Young; PARK, Jin-Sil; OH, Hye-Jwa; WOO, Yun-Ju; PARK, Mi-Kyung; CHO, Mi-La; LEE, Sang-Heon. Interleukin-22 Promotes Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis Through Induction of RANKL in Human Synovial Fibroblasts. **Arthritis & Rheumatism**, vol., 64(4), pp 1015–1023, 2012.

LAIRES, Pedro A.; CANHÃO, Helena; RODRIGUES, Ana M.; EUSÉBIO, Mónica; GOUVEIA, Miguel; BRANCO, Jaime C. The impact of osteoarthritis on early exit from work: results from a population-based study. **BMC Public Health**, 18:472, 2018.

LITWIC, Anna; EDWARDS, Mark; DENNISON, Elaine; COOPER, Cyrus. Epidemiology and Burden of Osteoarthritis. **Br Med Bull.**, 105: 185–199, 2013.

LIU, Yingsong; PENG, Hao; MENG, Zhao; WEI, Mingzhu. Correlation of IL-17 Level in Synovia and Severity of Knee Osteoarthritis. **Med Sci Monit**, vol. 21: 1732-1736, 2015.

LIU, Zhibao; MA, Li; QIU, Shenqiang; JIA, Tanghong. Genetic polymorphisms of interleukin-16 are associated with susceptibility to primary knee osteoarthritis. **Int J Clin Exp Med**, 8(1):1401-1405, 2015.

LUHESHI, N. M.; ROTHWELL, N. J.; BROUGH, D. Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: implications for anti-interleukin-1 therapy. **British Journal of Pharmacology**, vol. 157, 1318–1329, 2009.

MUROYA, Atsuko; SUZUKI, Katsuya; KASSAI, Yoshiaki; MIYAZAKI, Takahiro; MORITA, Rimpei; KONDO, Yasushi; TAKESHITA, Masaru; NIKI, Yasuo; YOSHIMURA, Akihiko; TAKEUCHI, Tsutomu. Serum proteomic analysis identifies interleukin 16 as a biomarker for clinical response during early treatment of rheumatoid arthritis. **Cytokine**, 78:87–93, 2016.

PAINE, Ananta; RITCHLIN, Christopher. Bone remodeling in psoriasis and psoriatic arthritis: an update. **Curr. Opin. Rheumatol.**, 28:66–75, 2016.

PEDADDA, Krishi V.; PEDDADA, Kranti Venkata; SHUKLA, Surendra K.; MISHRA, Anusha; VERMA, Vivek. Role of curcumin in common musculoskeletal disorders: a review of current laboratory, translational, and clinical data. **Orthopaedic Surgery**, 7:222–231, 2015.

RANNOU, François; SELAM, Jeremy; Francis Berenbaum. Physiopathologie de l'arthrose : conceptions actuelles. **Presse Med.**, 39: 1159–1163, 2010.

REZENDE, Márcia U. de; CAMPOS, Gustavo C. de; PAILO, Alexandre F. Conceitos Atuais em Osteoartrite. **Acta Ortop Bras.**, 21(2): 120-2, 2013.

RICHMOND, Jillian; TUZOVA, Marina, CRUIKSHANK, William; CENTER, David. Regulation of Cellular Processes by Interleukin-16 in Homeostasis and Cancer. **J. Cell. Physiol.** 229: 139–147, 2014.

ROSINE, Nicolas; ETCHETO, Adrien; HENDEL-CHAVEZ, Houria; SEROR, Raphaële; BRIOT, Karine; MOLTO, Anna; CHANSON, Philippe; TAOUFIK, Yassine; Daniel; WENDLING, Lories; BERENBAUM, Francis; BERG, Rosaline van den; CLAUDEPIERRE, Pascal; FEYDY, Antoine; DOUGADOS, Maxime; ROUX, Christian; MICELI-RICHARD, Corinne. Increase In IL-31 Serum Levels Is Associated With Reduced Structural Damage In Early Axial Spondyloarthritis. **Scientific Reports**, 8:7731, 2018.

RUTZ, Sascha; EIDENSCHENK, Céline; OUYANG, Wenjun. IL-22, not simply a Th17 cytokine. **Immunological Reviews**, vol. 252: 116–132, 2013.

SAITO, S.; AOKI, A.; ARAI, I.; TAKAISHI, S.; ITO, H.; AKIYAMA, N.; KIYONARI, H. Regulation of Th2 responses by different cell types expressing the interleukin-31 receptor. **Allergy Asthma Clin Immunol.**, vol. 13:23, 2017.

SHERWOOD, Joanna C.; BERTLAND, Jessica; ELDRIDGE, Suzanne E.; DELL'ACCIO, Francesco. Cellular and molecular mechanisms of cartilage damage and repair. **Drug Discovery Today**, vol. 19, 2014.

SINGH, Jasvinder A.; NOORBALOOCHI, Siamak; KNUTSON, Keith L. Cytokine and neuropeptide levels are associated with pain relief in patients with chronically painful total knee arthroplasty: a pilot study. **BMC Musculoskeletal Disorders**, 18:17, 2017.

STUPINA, T. A.; STEPANOV, M. A.; TEPLÉN'KII, M. P. Role of Subchondral Bone in the Restoration of Articular Cartilage. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, vol. 158, No. 6, 2015.

THYSEN, Sarah; LUYTEN, Frank P.; LORIES, Rik J. U. Targets, models and challenges in osteoarthritis research. **Dis Model Mech.**, vol. 8(1): 17–30, 2015.

TIRET, Laurence; GODEFROY, Tiphaine; LUBOS, Edith; NICAUD, Viviane; TREGOUET, David-Alexandre; BARBAUX, Sandrine; SCHNABEL, Renate; BICKEL, Christoph; ESPINOLA-KLEIN, Christine; POIRIER, Odette; PERRET, Claire; MÜNZEL, Thomas; RUPPRECHT, Hans-Jurgen; LACKNER, Karl; CAMBIEN, François; BLANKENBERG, Stefan. Genetic Analysis of the Interleukin-18 System Highlights the Role of the Interleukin-18 Gene in Cardiovascular Disease. **Circulation**, vol. 112:643–650, 2005.

TRIVELLA, Daniela Barretto Barbosa; FERREIRA-JÚNIOR, José Ribamar; DUMOUTIER, Laure; RENAULD, Jean-Christophe; POLIKARPOV, Igor. Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family. **Cell. Mol. Life Sci.**, vol. 67:2909–2935, 2010.

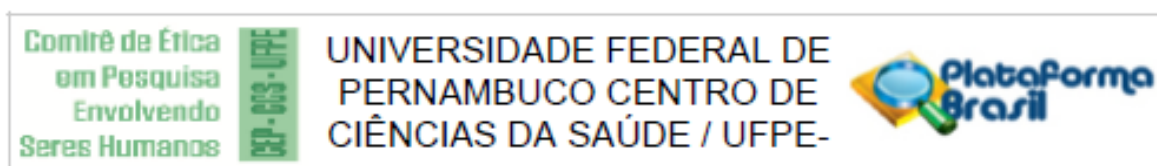
WANG, P.; ZHU, F.; KONSTANTOPOULOS, K. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 expression in human chondrocytes via cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinasedependent NF- κ B activation. **American Journal of Physiology—Cell Physiology**, vol. 298, no. 6, pp. C1445–C1456, 2010.

WANG, Youhua; XU, Dawei; LONG, Long; DENG, Xiaolong; TAO, Ran; HUANG, Guicheng. Correlation between plasma, synovial fluid and articular cartilage Interleukin-18 with radiographic severity in 33 patients with osteoarthritis of the knee. **Clin Exp Med**, vol.14:297–304, 2014.

ZENEWICZ, L. A; FLAVELL, R. A. Recent advances in IL-22 biology. **Int Immunol.**, vol. 23(3):159-63, 2011.

ZHANG, Qing; PUTHETI, Prabhakar; ZHOU, Qiang; LIU, Quansheng; GAO, Wenda. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, vol. 19(5-6): 347–356, 2008.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM SERES HUMANOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in vitro e in vivo dos mecanismos imunomodulatórios da curcumina e de novos derivados tiazolidínicos em pacientes portadores de Osteoartrite de Joelho

Pesquisador: Priscilla Stela Santana de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58263116.5.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.777.025

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado intitulado "Avaliação in vitro e in vivo dos efeitos imunomodulatórios da curcumina e de novos derivados tiazolidínicos em pacientes portadores de Osteoartrite.". Será desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica - PPGIT por Priscilla Stela Santana de Oliveira orientada por Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta e co-orientada por Profa. Michelly Cristiny Pereira e Profa. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte. Na pesquisa, será avaliada a citotoxicidade dos derivados tiazolidínicos e da curcumina em células do sangue periférico e condrócitos da cartilagem que recobre as extremidades dos ossos do joelho, de pacientes com artrose, bem como os efeitos imunomoduladores na liberação de moléculas inflamatórias e indução de apoptose celular.

ANEXO 2 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351

Fax: 2126 8350
www.ccbn.ufpe.br

Recife, 10 de julho de 2017

Ofício nº 58/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Michelly Cristiny Pereira**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Biociências
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0007/2017

Certificamos que a proposta intitulada “**avaliação in vitro e in vivo dos mecanismos imunomodulatórios da Simvastatina e Artovastatina em pacientes portadores de Osteoartrite de Joelho.**” registrada com o nº 0007/2017 sob a responsabilidade de **Prof.ª Michelly Cristiny Pereira** 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 07/06/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Janeiro 2018 a Dezembro de 2019
Espécie/ linhagem/raça	Rattus norvegicus/ Wistar
Nº de animais	24
Peso/Idade	400g
Sexo	Macho
Origem	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE

Atenciosamente,


 Prof. Secundo R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345541