



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

PRISCILLA STELA SANTANA DE OLIVEIRA

Efeitos da atorvastatina, *in vitro* e *in vivo*, em modelos experimentais de osteoartrite

Recife

2019

PRISCILLA STELA SANTANA DE OLIVEIRA

Efeitos da atorvastatina, *in vitro* e *in vivo*, em modelos experimentais de osteoartrite

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito obrigatório para a obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientadoras: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira

Profa Dra. Ana Cristina Falcão Esteves

Recife

2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Oliveira, Priscilla Stela Santana de

Efeitos da atorvastatina, in vitro e in vivo, em modelos experimentais de osteoartrite / Priscilla Stela Santana de Oliveira - 2019.

104 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadoras: Michelly Cristiny Pereira e Ana Cristina Falcão Esteves

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Osteoartrite 2. Estatinas 3. Citocinas I. Pitta, Máira Galdino da Rocha (orient.) II. Pereira, Michelly Cristiny (coorient.) III. Esteves, Ana Cristina Falcão (coorient.) IV. Título

616.7223

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-021

PRISCILLA STELA SANTANA DE OLIVEIRA

Efeitos da atorvastatina, *in vitro e in vivo*, em modelos experimentais de osteoartrite

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito obrigatório para a obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica

Aprovada em 25/11/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta
Departamento de Bioquímica- UFPE

Profa. Dra. Claudia Diniz Marques Lopes
Departamento de Medicina Clínica –UFPE

Profa. Dra. Dayane Aparecida Gomes
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

Prof Dr. Mario Ribeiro de Melo Jr.
Departamento de Patologia - UFPE

Prof. Dra Mariana Brayner Cavalcanti Bezerra
Departamento de Energia Nuclear - UFPE

*Ao meu futuro e ao meu passado;
Minha história e meu legado,
Conceição e Heloisa*

AGRADECIMENTOS

À minha dedicada mãe, **Maria da Conceição**, pelo suporte emocional, estrutural, logístico e financeiro. Essa tese só foi possível graças a ela que deu o colo, alimento, presença, atenção e amor à minha filha, **Heloisa**, nos momentos que precisei me ausentar para fazer esse trabalho.

À família querida, **Henrique** (pai), **Fátima** (tia), **Anderson** (irmão), **Ana** (tia), **Margô** (cunhada) e **Miguelzinho** (sobrinho). Não posso esquecer de **Ednalda** (Tia Ed) que cuidou de Helô recém-nascida e me deu segurança para voltar as atividades. À **Tia Nice**, **Tia Lúcia**, **Tia Kiu**, **Tio Lau** e todo meu povo de Olinda!

À família paterna de **Heloisa**, que sempre se colocou à disposição para ajudar em vários momentos!

Aos amigos da vida toda, **Jan**, **Carol**, **Camila**, **Rhaissa**, **Rafael**, **meninas do herrer**, **Mari Leite** por tantas lembranças que deixaram essa jornada mais leve.

À **Marcos**, que chegou e trouxe a tranquilidade e a leveza que eu precisava.

Ao meu **OSTEOTEAM**, **Kalebe** e **Vanessa**, que me ensinaram tanto durante essa caminhada. Choraram comigo nos percalços desse projeto, sorriram os resultados que, demoraram, mas chegaram!

Aos amigos, **Pablo**, **Kalebe**, **Vanessa**, **Marina xuxinha**, **Say**, **Rezinha**, **Fernanda**, **Antônio**, **Flavi**, pela amizade que ultrapassou as barreiras do laboratório!

À **Antônio Felix**, pelo aprendizado na IHQ; à **Flaviana**, pelo conhecimento compartilhado nas citometrias e tantas outras técnicas; à **Michael**, por não deixar

que eu madrugasse no laboratório montando as lâminas de IHQ; à **Valecia**, por deixar usar o microscópio de fluorescência nos fds e sem agendamento prévio! À **Wivi**, pelo auxílio no escaneamento do material.

À todo corpo técnico e a veterinária **Cláudia** do biotério de fisiologia e farmacologia!
À seu **Hilde**, pelas recepções calorosas no departamento

À **Anderson**, prof. do departamento de anatomia, o que seria da histologia do trabalho se não fosse a paciência, eficiência, organização e comprometimento deste virginiano mais virginiano do que eu?

À **Dra. Ângela**, chefe do setor de reumatologia do HC, pela iniciativa de propor o estudo da osteoartrite. Às residentes da Reumato à época, **Raquel e Vanessa**, pelo auxílio direto no recrutamento dos pacientes.

Às co-orientadoras mais amigas dessa vida, **Michelly e Titina**. Como agradecer tanto suporte científico, técnico e emocional? Vocês substancialmente contribuíram para meu amadurecimento pessoal e profissional!

À minha única orientadora da vida toda, **Maira Pitta**, desde os primórdios de 2010 acreditou no meu potencial. Sinto orgulho de dizer que fui sua primeira aluna de I.C. e cá estou eu finalizando o doutorado.

Á Paulo **Germano**, exemplo de servidor público e melhor secretário que o PPGIT poderia ter! Sempre disponível, acessível e, principalmente, humano!

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (**FACEPE**), pelo fomento.

“Não importa o quanto a vida possa ser ruim,
sempre existe algo que você pode fazer e
triunfar. Enquanto há vida, há esperança”

Stephen Hawking

RESUMO

A Osteoartrite (OA) é uma condição crônica caracterizada pela degradação da cartilagem e alterações ósseas. Estudos clínicos correlacionaram o uso de estatinas, fármacos hipolipemiantes, com a diminuição da incidência e progressão da doença. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade da atorvastatina (ATV) de: (i) modular a produção de citocinas em amostras de pacientes; (ii) alterar o processo apoptótico e expressão de agregano em células de ratos e (iii) interferir na degradação articular em modelo animal de osteoartrite. Para tanto, os sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com osteoartrite foram avaliados quanto aos níveis de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF após tratamento com ATV. Em paralelo, condrócitos de ratos foram estimulados com IL-1 β recombinante e ATV para avaliação do percentual de apoptose e expressão das proteínas caspase-3, bcl-2 e agregano. Ademais, ratos Wistar foram submetidos à indução cirúrgica de osteoartrite para posterior tratamento com ATV ou prednisona (PRED). Os animais foram avaliados quanto as alterações histopatológicas e expressão de agregano. Os resultados obtidos *in vitro* mostraram que, em comparação com a condição de estímulo, a ATV inibiu de maneira significativa a secreção de IL-10 em todas as concentrações ($p < 0,01$). Efeito semelhante foi observado para as concentrações de 50 μM ($p = 0,0046$) e 100 μM ($p = 0,0008$) quanto aos níveis de TNF. O mesmo efeito inibidor não foi constatado para os níveis de IL-1 β e IL-6. O percentual de apoptose celular aumentou de 3,9% para 5% em média com adição da IL-1 β . O tratamento da ATV à 10 μM durante 24h diminuiu o percentual para 2,9%. A marcação da caspase-3 foi observada no núcleo das células e apenas nas condições de IL-1 β isolada e em combinação à ATV 10 μM . A marcação de bcl-2, por sua vez, foi observada no citoplasma das células em todas as condições. A IL-1 β alterou também a morfologia citoplasmática dos condrócitos por meio da marcação do agregano. Contudo, com o tratamento da ATV à 1 μM foi possível observar condrócitos com morfologia celular preservada. Por fim, os resultados preliminares do modelo animal mostraram que não houve diferenças histológicas nem de marcação do agregano entre os ratos tratados com ATV e PRED. Há indícios de que a ATV module *in vitro* a morfologia celular e as proteínas IL-10, TNF, caspase-3 e Bcl-2. Estas moléculas fazem parte de vias que são implicadas na fisiopatologia da doença. O estudo da osteoartrite permanece desafiador, porém necessário diante do crescente casuística e da falta de alternativas terapêuticas eficazes.

Palavras-chave: articulação. estatinas. citocinas. apoptose. ratos

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a chronic osteoarticular condition characterized by artilage degradation and bone changes. Clinical studies have correlated that both the incidence of the disease and its progression decrease with the use of statins, a hypolipidemic drugs. This study aims to investigate in vitro the ability of atorvastatin (ATV) to modulate cytokine production in patient samples, interfere with apoptosis and aggrecan expression in murine chondrocytes and, finally, mitigate joint degradation in an animal model of osteoarthritis. For this, supernatants of peripheral blood mononuclear cell cultures (PBMCs) from arthrosis patients were evaluated for IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF levels after ATV treatment. In parallel, rat chondrocytes were cultured and stimulated with recombinant IL-1 β and ATV to evaluate apoptosis and caspase-3, bcl-2, and aggrecan proteins. In addition, Wistar rats underwent to osteoarthritis surgical induction for further treatment with ATV or prednisone (PRED). The animals were evaluated for histopathological changes and aggrecan expression. In vitro results showed that, compared to the stimulus condition, atorvastatin significantly inhibited IL-10 secretion at all concentrations ($p < 0.01$). A similar effect was observed on 50 μM ($p = 0.0046$) and 100 μM ($p = 0.0008$) concentrations for TNF levels. The same inhibitory effect was not found for IL-1 β and IL-6 levels. The percentage of cellular apoptosis increased from 3.9% to 5% on average with the addition of IL-1 β . ATV treatment at 10 μM for 24h decreased the percentage to 2.9%. Caspase-3 labeling was observed in the cell nucleus only under IL-1 β alone condition and combined with ATV at 10 μM . Bcl-2 labeling, in turn, was observed in cell cytoplasm under all conditions. IL-1 β also altered the cytoplasmic morphology of chondrocytes seen through aggrecan labeling. However, with the addition of ATV at 1 μM it was possible to observe cells with preserved morphology. Preliminary results from the animal model showed no histological differences between the rat groups. There is evidence that ATV modulates the cellular morphology and expression of IL-10, TNF, caspase-3, and bcl-2 proteins. These molecules are part of the pathways that are implicated in the pathophysiology of the disease. The study of osteoarthritis remains challenging but necessary against casuistic growth and lack of therapeutic alternatives.

Keywords: articulation. statins. cytokines. apoptosis. rats

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Componentes da articulação do joelho e seus respectivos elementos celulares. Fonte: autor (2019).....	26
Figura 2-	Fotomicrografias de cortes histológicos frontais dos epicôndilos tibiais corados por safranina-o provenientes de ratos Wistar (40X). Fonte: autor (2019).....	28
Figura 3-	Fotomicrografia de corte histológico frontal do epicôndilo femoral de rato Wistar corado por hematoxilina/eosina (40X). Fonte: autor (2019)	29
Figura 4-	Desenho esquemático da interação entre células e mediadores nos estágios iniciais do desenvolvimento da AO. Fonte: autor (2019).....	31
Figura 5-	Vias de ativação da apoptose induzidas por IL-1 β e TNF em condrócitos. Fonte: autor (2019).....	34
Figura 6-	Técnicas de cultivo de células <i>in vitro</i> e suas especificidades na OA. Fonte: autor (2019).....	36
Figura 7-	Estruturas químicas das estatinas. Fonte: autor (2019).....	39
Figura 8-	Estatinas inibem a transcrição de citocinas via repressão da translocação do NF- κ B ao núcleo. Fonte: autor (2019).....	43
Figura 9-	Fluxograma do plano de trabalho. Fonte: autor (2019).....	45
Figura 10-	Características microscópicas do isolamento e cultivo de condrócitos primários murinos. Fonte: autor (2019).....	50
Figura 11-	Caracterização fenotípica de cultura primária de condrócitos com a marcação das proteínas colágeno tipo 2 e CD44. Fonte: autor (2019)...	50
Figura 12-	Etapas da cirurgia do modelo de osteoartrite baseado na menisectomia medial (MM) associada a transecção do ligamento colateral medial (TLCM). Fonte: autor (2019).....	53
Figura 13-	Percentual médio de viabilidade em PBMCs de voluntários sadios tratados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de atorvastatina. Fonte: autor (2019).....	56

Figura 14-	Níveis de A) TNF B) IL -10 C) IL -1 β D) IL -6 no sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com osteoartrite. Fonte: autor (2019).....	57
Figura 15-	Percentual médio de viabilidade em condrócitos murinos tratados <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de atorvastatina. Fonte: autor (2019).....	58
Figura 16-	Efeito da atorvastatina na morte celular induzida por IL-1 β em condrócitos. Fonte: autor (2019).....	59
Figura 17-	Fotomicrografia de condrócitos murinos marcados <i>in vitro</i> para as proteínas caspase-3 (verde) e Bcl-2 (vermelho). Fonte: autor (2019)....	60
Figura 18-	Fotomicrografia representativa de condrócitos murinos marcados <i>in vitro</i> para o proteoglicano agrecano (marrom). Fonte: autor (2019).....	61
Figura 19-	Variação do peso corporal de ratos Wistar induzidos a modelo cirúrgico de osteoartrite. Fonte: autor (2019).....	62
Figura 20-	Avaliação do dano articular pela graduação de Mankin em modelo cirúrgico de osteoartrite em ratos. Fonte: autor (2019).....	63
Figura 21-	Fotomicrografias de cortes histológicos da porção medial dos cêndilos tibiais de ratos Wistar submetidos a indução de osteoartrite e tratados com atorvastatina e prednisona. Fonte: autor (2019).....	64
Figura 22-	Condrócitos positivos para o agrecano em cortes histológicos da cartilagem de ratos conduzidos em protocolo experimental de osteoartrite. Fonte: autor (2019).....	66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1-	Critérios classificatórios da osteoartrite. Fonte: ALTMAN, R. 1986;1990;1991.....	24
Quadro 2-	Principais modelos animais em osteoartrite. Fonte: autor (2018)...	37
Quadro 3-	Relação de estudos na área de modulação de citocinas por estatinas <i>in vitro</i> . Fonte: autor (2018).....	42
Quadro 4-	Especificações do kit multiplex <i>human inflammatory</i> (BD Bioscience). Fonte: autor (2019).....	49
Quadro 5-	Anticorpos usados no trabalho e especificações. Fonte: autor (2019).....	52
Quadro 6-	Distribuição dos animais nos grupos experimentais e regimes de tratamento. Fonte: autor (2019).....	54
Tabela 1-	Perfil clínico dos pacientes com osteoartrite recrutados do HC/UFPE para cultura de PBMC.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American College of rheumatology</i> (Colégio Americano de Reumatologia)
AIC	Artrite induzida por colágeno
AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
Anti-CCP	Anticorpo anti-peptídeo citrulinado
ASPN	Gene do proteoglicano asporina
AR	Artrite Reumatóide
ATV	Atorvastatina
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i> (Citometria baseada em arranjo de microesferas)
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CEUA	Comitê de ética em uso de animais
CMV	Citomegalovirus
COL2A1	Gene da cadeia de colágeno tipo 2 alfa 1
COL11A1	Gene da cadeia de Colágeno Tipo11 Alpha 1
COL11A2	Gene da cadeia de Colágeno Tipo11 Alpha 2
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAS28	<i>Disease activity score 28</i> (escore de atividade da doença – 28 articulações)
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i> (complexo sinalizador indutor de morte)
DMCDOA	Drogas modificadoras do curso da doença Osteoartrite
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (sulfóxido de dimetilo)
ECR	Ensaio clínico randomizado
EULAR	<i>European League against rheumatism</i> (Liga Européia Contra o Reumatismo)
Fc	Fragmento cristalizável
GAG	Glicosaminoglicanos
GM-CSF	Fator estimulador de colonônia granulocítica monocítica

HC	Hospital das clínicas
HLA	<i>Human leucocitary antigen</i> (antígeno Leucocitário humano)
HMG-Coa	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA
IAM	Infarto Agudo do miocárdio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geociências e Economia
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
LINAT	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
FR	Fator Reumatóide
GDF5	Gene do Fator de Diferenciação de Crescimento 5
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
MM	Menisectomia medial
MMP	Metaloproteinase
MP	Metilprednisolona
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
PCR	Proteína C-reativa
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (célula mononuclear do sangue periférico)
PRED	Prednisona
RORγ-t	<i>Retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma</i> (receptor órfão relacionado OA ácido retinóico gamma tipo t)
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> (Fator transformante de crescimento beta)
TLCA	Transecção do ligamento cruzado anterior
TLCM	Trasecção do ligamento colateral medial
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
VSH	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Objetivos	19
1.1.1	Geral.....	19
1.1.2	Específicos.....	19
2	REFENCIAL TEÓRICO	20
2.1	Osteoartrite	20
2.1.1	Epidemiologia.....	20
2.1.2	Etiologia.....	21
2.1.3	Diagnóstico.....	23
2.1.4	Fisiopatologia.....	25
2.1.4.1	<i>Histologia e fisiologia da articulação normal</i>	25
2.1.4.2	<i>Mecanismo degenerativo-inflamatório</i>	29
2.1.4.3	<i>Mecanismo de apoptose na cartilagem artrósica</i>	32
2.1.5	Tratamento.....	35
2.1.6	Modelos de estudo <i>in vitro</i> da osteoartrite.....	36
2.1.7	Modelos animais em osteoartrite.....	37
2.2	Estatinas	38
2.2.1	Histórico e classificação química.....	38
2.2.2	Evidências de benefício clínico em doenças inflamatórias e autoimunes.....	40
2.2.3	Mecanismos moleculares mediadores dos efeitos pleiotrópicos.....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1	Delineamento do estudo	45
3.2	Locais de realização das etapas /Período de estudo	45
3.3	Considerações éticas da pesquisa	46
3.4	Fármacos	46
3.5	Recrutamento da população	46
3.6	Avaliação da citotoxicidade	48
3.7	Cultura de células mononucleares do sangue periférico	48

3.8	Quantificação de citocinas.....	48
3.9	Isolamento e cultura primária de condrócitos murinos.....	49
3.10	Condições experimentais <i>in vitro</i>	51
3.11	Avaliação da morte celular.....	51
3.12	Avaliação da expressão proteica.....	51
3.13	Indução cirúrgica de osteoartrite.....	52
3.14	Grupos experimentais e tratamentos <i>in vivo</i>	54
3.15	Processamento histológico e marcação proteica <i>in vivo</i>	54
3.16	Análise estatística.....	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Toxicidade da atorvastatina em células de voluntários sadios	56
4.2	Produção de citocinas por PBMCs de pacientes com osteoartrite após tratamento <i>in vitro</i> com atorvastatina.....	56
4.3	Toxicidade da atorvastatina em condrócitos murinos.....	57
4.4	Avaliação do efeito da atorvastatina na morte por apoptose em condrócitos murinos <i>in vitro</i>	58
4.5	Marcação proteica <i>in vitro</i> de Caspase-3 e Bcl-2 em condrócitos murinos.....	59
4.6	Marcação proteica <i>in vitro</i> de agregano em condrócitos murinos.....	60
4.7	Avaliação do peso corporal de ratos submetidos à MM associada a TLMC e tratados com atorvastatina e prednisona.....	62
4.8	Análises histológicas dos côndilos tibiais de ratos submetidos à MM associada a TLMC e tratados com atorvastatina e prednisona.....	62
4.9	Marcação do agregano nos côndilos tibiais de ratos submetidos à MM associada a TLMC e tratados com atorvastatina e prednisona.....	66
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÕES	74
7	PERSPECTIVAS	75
	REFERÊNCIAS	76

APÊNDICE A- Termo de consentimento livre e esclarecido....	97
APÊNDICE B – Ficha clínica.....	99
ANEXO A- Aprovação comitê de ética humano.....	100
ANEXO B- Aprovação comitê de ética animal.....	101
ANEXO C- Sistema de graduação histológica e histoquímica modificado de mankin. Fonte: OZCAN <i>et al.</i>,2017.....	102

1. INTRODUÇÃO

A Osteoartrite (OA), também designada com osteoartrite ou osteoosteoartrite, é uma doença crônica caracterizada pela degeneração da cartilagem articular e formação de osteófitos no osso subcondral. É a afecção reumática mais prevalente na população idosa e está intimamente ligada ao processo de envelhecimento (AMOAKO e PUJALTI, 2014). Apesar de estudada como uma única doença, é uma condição bastante heterogênea quanto à etiologia, manifestações clínicas e evolução (VAN SPIL *et al.*, 2019).

Os mecanismos fisiopatológicos da doença são complexos e localmente resultantes da interação de sinoviócitos, condrócitos, células inflamatórias e seus mediadores. As citocinas cumprem papel crucial nesse processo. O fator de necrose tumoral (TNF), do inglês *tumor necrosis factor*, tem papel central na ativação do processo inflamatório e remodelação óssea. Dentre seus efeitos, destaca-se a ativação de fibroblastos e macrófagos sinoviais os quais, por meio do fator nuclear *kappa B* (NF- κ B), aumentam a síntese de IL-1 e IL-6. Os efeitos dessas citocinas na articulação incluem ativação de osteoclastos, produção de espécies reativas de oxigênio, metaloproteinases (MMP) e agreganases (FARRUGIA e BARON, 2016). O processo degenerativo da cartilagem está associado não somente à perda da matriz extracelular como também à própria morte dos condrócitos (HWANG e KIM, 2015). De fato, sabe-se que a IL-1 β , principal citocina reguladora dos eventos na OA, é capaz de induzir na cartilagem a via mitocondrial de apoptose nos condrócitos por meio do estresse oxidativo (MUSUMECI *et al.* 2015).

A abordagem farmacológica para o tratamento da OA proporciona, em um primeiro momento, alívio sintomático. Entretanto, não há consenso sobre a eficácia dos medicamentos ditos modificadores da doença, principalmente em relação à dose administrada, efeitos colaterais e mecanismos de ação (RUTJES *et al.*, 2012, VASILADIS & TSIKOPOULOS, 2017). Em casos refratários ao tratamento preconizado, a única e última alternativa terapêutica disponível é a inserção de próteses no lugar de articulação com degenerações irreversíveis (FERREIRA *et al.*, 2017).

As estatinas são uma classe de fármacos que atuam como agentes hipolipemiantes, reduzindo a síntese do colesterol através da inibição competitiva e reversível da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA (HMG-CoA) redutase (DAVIES *et al.*, 2016). A recomendação primária destes agentes é para o uso na prevenção de doenças cardiovasculares

ateroscleróticas (HENDRANI *et al.* 2016). Entretanto, as estatinas vêm sendo investigadas para outras indicações como: distúrbios do metabolismo ósseo (UZZAN *et al.*, 2007), desordens neurológicas (BIFULCO *et al.*, 2008), síndrome do ovário policístico (KODAMAN *et al.*, 2008) e hipertensão pulmonar induzida por tabagismo (WRIGHT *et al.*, 2011). Estudos clínicos também evidenciaram a associação protetiva entre o uso de estatinas e desenvolvimento de osteoartrite (BEATTIE *et al.*, 2005; KADAM, BLAGOJEVIC e BELCHER, 2013; EYMARD *et al.* 2017).

No Brasil, estima-se que indivíduos com 65 anos ou mais corresponderão à 25,49% da população, além de uma expectativa de vida ao nascer superior à 80 anos (IBGE, 2019). Este fato impactará diretamente na incidência da osteoartrite no país, uma vez que como citado anteriormente, o processo de envelhecimento está intimamente relacionado ao desenvolvimento da doença.

Dessa forma, diante da projeção do perfil demográfico é necessário a busca de terapias farmacológicas eficazes e alternativas às existentes para a doença. Apesar do benefício clínico sugerido por alguns estudos, os dados sobre os mecanismos de ação das estatinas na osteoartrite são controversos. Portanto, este estudo visou investigar a ação da atorvastatina em moléculas envolvidas na inflamação, apoptose e matriz extracelular em modelos experimentais de AO.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Avaliar a atividade moduladora da atorvastatina sobre moléculas do sistema imune, morte celular programada e integridade da cartilagem em amostras de pacientes humanos e em modelo animal de osteoartrite.

1.1.2 Específicos

- Analisar, *in vitro*, o efeito da atorvastatina na produção de citocinas em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com osteoartrite;
- Analisar o efeito da atorvastatina sobre a apoptose e suas proteínas reguladoras, bem como proteoglicano de matriz em modelo *in vitro* de condrócitos de ratos estimulados por IL-1 β exógena;
- Avaliar, *in vivo*, o efeito de diferentes doses da atorvastatina no tratamento de ratos submetidos a indução cirúrgica de osteoartrite.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Osteoartrite

2.1.1 Epidemiologia

A OA, popularmente conhecida como osteoartrite, é uma desordem musculoesquelética que acomete as cartilagens e ossos, promovendo degeneração progressiva das articulações. Além do dano e perda de cartilagem, as modificações articulares incluem remodelação óssea subcondral, formação de osteófitos, frouxidão ligamentar, enfraquecimento dos músculos periarticulares e a inflamação sinovial de baixo grau. A doença pode ocorrer em qualquer articulação, mas observa-se com maior frequência nas grandes articulações que suportam carga, notadamente o joelho, quadril e na coluna vertebral, mas pequenas articulações das mãos podem ser acometidas e, mais raramente, do pé (ROOS e ARDEN, 2016).

Sabe-se que é a doença reumática mais prevalente entre indivíduos com mais de cinquenta anos e a décima primeira causa de incapacidade ao redor do mundo. (CROSS *et al.*, 2014). Em nível global, a OA foi responsável por aumentar em 75% a piora do parâmetro “anos vividos com disfunção” (YLDs) do inglês “*years lived with disability*”. Este indicador é utilizado em estudos globais para mensurar os anos de vida produtiva perdidos devido à incapacidade (GLOBAL BURDEN COLLABORATORS, 2015). É estimado que em 2020, 30% da população europeia idosa seja acometida pela doença (LITWIC *et al.*, 2013).

A Organização Mundial Saúde (OMS) analisou uma coorte de 44.747 indivíduos sobre envelhecimento em um estudo denominado SAGE WAVE 1. A análise dos dados revelou que existe alta prevalência da OA em países de baixa e média economia. A pesquisa foi realizada na China, Gana, Índia, México, Rússia e África do Sul de acordo em relação as variáveis sexo, idade e indicadores socioeconômicos. De maneira geral, a OA foi mais prevalente entre os indivíduos com idade avançada, menor escolaridade e em mulheres separadas, divorciadas ou viúvas (BRENNAN-OLSEN *et al.*, 2017).

Na América Latina, os dados analisados de uma coorte em três países, totalizando 1210 pacientes, revelou que a prevalência de osteoartrite de joelho, forma mais comum da doença, foi maior em mulheres (80,8%), em indivíduos etnicamente autodeclarados mestiços (51%) e com idade média de 61 anos (BURGOS-VARGAS, 2014).

No Brasil, os estudos epidemiológicos feitos sobre a doença são pontuais. Em um destes, realizado na cidade de Montes Claros em Minas Gerais, a OA foi a doença reumática mais prevalente (4.14%) quando comparada a fibromialgia (FM), artrite reumatóide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico (LES). Neste estudo, a predominância foi em indivíduos na faixa etária

de 54-75 anos (48%), sexo feminino (84%) e os sítios mais acometidos nesta amostra foram coluna vertebral e joelho (SENN *et al.*, 2004). Em outro trabalho, uma coorte de 141 indivíduos obesos à espera da cirurgia bariátrica do município de Campinas, São Paulo foi analisada. Do total de indivíduos, 63,1% apresentou osteoartrite de joelho enquanto que 40,8% foi de quadril. Destes, 85% eram mulheres com idade média de 40 anos (PACCA *et al.*, 2018).

2.1.2 Etiologia

Os fatores de risco implicados na OA podem ser agrupados em dois grandes eixos - (i) genéticos: idade, sexo, doenças hereditárias de proteínas da matriz-extracelular e deformidades anatômicas e (ii) não genéticos: obesidade, mecânicos ocupacionais e traumas articulares (MENDES, 2017).

O fator que exerce maior influência na incidência e prevalência de OA é a idade. As alterações celulares relacionadas ao envelhecimento estão intimamente ligadas ao desenvolvimento da doença. Os mecanismos mais estudados dizem respeito à disfunção mitocondrial e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, aquisição de fenótipo senescente que torna os condrócitos menos responsivos à fatores de crescimento bem como o estado de inflamação sistêmico de baixo grau, denominado de “*inflammaging*”, promovido por citocinas, como IL -6, que se instala com o passar dos anos (LOESER, 2016;2017).

As evidências disponíveis indicam que as mulheres têm um risco significativamente maior de desenvolver osteoartrite do que os homens. As alterações biomecânicas relacionadas ao quadril estariam implicadas no desalinhamento do joelho e, por consequência, maior carga para estes. (SRIKANTH *et al.*,2005; WISE *et al.*,2013). É notório também que a taxa de mulheres acometidas por OA aumenta após a menopausa. Este fato suscitou questionamentos acerca do papel protetivo dos hormônios sexuais femininos (HUSSAIN *et al.*,2018; MAHAJAN e PATNI, 2018). Apesar dos estudos sugerirem potencial benefício da reposição hormonal na prevenção da OA, ainda não há dados suficientes para comprovar esta hipótese (PARK *et al* 2017; JUNG *et al.* 2019).

Em relação a predisposição genética, sugere-se o envolvimento de genes distintos de acordo com o tipo e a localização da OA. Na forma primária, os indícios apontam para a participação dos genes COL2A1, COL11A1, COL11A2 envolvidos na síntese das moléculas de colágeno (JAKULA *et al.*, 2005; JAKLOEWS *et al.* 2007 e VALDES *et al.*, 2007). Destacam-se também os genes GDF5, codificador de fator de crescimento do tecido sinovial e

ASPN, gene regulador da expressão da proteína ligante do fator de crescimento transformante beta (TGF- β). A associação de mutações destes genes foi demonstrada em pelo menos três populações distintas e estariam implicados principalmente na OA de joelho e, em menor grau, quadril e mãos. Outros genes implicados na patogênese da doença incluem aqueles envolvidos no metabolismo ósseo como o receptor de vitamina D (VDR) e o receptor de estrogênio alfa 1 (ESR1); na sinalização e transdução de sinal dos condrócitos (BMP5, e FRZB) e nos genes que codificam as interleucinas 1,6, 10 e o fator de necrose tumoral (YOUCESOY *et al.*, 2015).

Por fim, as alterações dos eixos dos membros inferiores são associadas ao risco de progressão da osteoartrite de joelho. Os alinhamentos varo (“joelho para fora”) e valgo (“joelho para dentro”), aumentam a carga dos compartimentos tíbio-femural e medial e lateral, respectivamente. Todavia, apenas o alinhamento varo mostrou correlação com a incidência de OA de joelho em cartilagens normais avaliadas por ressonância magnética (SHARMA *et al.*,2010).

O excesso de peso é o principal fator de risco modificável que contribui para o desencadeamento da doença em joelhos e quadris. De maneira mecânica local, a massa extra promove desgaste articular diminuindo, por exemplo, o volume da cartilagem da tíbia e propiciando roturas de menisco (TEICHTAHL 2014; 2015). Os mecanismos metabólicos sistêmicos da obesidade também atuam para desencadeamento da doença. Foi descrito que indivíduos com o alto índice de massa corpórea (IMC) desenvolveram osteoartrite nas mãos, articulações que funcionalmente não carregam o peso do corpo (VISSER *et al.* 2014). Em consonância com este fato, os níveis de leptina estavam elevados no soro e fluido sinovial de pacientes com OA em detrimento de pessoas sem a doença (DE BOER *et al.*,2012; TU *et al.*,2019).

Algumas atividades ocupacionais e a prática de certos esportes podem levar ao desenvolvimento da chamada OA pós-traumática. O uso repetitivo e crônico das articulações de carga ultrapassa o limite fisiológico de suporte oferecido pelos músculos satélites, ligamentos e tendões o que gera sobrecarga nas cartilagens. Estudos transversais e caso-controle revelaram associação de diversas ocupações profissionais com maior risco de desenvolvimento de OA: carpinteiros e pedreiros na população japonesa (JENSEN *et al.*, 2000), trabalhadores da construção civil, mineração e agricultura na Dinamarca e Estados Unidos da América (FRANKLIN *et al.*, 2010; ANDERSEN *et al.*, 2012).

A prática de esportes de alto rendimento também foi associada ao desenvolvimento da doença (BENNEL *et al.*, 2012). Em estudo realizado no Brasil, uma coorte de jogadores de futebol profissional obteve os piores resultados em relação a mudanças radiográficas e de ressonância magnética de OA de joelho do que voluntários de áreas ocupacionais não esportivas (ARLIANI *et al.*, 2014). Apesar da existência de técnicas cirúrgicas de reconstituição cartilágnea, poucos são os atletas que se beneficiam dela integralmente. A pressão para voltar às atividades associada à reabilitação incompleta expõe o atleta a maior degeneração articular crônica e desenvolvimento de OA (SALZMANN *et al.*, 2016).

Não apenas atletas, mas indivíduos não esportistas são propensos a sofrer traumas agudos, como quedas e rotações abruptas das articulações. Essas injúrias pontuais aumentam o risco de desenvolvimento de degeneração articular. Imediatamente no pós-trauma, ocorrem modificações como necrose celular, ruptura de colágeno, perda de glicosaminoglicanos (GAG), hemosteoartrite e inchaço articular. Essas alterações evoluem horas depois para a fase aguda pós-traumática, caracterizada por aumento de apoptose de condrócitos, degradação de matriz e infiltração de células e mediadores inflamatórios. Posteriormente, esse processo patológico pode ser auto resolvido, a depender da predisposição individual, ou prosseguir para uma fase assintomática durante meses. Caso haja progressão em alguns anos, ocorrerá o desenvolvimento da denominada osteoartrite pós-traumática (LIEBERTHAL *et al.*, 2015; PUNZI *et al.*, 2016).

2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da AO é baseado essencialmente nos sintomas, no exame físico e avaliação radiográfica das articulações. No exame físico, deve-se avaliar principalmente os seguintes sinais: edema, calor, sensibilidade, crepitação e amplitude de movimento nas articulações. É recorrente, porém, não haver correlação entre os sintomas descritos pelo paciente e os achados radiológicos. Outra limitação dessa modalidade de exame diz respeito à avaliação da imagem em estágios precoces da doença, em que não se visualiza com facilidade as alterações articulares (Li, Q. *et al.*, 2016). O quadro 1 descreve os critérios de classificação da osteoartrite de joelhos, quadril e mãos segundo o Colégio Americano de Reumatologia (ALTMAN, R. 1986; 1990;1991).

Quadro 1: Critérios Classificatórios da osteoartrite. Fonte: ALTMAN, R. *et al* 1986; 1990; 1991.

Articulação	Instrumentos	Critérios ACR (1986, 1990, 1991)
Joelho	História e exame físico	Dor no joelho e 3 dos itens: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Acima de 50 anos ▪ Rigidez matinal < 30 minutos ▪ Crepitação em movimento ativo ▪ Dor óssea ▪ Enlargamento ósseo ▪ Sem calor sinovial palpável
Joelho	História, exame físico e achados radiográficos	Dor no joelho e 1 dos itens: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Acima de 50 anos ▪ Rigidez matinal < 30 minutos ▪ Crepitação em movimento ativo ▪ Presença de osteófitos
Joelho	História, exame físico e achados laboratoriais	Dor no joelho e 5 dos itens: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Acima de 50 anos ▪ Rigidez matinal < 30 minutos ▪ Crepitação em movimento ativo ▪ Dor óssea ▪ Enlargamento ósseo ▪ Sem calor sinovial palpável ▪ VSH < 40mm/hora ▪ Fator reumatoide < 1:40 ▪ Sinais de OA no Líquido Sinovial
Quadril	História, exame físico e achados laboratoriais	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dor no quadril, rotação interna < 15° e VSH \leq 45mm/hora (se VSH indisponível considerar flexão de quadril \leq 115°) ▪ Dor no quadril associada à rotação interna \geq 15°, rigidez matinal \leq 60 minutos e idade acima de 50.
Quadril	História, exame físico, achados	Dor no quadril e 2 dos itens: <ul style="list-style-type: none"> ▪ VSH < 20mm/hora

	laboratoriais e radiográficos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Osteófitos acetabulares e/ou femorais ▪ Redução do espaço articular (superior, axial, +/-ou medial)
Mão	História e exame físico	<p>Dor e rigidez na mão e 3 dos itens:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumento de tecido rígido nas juntas: 2^a e 3^a interfalangeana distal e proximal e 1^o carpometacarpal de ambas as mãos ▪ Aumento de tecido rígido em 2 ou mais juntas interfalangeanas distais ▪ Inchaço em menos que 3 juntas metacarpofalangeais ▪ Deformidade em pelo menos 1 das articulações acima.

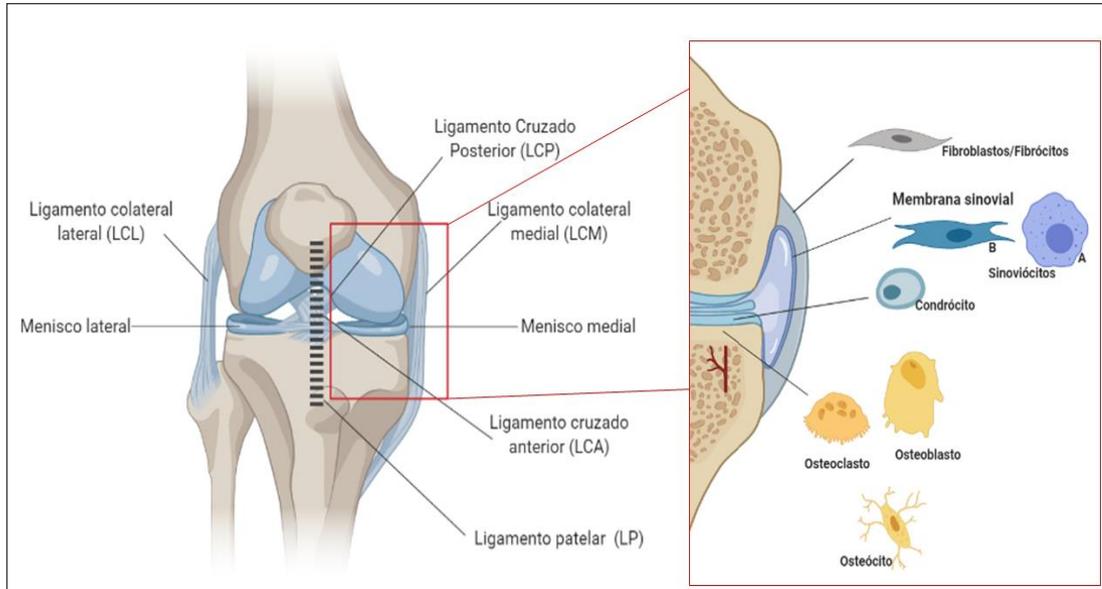
2.1.4 Fisiopatologia

Para compreender os mecanismos fisiopatológicos da doença é necessário antes discorrer sobre os componentes articulares e a histologia de uma cartilagem normal.

2.1.4.1 Histologia e fisiologia da articulação normal

As articulações podem ser classificadas conforme o seu grau de mobilidade. Desta maneira, as sinosteoartrtes são aquelas compostas exclusivamente por tecido fibroso e, portanto, inflexíveis. As anfiosteoartrtes são articulações semimóveis cuja arquitetura histológica é formada por tecido fibrocartilaginoso, o qual permite movimentos limitados (quadril e vértebras). Por fim, as diosteoartrtes podem realizar movimentos amplos e também são denominadas de sinoviais (JUNEJA e HUBBARD, 2019). Tendo em vista que o joelho, uma diosteoartrte, é o sítio anatômico responsável por 80% da carga total da OA (VOS *et al.*, 2012), as descrições a seguir focarão neste tipo de articulação. Como ilustrado na figura 1, uma articulação sinovial é constituída das seguintes estruturas: ligamentos, membrana sinovial, disco fibrocartilaginoso e a cartilagem hialina.

Figura 1: Componentes da articulação do joelho e seus respectivos elementos celulares. Fonte: autor (2019).



Os ligamentos são tecidos conjuntivos fibrosos densos de alta resistência que limitam os movimentos articulares. São formados por fibroblastos e matriz extracelular rica em fibras de colágeno tipo 1 e 3, elastina, proteoglicanos e proteínas de adesão (MARIESWARAN *et al.*, 2018). A membrana sinovial é formada por um estrato externo de tecido conjuntivo misto com até 5 mm de espessura. É relativamente acelular e contém microvasculatura sanguínea e linfática além de fibras nervosas. A parte mais interna, chamada de íntima, é uma fina camada de 1 a 4 células denominadas de sinoviócitos. Estas células foram identificadas como macrófagos, designados como sinoviócitos tipo B, e fibroblastos, a maioria da população residente (BLALOCK *et al.*, 2015). É atribuída a sinóvia a função de lubrificação, por meio da secreção de lubrificina e ácido hialurônico, bem como de remoção de subprodutos do metabolismo cartilágneo (SCANZELLO e GOLDRING, 2012; NAJM *et al.*, 2018). Os meniscos são estruturas em formato de “C” de tecido fibrocartilaginoso e células tipo fibroblastos. São mais desenvolvidas no joelho, porém presentes em outras articulações. Possuem a importante função de estabilidade, distribuição de carga, absorção de choque e lubrificação (MAKRIS *et al.*, 2011).

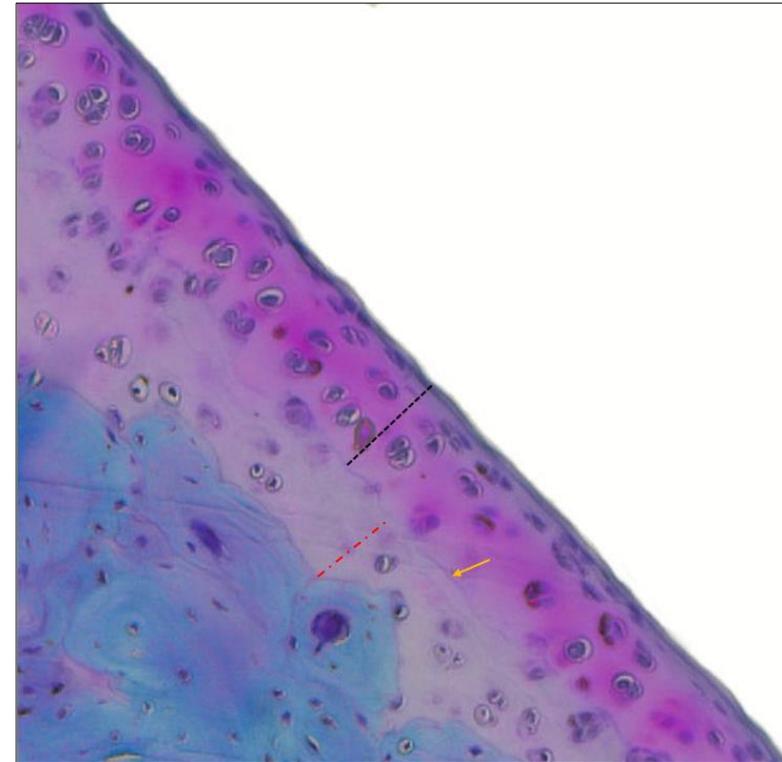
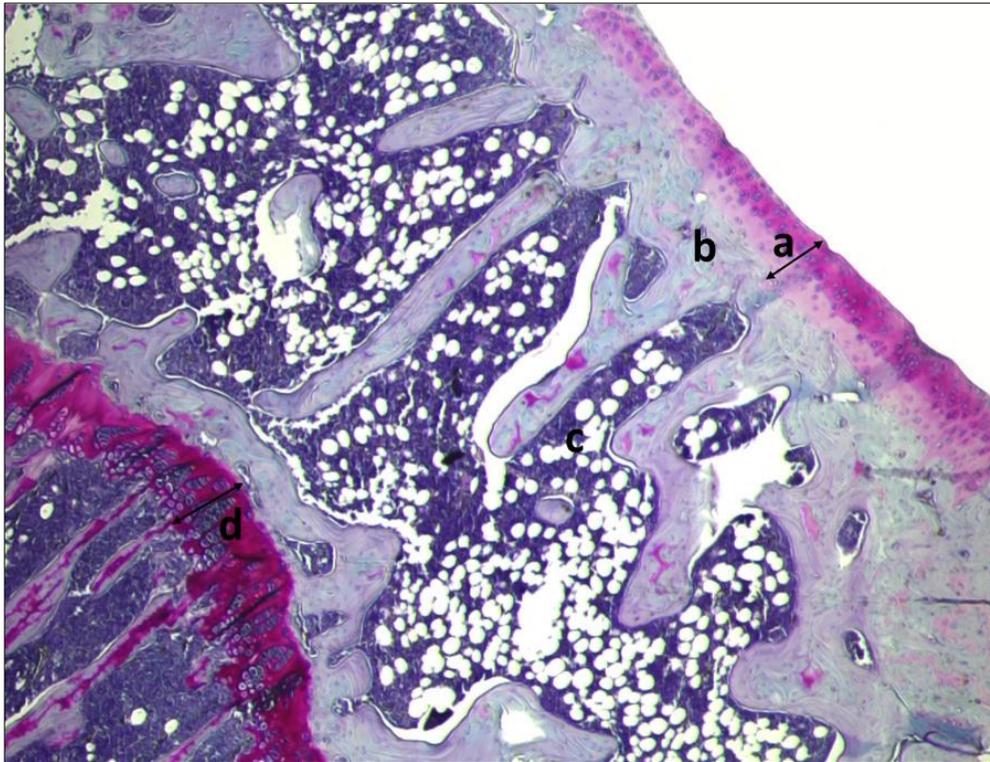
A cartilagem hialina é composta por um tecido conjuntivo branco, brilhante, discretamente translúcido e de espessura variável. O tecido é do tipo avascularizado, não innervado, constituída por uma densa matriz extracelular (MEC) e um único tipo celular, os condrocitos. Estas células compõem cerca de 3% da cartilagem total e são responsáveis pela

síntese e degradação dos componentes da matriz (LAARDHAR *et al.*, 2007). Em geral, apresentam uma morfologia elíptico-esferoidal medindo em torno de 10µm. Estas células expressam a glicoproteína de membrana CD44 a qual se liga ao ácido hialurônico da MEC para estabelecer a ancoragem no tecido (HIDA *et al.*, 2015). Estão individualmente inseridos em uma cavidade, denominada lacuna, e geralmente se apresentam em pares e ou tétrades – os grupos isógenos (LOTZ *et al.* 2010).

A MEC é composta principalmente por fibras colágenas do tipo II, as quais estão ancoradas em moléculas de proteoglicanos (PG) e glicosaminoglicanos (GAG). Os PG consistem em uma proteína principal ligada covalentemente a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos. Já estes últimos são longas cadeias lineares de polissacarídeos os quais podem estar ligados a um núcleo proteico, sulfatados ou não sulfatados. A abundância de hidroxilas livres confere a estas moléculas carga aniônica, o que é responsável pela retenção de água, cálcio (Ca⁺⁺) e sódio (Na⁺⁺). Os principais GAGs encontrados na MEC da cartilagem são sulfato de condroitina 4 e 6, sulfato de queratano e o ácido hialurônico. (ESKO *et al.*,2009; LINDAHL *et al.*,2017). O agrecano é o proteoglicano mais abundante da cartilagem. Consiste de uma proteína nuclear com inúmeros GAGs sulfatados ligados. É apenas encontrado na forma de agregados, ou seja, várias moléculas de agrecanos estão ancoradas a um longo filamento de ácido hialurônico (ROUGHLEY e MORT, 2014).

De acordo com a disposição dos condrócitos e a orientação das fibras de colágeno, o tecido cartilaginoso hialino pode ser estratificado em 4 zonas: superficial, média ou intermediária, profunda e calcificada. Como ilustrado na figura 2, os condrócitos estão dispostos horizontalmente na zona superficial. Na zona média, os condrócitos são mais esféricos enquanto que na zona profunda encontram-se hipertróficos e verticalmente dispostos. A divisão entre as zonas profunda e calcificada é distinguível pela presença de uma linha basófila denominada de “linha de maré”. Abaixo dessa camada, na parte calcificada, a celularidade é mais escassa e as fibras de colágenos estão em orientação vertical (FOX *et al.*, 2009).

Figura 2: Fotomicrografias de cortes histológicos frontais dos epicôndilos tibiais corados por Safranina-O provenientes de rato Wistar (40X) (imagem à esquerda) e em maior aumento (100X) (imagem à direita). Em (a) está destacada a espessura da cartilagem hialina, (b) o osso subcondral, (c) medula óssea e (d) linha hipofisária. A linha tracejada preta indica a extensão da zona superficial até a profunda, a linha tracejada vermelha indica a camada calcificada e a seta amarela, a linha de maré. Fonte: Autor (2019).



É possível ainda subdividir a MEC da cartilagem em três áreas: pericelular, territorial e interterritorial. A região pericelular é o microambiente imediato do condrócito, formado majoritariamente por colágeno II, IV e agrecano. A região territorial é formada por agregados de proteoglicanos e fibras de colágeno entre lacunas de grupo isógenos. Já a zona interterritorial é composta por fibras de colágeno randomicamente orientadas de acordo com a camada; MONTROYA *et al.* 2013; ZHANG, *et al.*, 2015). A figura 3 exemplifica a distribuição dos grupos isógenos dentro das camadas de matriz extracelular.

Figura 3: Fotomicrografia de corte histológico frontal do epicôndilo femoral de rato wistar corado por Hematoxilina/Eosina (40X). O círculo vermelho destaca um grupo isógeno de condrócitos da zona profunda. Em maior aumento no canto superior direito, esta identificado o "condron", conjunto do condrócito mais a matriz pericelular (1) inseridos na lacuna (2). Fonte: autor (2019).



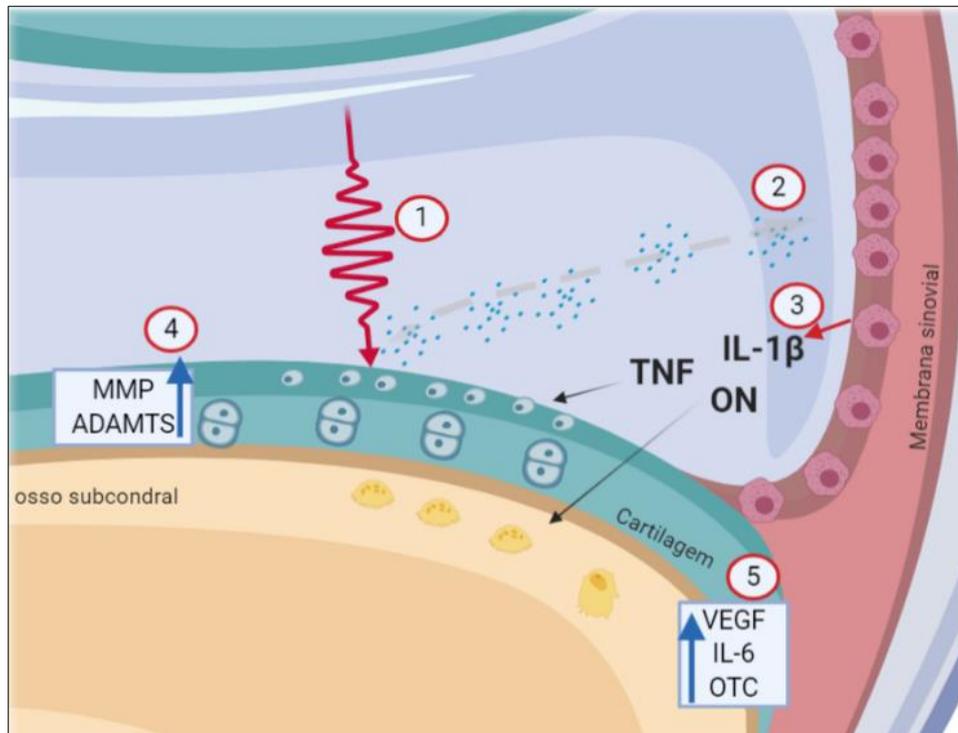
2.1.4.2 Mecanismo degenerativo-inflamatório

Por muito tempo a OA foi considerada uma doença de caráter unicamente degenerativo devido ao desgaste da cartilagem articular. Este fato se deve à fisiologia normal dos condrócitos, o qual possui baixa atividade metabólica em relação às demais células do tecido conjuntivo. Contudo, cada vez mais estudos têm evidenciado também o perfil inflamatório da doença. Essa teoria surgiu principalmente pela interação da cartilagem com a membrana sinovial (BERENBAUM *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente, a sinóvia corresponde a um tecido fibroso, extremamente vascularizado, na qual residem células fibroblastóides chamadas sinoviócitos tipo B. Esse tipo celular tem como principal função manter a lubrificação biomecânica da cartilagem (TAMER *et al.*, 2013). Além da proteção física, há evidências de que o líquido produzido na sinóvia seja a fonte dominante de nutrientes da cartilagem adulta em detrimento do osso subcondral (WANG *et al.*, 2013). Dessa forma, sugere-se que o aspecto inflamatório da patogênese ocorra pela interação dos condrócitos com moléculas advindas de uma membrana sinovial inflamada. Apesar da inflamação já ter sido descrita na osteoartrite em trabalhos na década de 1970, apenas nos últimos anos, os estudos vêm focando atenção para a sinovite e sua correlação com a progressão da doença (MOBASHERI e BATT *et al.*, 2016).

O processo patológico de interação entre condrócitos e sinoviócitos seria iniciado por meio de catabólitos resultantes de injúrias agudas ou crônicas. Estes produtos liberados no fluido sinovial seriam, então, fagocitados pelos sinoviócitos. Os sinoviócitos, agora ativados, produziram fatores inflamatórios com destaque para as interleucinas. Essas moléculas em conjunto a outros mediadores promoveriam uma cascata de eventos tais quais: degradação da MEC com subsequente amplificação da cascata, recrutamento de linfócitos e macrófagos ativados, neovascularização e remodelação óssea - formação de osteófitos (MATHIESSEN e CONAGHAN, 2017). A cascata de eventos da patogênese da OA está resumida na figura 4.

Figura 4: Desenho esquemático da interação entre células e mediadores nos estágios iniciais do desenvolvimento da OA. (1) Traumas agudos ou crônicos liberam no líquido sinovial catabólitos da cartilagem como peptídeos de colágeno e proteoglicanos clivados, que são fagocitados pelos sinoviócitos (2). Em resposta, estes secretam a interleucina 1 β (IL -1 β) fator de necrose tumoral (TNF) e óxido nítrico (ON) (3) que medeiam a síntese de metaloproteinases (MMP) e desintegrinas (ADAMTS) pelos condrócitos (4) e estimulam a osteoclastogênese subcondral por meio do aumento de IL-6 e Osteocalcina (OTC), como da neovascularização por meio do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Fonte: Elaborado pelo autor (2019).



No processo degenerativo, as principais enzimas responsáveis são metaloproteinases ou metaloproteases (MMP). Essas proteases podem degradar todos os componentes da cartilagem e são subdivididas em cinco classes: 1) as collagenases (MMP-1, 8 e 13); 2) as gelatinases (MMP-2 e 9); 3) estromelisinases (MMP-3, 10 e 11); 4) de membrana (MMP-14 a 17, 24 e 25) e 5) grupo heterogêneo (MMP-7, 11, 12, 20 e 23) (BURRAGE *et al.*, 2006). A atividade proteolítica das MMP é crucial para os processos fisiológicos, como a remodelação tecidual, angiogênese, desenvolvimento ósseo e cicatrização (FANJUL-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). Contudo, os níveis proteicos das MMP-1, 2, 3, 8 e 9 foram encontrados elevados no soro e no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (YOSHIHARA *et al.*, 2000; PELLETIER *et al.*, 2010 e ZENG *et al.*, 2015).

De maneira geral, as citocinas protagonistas da osteoartrite são a IL -1 β e o TNF. Em cultura primária de condrócitos, a IL-1 β foi capaz de diminuir a expressão do colágeno tipo II

inibindo a ligação dos fatores de transcrição SP-1 e 3 a região promotora do gene COL2A1 (CHADJICHRISTO *et al.*, 2003). Ela também foi capaz de induzir a transcrição da ciclooxigenase 2 (COX-2), MMP-1 e 3 e IL -6 em células de tendões humanos. Outro ponto constatado diz respeito à indução da síntese da NADPH oxidase isoforma 4 (NOX4), enzima que produz espécies reativas de oxigênio, por parte da IL-1 β (ROUSSET *et al.*, 2015). Já é bem descrito na literatura que o estresse oxidativo é um dos mecanismos indutores de apoptose pela via intrínseca (HENROTIN *et al.*, 2005).

A inflamação sinovial, ainda que bem mais discreta que na artrite reumatóide por exemplo, é um achado frequente (HILL *et al.*, 2007). Neste contexto, o TNF é uma citocina crucial para evolução do processo inflamatório articular. Quando secretado pelos sinoviócitos, o TNF promove a ativação autócrina e retroalimentação positiva dessas células. Nos condrócitos, que expressam os receptores de TNF (TNF-R1) e o receptor do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), foi observada a diminuição da secreção de GAG (WESTACOTT *et al.*, 2000). Ademais, a IL -1 β e o TNF aparentam ser mais efetivos quando agem sinergicamente. Entretanto, na aplicação prática, poucos ensaios clínicos investigaram o tratamento com os bloqueadores de TNF como alternativa terapêutica para a osteoartrite (CALICH *et al.*, 2010).

Em relação à IL -6, modelos animais revelaram que esta citocina e o seu receptor solúvel também foram capazes de inibir a produção de colágeno tipo II via regulação SP-1,3 (PORÉE *et al.*, 2008). De maneira relevante, foi encontrado níveis elevados de IL -6 no fluido sinovial e no soro de pacientes com OA (LIVSHITS *et al.*, 2009). Stannus e colaboradores (2010) apontam a IL-6 como potencial biomarcador para os estágios mais precoces da osteoartrite. Por ser também induzida pela ação da IL -1 β e do TNF, a IL-6 é uma citocina usualmente estudada na osteoartrite.

2.1.4.3 Mecanismo de apoptose na cartilagem artrósica

O processo degenerativo da cartilagem, fator patognomônico da osteoartrite, não se relaciona apenas com a perda dos componentes da matriz, mas também com a morte dos condrócitos (FERNANDÉZ-TORRES *et al.*, 2017). Os mecanismos da morte celular programada já são bem descritos e ocorrem pelas vias de ativação intrínseca ou extrínseca.

A apoptose é um evento fisiológico do ciclo celular, no entanto, o excesso de ativação ou inibição deste processo pode desencadear estados patológicos (CHARLIER *et al.*, 2016). Na

morte celular, destaca-se o papel das caspases, endoproteases com resíduos de cisteína, que hidrolisam ligações peptídicas depois de um resíduo de ácido aspártico. As caspases envolvidas na apoptose são classificadas em iniciadoras (8 e 9), cuja função é a proteólise de formas inativas de outro tipo de caspases, as efetoras (3, 6 e 7). A ação final das caspases efetoras resulta em clivagem de proteínas do citoesqueleto e fragmentação do material nucleico, porém sem desorganização da membrana (MCILLWAIN *et al.*, 2013).

Na sinalização intrínseca para apoptose, não há mediação de receptores, mas sim fatores como, hipóxia, privação de crescimento ou dano ao DNA. Esses estímulos induzem à uma cascata de sinalização que aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial (MUSUMECI *et al.*, 2011). A proteína chamada de agonista da morte no domínio interativo BH3 (Bid) inibe a proteína 2 de linfoma de células B (Bcl-2). Consequentemente, ocorre a translocação e oligomerização na membrana externa da mitocôndria das proteínas associadas ao Bcl-2 (Bax) e (Bak). A formação do poro mitocondrial libera o citocromo c (cyt c) para o citosol. No citoplasma, o cyt c forma o complexo do apoptossoma juntamente com o fator-1 de ativação da protease (Apaf-1), o qual ativa a caspase-9 e, posteriormente, as caspases-3, 6 e 7.(HWANG e KIM, 2015).

A via extrínseca é dependente da ativação de receptores de morte localizados na membrana celular. Os principais receptores são: Fas (CD95 / APO-1), o receptor de TNF (TNFR) e o receptor do ligante relacionado ao TNF (TRAIL) Quando há a conexão dos ligantes aos seus receptores, uma cascata de sinalização intracelular ocorre para formação do complexo contendo DISC, proteína adaptadora fas e caspase-8. Esta, por sua vez ativada, cliva diretamente as caspases efetoras 3 e 7. Entretanto, a ativação da caspase-8 pode ser insuficiente para indução de morte. Então, em alguns tipos celulares, a clivagem da caspase-8 é translocada para a mitocôndria para ativação da via intrínseca mitocondrial (ELMORE, 2007; GALLUZI *et al.*,2018).

A morte celular programada dos condrócitos tem características específicas e é denominada de “condroptose”. As principais diferenças da condroptose para a via clássica consistem no aumento do aparato reticular endoplasmático e síntese proteica, condensação incompleta da cromatina nuclear, digestão dos remanescentes celulares em vacúolos autofágicos e auto eliminação sem presença de fagócitos (ROACH *et al.*, 2004).

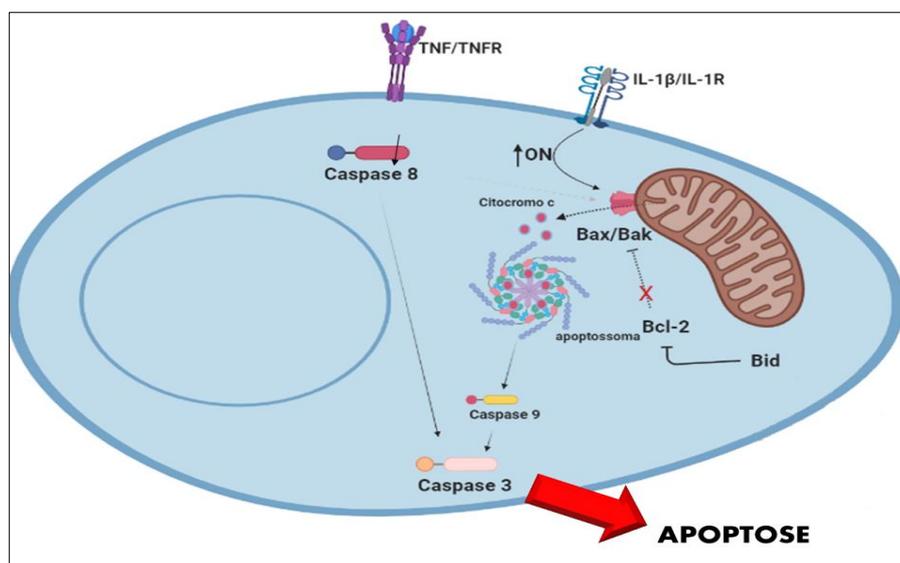
Nos ossos, o processo de ossificação endocondral requer a morte celular dos condrócitos na cartilagem. Esta etapa é necessária para que aja a invasão de células mesenquimais

derivadas da medula óssea e substituição da cartilagem por tecido ósseo mineralizado. Contudo, é um mecanismo que deve acontecer nas camadas mais profundas da cartilagem, mais precisamente na zona calcificada (GIBSON, 1998).

Na OA, contudo, foi demonstrado que há um aumento do percentual de células em apoptose nas camadas superficiais (GUARRIDO *et al.*, 2009). Outras características histológicas de morte, como presença de lacunas vazias, hipocelularidade e fragmentação de DNA foram observadas em cartilagens após pressão mecânica. (D’LIMA *et al.*, 2001; AIGNER *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2007). De acordo com Charlier e colaboradores (2016), os principais indutores de apoptose na OA são o ligante Fas, a IL-1 β , o TNF, a leptina, o ON e o estresse mecânico.

Não restam dúvidas quanto a implicação da morte dos condrócitos na patogênese da osteoartrite. Contudo, se a apoptose/crondroptose é a causa ou a consequência da doença é um questionamento não tão bem elucidado. Isto deve-se ao fato de que existem inúmeras limitações metodológicas de se investigar a forma de morte dos condrócitos nas articulações *in situ* (ZAMLI e SHARIF, 2011).

Figura 5: Vias de ativação da apoptose induzidas por IL-1 β e TNF em condrócitos. A IL -1 β e o estresse mecânico induzem a produção de ON, o qual ativa a via mitocondrial da apoptose. Já o TNF se liga ao seu receptor que desencadeia a sinalização via ativação da caspase-8. Esta última caspase, eventualmente, pode amplificar o sinal de morte aumentando a permeabilização da membrana mitocondrial. Ambas as vias culminam com a atividade efetora da caspase-3 e consequente morte celular. Fonte: Elaborado pelo autor (2018). Bid: agonista da morte no domínio interativo BH3; Bcl-2: proteína 2 de linfoma de células B; Bak: antagonista assassino homólogo de Bcl-2; IL-1R: receptor da interleucina 1; IL-1 β : interleucina 1 *beta*; ON: óxido nítrico; TNF: fator de necrose tumoral; TNFR: receptor do fator de necrose tumoral. Fonte: autor (2019).



2.1.5 Tratamento

O tratamento da doença deve ser multidisciplinar e contemplar medidas farmacológicas e não-farmacológicas. Estas últimas têm como principal meta a promoção da qualidade de vida e bem-estar físico. Dentre estas medidas, destacam-se a adoção de programas educativos para fortalecimento muscular, a orientação para emagrecimento, sessões de termoterapia e eletroterapia para alívio da dor, a prática de acupuntura, entre outros. O manejo farmacológico, por sua vez, tem como objetivo o alívio sintomático e inclui medicações analgésicas, anti-inflamatórias e drogas sintomáticas de ação lenta, do inglês “*symptomatic slow acting drugs*” (SYSADOA) (ZHANG *et al.*, 2005; 2008; 2009, MONFORT *et al.*, 2019).

As diretrizes mais recentes da *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) para OA de joelho, quadril e poliarticular, recomendam o uso de: (i) anti-inflamatórios não esteroidais tópicos (AINEs) para para indivíduos com OA do joelho e (ii) inibidores da COX-2 e AINEs com inibidores da bomba de prótons para indivíduos com comorbidades gastrointestinais. Para indivíduos com comorbidades cardiovasculares ou fragilidade o uso de AINEs não é recomendado. Além do mais não é recomendado o uso de o uso de acetaminofeno /paracetamol, opioides orais e transdérmicos devido ao baixo nível de evidência (BANNURU *et al.*, 2019).

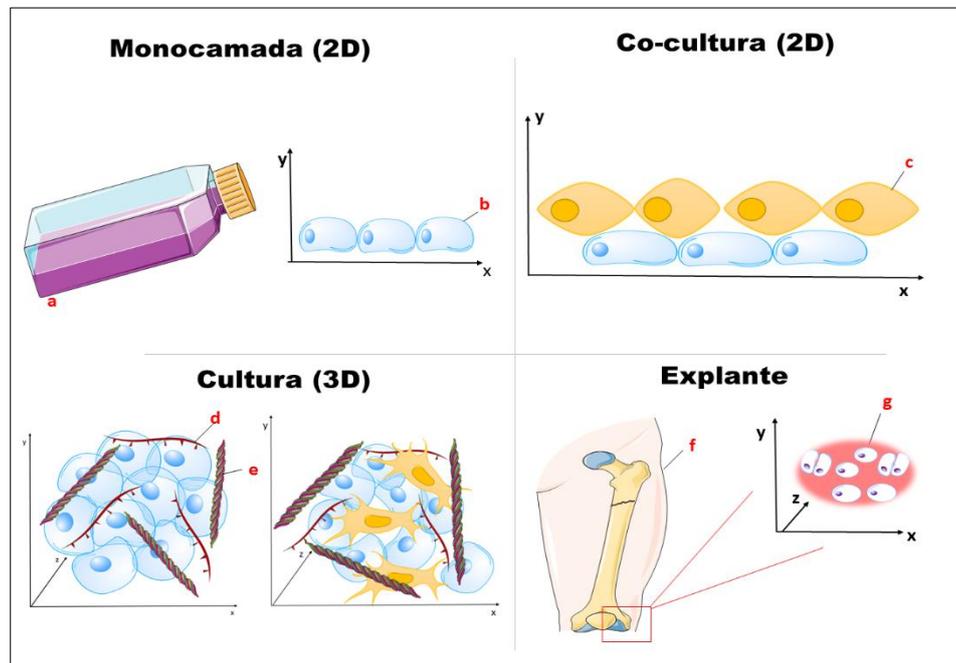
As SYSADOAs são drogas de ação lenta cujo principal objetivo é reparar ou prevenir o dano articular. São ativos capazes de, em teoria, aumentar a síntese de componentes da matriz ou evitar a sua degradação. Os medicamentos de uso oral incluem a diacereína, os sulfatos de glicosamina e condroitina, os óleos insaponificáveis de soja e abacate e o antimalárico hidroxicloroquina. A infiltração intra-articular de ácido hialurônico, chamada de viscosuplementação, é usada como alternativa aos medicamentos orais (MIN *et al.*, 2018). Contudo, a eficácia desse grupo de fármacos é questionável, além dos efeitos colaterais, os quais incluem alterações do peristaltismo e alergias (REZENDE *et al.*, 2013).

Em casos de dor extrema e limitações funcionais, como andar e trabalhar, as cirúrgicas são as intervenções indicadas (GUNTER *et al.*, 2001). A osteotomia consiste em um seccionamento do osso com o objetivo de correção do alinhamento da articulação. Dessa forma, a carga da articulação é transferida para áreas com cartilagem mais saudável, minimizando os efeitos nas áreas de desgaste. Por fim, a cirurgia de substituição de joelho, chamada também de artroplastia parcial ou total, envolve a colocação de implantes formados por uma combinação de metal e plástico de alta densidade (PALMER *et al.*, 2019).

2.1.6 Modelos de estudo *in vitro* da osteoartrite

Atualmente, existem diferentes abordagens de estudar a osteoartrite *in vitro*. Em comum, elas permitem a investigação precoce dos mecanismos patológicos da doença antes do estabelecimento do processo de maneira severa. É sabido que, em geral, há um descompasso cronológico entre as alterações moleculares da OA e a apresentação clínica dos sinais da doença (JOHNSON *et al.* 2016). Outro ponto importante é a aplicabilidade destes modelos na pesquisa pré-clínica de novos compostos candidatos à fármacos (JEONG *et al.*,2019). A figura 6 demonstra os principais modelos de cultura celular empregados nos estudos *in vitro* de osteoartrite.

Figura 6: Técnicas de cultivo celular *in vitro* e suas especificidades na osteoartrite. As culturas em 2D envolvem o cultivo de células em superfícies planas de garrafas (a) para crescimento bidimensional. O tipo celular mais estudado é o condrócito (b), podendo ser acrescido de sinoviócitos (c) em outra camada, caracterizando uma co-cultura. Na cultura (3D), as células podem crescer em todas as direções e manter interações entre eles e uma matriz rica em proteoglicanos (d) e colágeno (e). Na cultura explante, fragmentos de cartilagem são removidos de pacientes com osteoartrite ou indivíduos saudáveis e cultivados íntegros dentro do seu arcabouço primário. 2D: duas dimensões; 3D: três dimensões. Fonte: autor (2019).



Os modelos bidimensionais permitem o controle de variáveis, tais quais citocinas e pressão osmótica. Contudo, em superfícies planas, os condrócitos tendem a modificar sua morfologia, adquirindo um fenótipo parecido a um fibroblasto. O risco desse fenômeno acontecer é maior quanto mais se expande o crescimento dessas células (LEE *et al.* 2017). A cultura em co-cultivo oferece a possibilidade de estudo das interações celulares. Esta

modalidade, porém, requer meios de cultura e insumos com especificidades diferentes, fato que pode aumentar o custo do processo. De todos os tipos de cultura, o 3D e explante apresentam um microambiente mais fidedigno ao da cartilagem *in situ*. Contudo, o próprio arcabouço da matriz extracelular da cultura em 3D pode atrapalhar a aplicação de variáveis e a mensuração da resposta das células (JOHNSON et al., 2016).

2.1.7 Modelos animais em osteoartrite

Estudos com animais são amplamente utilizados para identificar novos alvos terapêuticos e avaliar a eficácia e mecanismo de ação de drogas. Fatores como custo, manipulação e disponibilidade de alojamento favorecem o uso de espécies de animais menores, tais quais camundongo, rato, porquinho-da-índia e coelho (TEEPLÉ *et al.*, 2013). Os modelos mais usados em animais de pequeno porte estão descritos no quadro 2.

Quadro 2: Principais modelos animais usados na osteoartrite. Fonte: Autor (2018).

Modelo	Tipo (s)	Referência
Cirúrgico	▪ Desestabilização do mensco medal	PELLETIER <i>et al.</i> , 2010
	▪ Menisectomia ou meniscotomia	MCCOY <i>et al.</i> , 2015
	▪ Transecção dos lgamentos cruzado anterior colateral medal e patelar.	CULLEY <i>et al.</i> , 2015
Enzimático	▪ Injeção intra-articular de collagenase tipo II	YEH <i>et al.</i> , 2008 ADÃES <i>et al.</i> , 2014
	▪ Injeção intra-articular de monoiodoacetato	PITCHER <i>et al.</i> , 2016

Os modelos espontâneos, como o desenvolvido por camundongos str/ORT, demandam muito tempo e a progressão da lesão é bastante variável. Isto dificulta, por exemplo, a realização de análises comparativas entre diferentes intervenções (MASON *et al.* 2001). Os modelos de animais *knockout*, os quais há depleção intencional de certos genes, tem como principal limitação a avaliação de moléculas específicas. A deleção do gene do colágeno tipo 2 (COL2A1), por exemplo, não refletirá toda a complexidade de eventos que ocorrem na osteoartrite (AMEYE *et al.*, 2006).

Os modelos cirúrgicos e químicos reproduzem o processo patológico de maneira mais rápida e controlável. O dano articular, via de regra, começa de 3 dias a 2 semanas após a indução. A progressão da lesão dependerá do animal e tipo de cirurgia escolhido. Contudo, estes modelos induzidos são mais compatíveis com a OA pós-traumática que representa apenas um dos fenótipos da doença (APPLETON *et al.*, 2007).

O sítio anatômico mais estudado é o joelho pela facilidade de acesso e necessidade de mecanismos para sua estabilização. Portanto, a ruptura de uma ou mais estruturas que comprometam a estabilidade biomecânica como meniscos, ligamentos e tendões pode gerar lesões semelhantes à OA (DILLIGAN *et al.*, 2005; KUYINU *et al.*, 2016). Todavia, não há descrito na literatura que alguma metodologia mostrada na tabela 2 reproduza precisamente todos aspectos fisiopatológicos da doença.

2.2 Estatinas

2.2.1 Histórico e classificação química

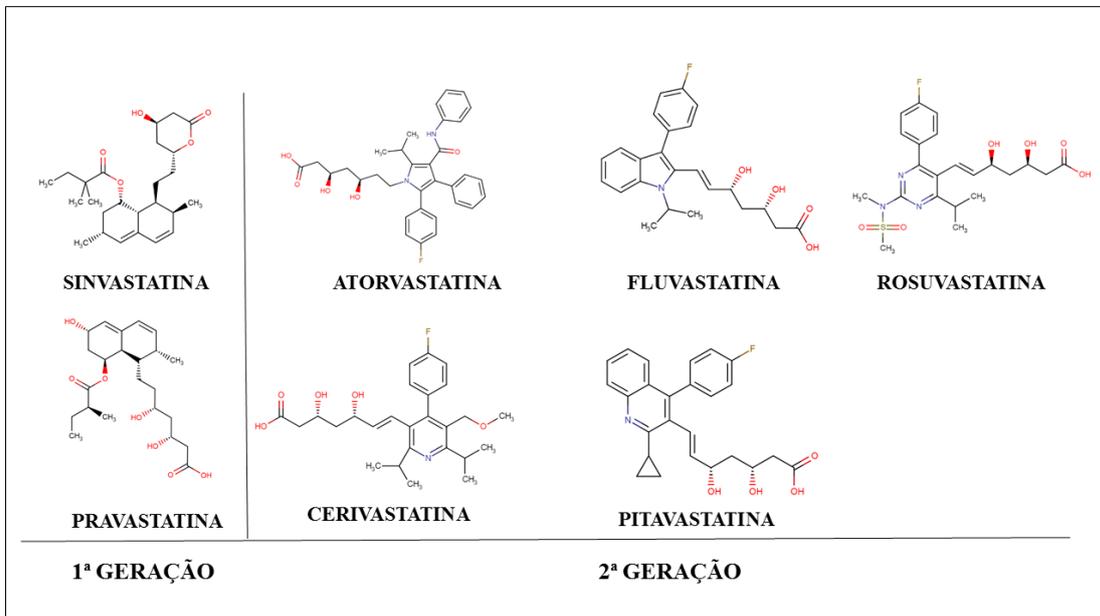
As estatinas são fármacos com ação hipolipemiante por meio da inibição específica da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase). Esta enzima é responsável pela síntese do colesterol (FONSECA *et al.*, 2005). A inibição competitiva das estatinas promove a diminuição da síntese do colesterol, aumenta a expressão da lipoproteína de baixa densidade (LDL) no fígado, o que por sua vez induz o catabolismo das LDL plasmáticas. As principais indicações terapêuticas das estatinas incluem a hipercolesterolemia, aterosclerose e a prevenção de eventos cardiovasculares adversos (XAVIER *et al.*, 2013).

A compactina foi a primeira estatina extraída de metabólitos de culturas de *Penicillium citrinum*. Entretanto, apesar de ter sido eficaz na inibição da HMG-CoA em cultura de fibroblastos humanos hipercolesterolêmicos, essa molécula apresentou toxicidade crônica em modelos animais utilizando cães e macacos. Subsequentemente, a lovastatina foi isolada de culturas de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber*. Porém, os testes com esta estatina foram suspensos devido à similaridade química com a compactina e o potencial efeito tumorigênico em animais (ENDO A., 2010).

Até o presente momento, oito estatinas foram disponibilizadas comercialmente. Devido a composição química, são classificadas em duas classes: i) derivadas de metabólitos fúngicos: sinvastatina e pravastatina; ii) compostos sintéticos: atorvastatina, cerivastatina, fluvastatina,

pitavastatina e rosuvastatina (SCHACHTER, 2005) A estrutura química de cada estatina supracitada está ilustrada na figura 6.

Figura 7: Estruturas químicas das estatinas. Fonte: Autor (2018) - Estruturas moleculares retiradas do Drugbank® via <https://www.drugbank.ca>



As estatinas podem ser administradas via oral na forma de lactonas, no caso da sinvastatina, ou como sais de seus hidróxi ácidos no caso das demais. São absorvidas de maneira rápida e o pico de concentração plasmática acontece entre 4-5 horas. Possuem baixa biodisponibilidade sistêmica por sofrerem metabolismo de primeira passagem, além de possuírem alta ligação às proteínas plasmáticas. Em relação à solubilidade, a pravastatina é a mais hidrofílica, as demais estatinas são lipofílicas (BETTERIDGE *et al.*, 2010).

A atorvastatina foi a primeira estatina sintetizada em 1985 a partir do derivado fúngico, mevalonato. Sua nomenclatura pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês IUPAC, corresponde à ácido (3''R'',5''R'') -7-[2-fluorofenil] -3-fenil-4- (fenilcarbamoil) -5-propan-2-ilpirrol-1-il]-3,5-dihidroxiheptanoico. A posologia recomendada é de 10 a 80 mg/dia e é administrado na forma ácida como atorvastatina de cálcio (HAQUE E KHAN, 2010).

Por mais de uma década a atorvastatina comercializada pela Pfizer®, o Lipitor, foi um dos maiores *blockbusters* da indústria farmacêutica. Durante os 14 anos de patente, o medicamento rendeu em torno de US \$ 130 bilhões a companhia (LEDFOORD, 2011). Desde sua descoberta, ensaios clínicos evidenciaram os benefícios da atorvastatina em pacientes com

isquemia miocárdica, doença arterial coronariana estabelecida, hipertensão, hipertrofia ventricular esquerda e diabetes tipo 2 (DOGGRELL, 2006).

2.2.2 Evidências de benefício clínico em doenças inflamatórias e autoimunes.

Apesar de serem os medicamentos de primeira linha para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, as estatinas são conhecidas por seus efeitos biológicos não-relacionados à redução do colesterol plasmático. Na literatura é possível encontrar trabalhos que investigam as atividades anti-inflamatória, antioxidante, antiangiogênica e neuroprotetora (KAVALIPATI *et al.*, 2015).

Em relação às doenças reumatológicas, pacientes com esclerose sistêmica e lúpus eritematoso sistêmico obtiveram melhora no quadro clínico inflamatório após uso concomitante de estatina (KHATTRI e ZANDMAN-GODDARD, 2013). Em um estudo de coorte retrospectivo, concentrações de estatinas acima de 5400mg nos primeiros 3 anos de uso apresentaram efeito protetor contra incidência de doenças degenerativas espinhais (CHENG *et al.*, 2018).

O primeiro ensaio clínico randomizado (ECR) duplo cego que avaliou a proposta terapêutica de uma estatina na artrite reumatoide (AR), o TARA *trial*, verificou que a atorvastatina (40mg/dia), em terapia adjuvante as drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARD), foi capaz de mediar efeitos anti-inflamatórios modestos, mas clinicamente significantes. (MCCAREY *et al.*, 2004). Esses resultados foram reproduzidos em estudos longitudinais posteriores, nos quais também houve a diminuição do DAS28 e níveis séricos de PCR e VSH nos tempos de 3 e 6 meses. (COJOCARU *et al.*, 2013; DAS *et al.*, 2015).

Em robusta metanálise, quinze ensaios clínicos foram avaliados quanto ao potencial das estatinas em melhorar o quadro clínico de pacientes com AR. Os achados indicaram que o uso das estatinas por 12 meses diminuiu os níveis da PCR e VSH, o número total de articulações inchadas e doloridas, e os níveis séricos de TNF, IL -1 β e IL -6 (LV *et al.*, 2015).

No tocante a osteoartrite, Clockaerts e colaboradores (2012) demonstraram associação protetiva entre o uso de estatinas e a redução da incidência e progressão da OA de joelho em um seguimento de 6 anos. O mesmo não foi constatado em relação a lesões no quadril.

Um estudo prospectivo de 10 anos acompanhou uma coorte de 16609 adultos maiores de 40 anos com algum distúrbio cardiovascular. Foi possível verificar que aqueles que faziam

uso de estatinas reduziram significativamente em 18% a incidência de um episódio de OA em 2 anos e 40% após 4 anos, em comparação com não usuários do fármaco (KADAM *et al.*, 2013). Em outra análise, por sua vez transversal, foi descrita correlação positiva entre o uso de estatinas e menor prevalência da osteoartrite nodal generalizada. Entretanto, esse estudo é limitado pela ausência de informações quanto as estatinas e os regimes utilizados (VALDES *et al.*, 2014).

De acordo com estudo feito por Davies e colaboradores (2016) sobre os usos atuais e emergentes de estatinas na terapêutica clínica, é necessário ponderar alguns pontos: i) identificar o perfil dos pacientes com maior probabilidade de resposta ao efeito pleiotrópico pretendido ii) definir a dosagem, regime e qual molécula a ser usada e iii) identificar os biomarcadores que reflitam precisamente as ações pleiotrópicas na doença de interesse. Dessa forma, segundo os autores, mais ensaios clínicos randomizados controlados poderiam ser executados para avaliação da eficácia das estatinas com outras indicações terapêuticas.

2.2.3 Mecanismos moleculares mediadores dos efeitos pleiotrópicos

Inúmeros estudos experimentais investigaram os motivos pelos quais as estatinas promovem múltiplos efeitos biológicos. Um dos estudos pioneiros de Rezaie-Majd e colaboradores (2002), identificaram que as estatinas foram capazes de modular a expressão de citocinas inflamatórias. Neste trabalho, a sinvastatina nas concentrações de 20 e 40 mg/dia diminuíram a expressão sérica de IL-6, IL-8 e a proteína quimioatraente de monócito tipo 1, do inglês MCP-1, após 6 meses de tratamento. A modulação de citocinas *in vitro* foi descrita por vários trabalhos a posteriori em diferentes áreas da inflamação como descrito no quadro 3.

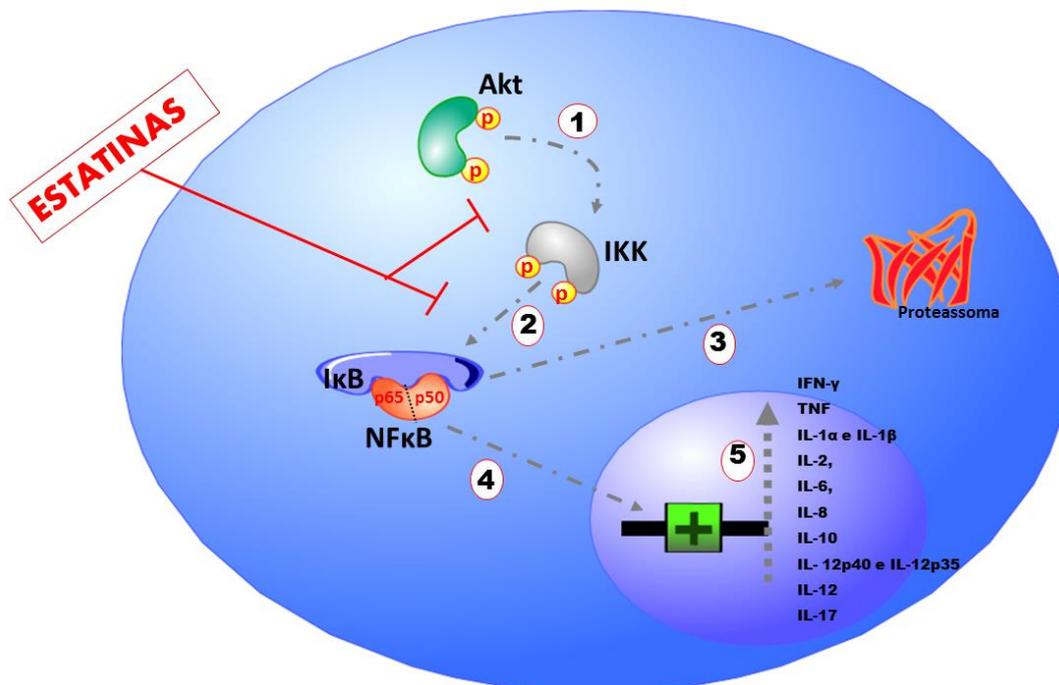
Quadro 3: Relação de estudos na área de modulação de citocinas por estatinas *in vitro* IFN γ ; interferon gama, GM-CSF: fator estimulante de colônia granulocítica-monocítica; PGE2: prostaglandina E2; TGF- β 1: fator de crescimento transformante beta 1; TNF: fator de necrose tumoral. Fonte: autor (2018).

Estatina	Estudo	Citocinas avaliadas	Referência
atorvastatina lovastatina pravastatina sinvastatina	Inflamação Geral	IL -1ra, IL-2, IL-6 e IFN- γ ;	BESSLER <i>et al.</i> , 2005
sinvastatina	Periodontite	IL-1 β , IL-6 e IL-8	USUI <i>et al.</i> , 2008
sinvastatina	Lesão Renal aguda	IL -10 e TNF	FERRARI <i>et al.</i> , 2011
pitavastatina pravastatina	Pneumonia	IL -6, IL -8, GM-CSF	IWATA <i>et al.</i> , 2012
atorvastatina lovastatina sinvastatina	Inflamação Geral	IFN- γ , IL-1 β IL-17	JAMEEL <i>et al.</i> , 2013
pitavastatina	Fibrose Idiopática Pulmonar	TGF- β 1	OKA <i>et al.</i> , 2013
sinvastatina	Artrite Reumatóide	IFN- γ , IL -6, IL -17A e IL -22	PEREIRA <i>et al.</i> , 2014
atorvastatina fluvastatina	Neuroinflamação	IL -1 β , TNF e PGE2	FARLAND <i>et al.</i> , 2017

Um dos mecanismos pelos quais as estatinas conseguem modular a produção de citocinas inflamatórias é pela inibição do fator de transcrição nuclear κ B, do inglês, NF κ B. Este regulador transcricional é extensivamente estudado e descrito como mediador da expressão de genes envolvidos com o processo imunológico, principalmente quimiocinas e citocinas (HUNTER e PLAEN, 2014). De maneira resumida, ele é um heterodímero formado pelas subunidades p65 e p50 que estão inativadas no citoplasma pela proteína inibidora I κ B. Quando um estímulo externo induz a fosforilação do I κ B, pela IKK, I κ B fosforilado é direcionado para degradação via proteassoma. O NF κ B é, então, liberado e pode ser translocado para o núcleo. Lá, o NF κ B se liga à região promotora de vários genes alvos, aumentando suas expressões (LIU

et al., 2017). Hilgendorff e colaboradores (2003) demonstraram inicialmente que a atorvastatina e demais estatinas inibiram a ativação do NF κ B de maneira concentração-dependente em monócitos provenientes de voluntários saudáveis. Essa inibição ocorreu pela redução da fosforilação da proteína inibidora de NF κ B, o I κ B e foi independente da presença do mevalonato. Em células monocíticas e osteoblásticas, a fluvastatina e a sinvastatina inibiram a fosforilação de Akt e consequente ativação de NF κ B (FUKUYAMA *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2004). Ademais, o tratamento de células endoteliais com cerivastatina, inibiu a ativação NF κ B induzido por TNF e a translocação da subunidade p65 para o núcleo (González-Fernández *et al.* 2001). A figura 6 ilustra as principais citocinas reguladas pela translocação do NF- κ B ao núcleo celular.

Figura 8: Estatinas inibem transcrição de citocinas via repressão da translocação do NF κ B. As estatinas inibem duas vias de fosforilação importantes: a de I κ k por akt (1) e a de I κ B por I κ k (2). Consequentemente, o I κ B deixa de ser degradado pelo complexo proteassoma (3) e continua ligado ao NF κ B. Dessa forma, o NF κ B é impedido de translocar-se para o núcleo (4) e induzir a síntese de várias citocinas inflamatórias (5). Fonte: Autor (2019).



É por meio do NF κ B que as estatinas também podem interferir no processo de apoptose. A análise do promotor do gene Bcl-2 revelou inúmeros sítios de ligação ao NF κ B (VIATOUR *et al.* 2003). Em extensa revisão do papel das estatinas na expressão de proteínas da família Bcl-2, Wood e colaboradores (2013) elencaram os principais pontos dos estudos que investigam as atividades anti e pró-apoptóticas das estatinas. Eles identificaram que estudos em câncer,

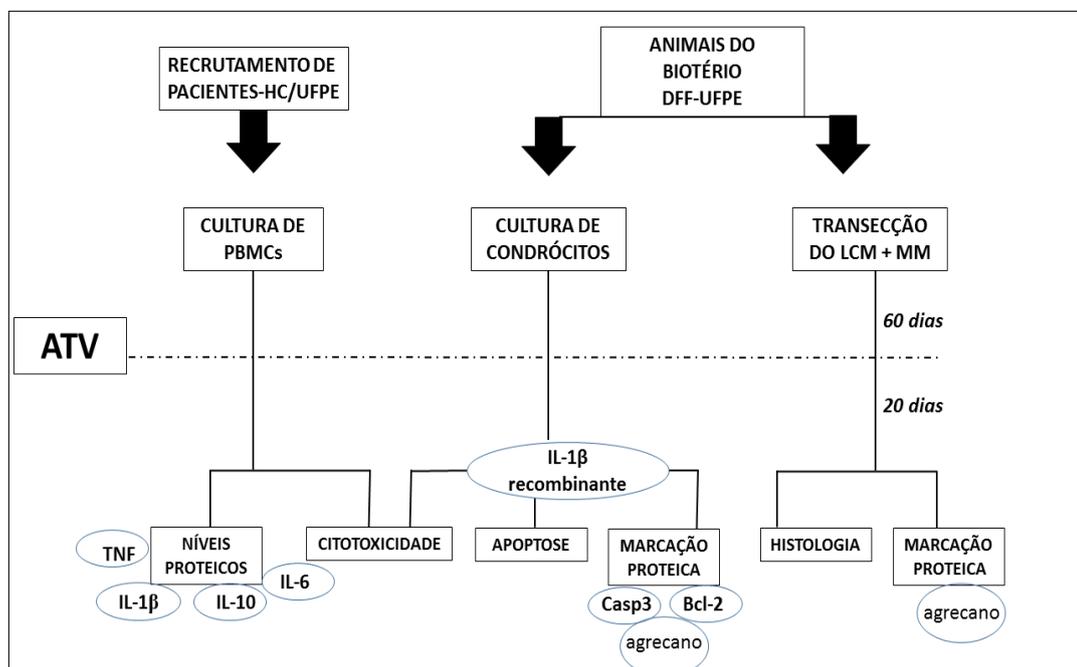
doses acima de 5 μ mol/L de estatinas foram capazes de diminuir a expressão de Bcl-2, promovendo a apoptose. Alguns trabalhos sugerem, inclusive, o reposicionamento farmacológico das estatinas para o tratamento de câncer de próstata e ovário (KOBAYASH *et al.* 2017; CHEN *et al.*, 2018). Contudo, concentrações iguais ou abaixo de 1 μ mol/L apresentaram efeito contrário e, geralmente, foram usadas em ensaios com células normais. O ponto crítico para a atividade biológica das estatinas parece ser dose e célula-dependente. Portanto, a investigação experimental das estatinas na osteoartrite é essencial para compreensão dos efeitos observados na clínica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

O estudo é caracterizado como transversal analítico de caráter experimental dividido em três eixos. O primeiro eixo foi realizado *in vitro* com amostras de sangue de pacientes com osteoartrite. O segundo eixo, refere-se aos ensaios realizados com cultura primária de condrócitos advindos de amostras de cartilagem de ratos. O terceiro eixo, foi realizado por meio da execução do modelo experimental cirúrgico de osteoartrite também em ratos. O fluxograma representado na figura 8 apresenta, em resumo, a metodologia de trabalho desta pesquisa.

Figura 9: Fluxograma do plano de trabalho. Bcl-2: proteína 2 de linfoma de células B; Casp-3: caspase 3; DFF: departamento de fisiologia e farmacologia; LCM: ligamento colateral medial; MM: menisectomia medial; PBMC: célula mononuclear do sangue periférico; TNF: *Tumor necrosis factor*.
Fonte: autor (2019).



3.2 Locais de realização das etapas/ Período de estudo

A seleção e avaliação clínica dos pacientes foi realizada no ambulatório do serviço de reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE. Os procedimentos experimentais foram conduzidos no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica (NUPIT-SG) da UFPE. Os animais utilizados nesta pesquisa foram mantidos no biotério de fisiologia e farmacologia da UFPE e, somente no

período da intervenção, foram transportados e mantidos no LINAT em estante ventilada para controle da temperatura. Toda a parte de processamento histológico foi realizada em colaboração com o Laboratório de morfometria do departamento de anatomia da UFPE. O estudo foi conduzido no período de março de 2016 à novembro de 2019.

3.3 Considerações éticas da pesquisa

O protocolo de trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/CCS), localizado no 3º andar do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, sob CAAE: 30748614.7.0000.5208, nº 723.390 (ANEXO 1). Os ensaios com animais foram submetidos à avaliação da comissão de ética no uso de animais (CEUA), localizado no 1º andar do Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco com aprovação do processo nº 007/2017 em 10/07/2017 (ANEXO 2).

3.4 Fármacos

A atorvastatina cálcica utilizada no trabalho foi obtida comercialmente pela Sigma Aldrich® (PZ0001-5mg). Ela foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração estoque de 10mM. As concentrações de uso para os ensaios *in vitro* foram diluídas diretamente em meio de cultura, estando o veículo a uma concentração máxima, em todos os experimentos, de 0,1% para 1mL. A metilprednisolona na forma de pó liofilizado foi gentilmente cedida. Para os ensaios *in vivo* foram utilizados comprimidos macerados de atorvastatina cálcica (EMS®) e prednisona 20 mg (Medley®). As concentrações utilizadas em cada ensaio estão descritas nas sessões específicas de cada metodologia.

3.5 Recrutamento da população

Foram incluídos neste trabalho 18 pacientes com diagnóstico clínico segundo o Colégio Americano de Reumatologia. Pacientes portadores de outras patologias autoimunes concomitantes, aqueles que no ato da avaliação clínica foi verificado a existência de infecções, neoplasias não foram coletados

A ficha clínica utilizada na pesquisa encontra-se disposta no apêndice 3. As características demográficas e clínicas dos pacientes estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Perfil clínico dos pacientes com osteoartrite recrutados do HC/UFPE para cultura de PBMC. dp: desvio padrão; DMDOA: drogas modificadoras da doença osteoartrite; F: feminino; HAS: hipertensão arterial sistêmica; M masculino. Fonte: autor (2019).

Características	Total (n=18)
Idade (anos), média±dp	59,2 ± 10,8
Sexo, (F/M)	(18/0)
Articulação acometida	n/ %
• Joelho	8/ 44,4
• Quadril	1/5,5
• Mãos	1/5,5
• Joelho/mãos	5/27,7
• Joelho/quadril	2/11,1
• Joelho/quadril/mãos	1/5,5
Doenças associadas	n/ %
• Depressão	4/22,2
• Diabetes	6/33,3
• Dislipidemia	4/22,2
• Fibromialgia	3/16,6
• HAS	6/33,3
• Hipotireoidismo	2/11,1
• Osteoporose	2/11,1
• Síndrome do carpo	2/11,1
• Tendinite	2/11,1
Medicamentos em uso	n/ %
• Analgésico	3/16,6
• Anti-inflamatório	8/44,4
• Antidepressivo	3/16,6
• Antidiabético	2/11,1
• Anti-hipertensivo	3/16,6
• Cálcio + vitamina D	2/11,1
• Diuréticos	2/11,1
• DMDOA	6/33,3
Tabagismo	n
• Sim/não/inativo/	3/8/1

Voluntários sadios (n=3) escolhidos aleatoriamente na população que frequenta a UFPE também foram recrutados. Eles não tinham diagnóstico de doenças reumatológicas, não haviam ingerido bebida alcoólica nas últimas 48h pré-coleta de sangue, ou estavam em uso de medicamentos imunossupressores.

3.6 Avaliação da citotoxicidade

O teste de toxicidade celular foi realizado por meio do ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium) o qual avalia a viabilidade por meio do estado metabólico da célula (SYLVESTER *et al.*, 2011). As PBMCs e os condrócitos murinos foram distribuídos em placas de 96 poços numa proporção de 5×10^5 células/poço e 10^4 células/poço, respectivamente. Foram adicionadas as concentrações de 0,1; 1; 10; 50 e $100 \mu\text{M}$ da ATV em triplicata experimental e as placas foram incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO_2 . Após 48h, foi adicionado $20 \mu\text{L}$ da solução de MTT (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) na concentração de 5 mg/mL diluída em solução salina de PBS estéril. Então, as placas foram protegidas da luz e incubadas mais uma vez por um período de 3h. Logo em seguida, a reação foi então interrompida pela adição de $130 \mu\text{L}$ de dodecil sulfato de sódio a 20%. A leitura da densidade óptica foi realizada em um leitor de microplacas (EL808 - Biotek®) após 24 horas, no comprimento de onda de 570 nm. A determinação do potencial citotóxico da atorvastatina foi calculada em relação a condição de célula apenas com o veículo DMSO a 0,1%.

3.7 Cultura de células mononucleares do sangue periférico

As PBMCs foram purificadas a partir do método padrão de centrifugação de densidade com Ficoll Paque™ Plus (*GE Healthcare Bio-Sciences*). O cultivo foi feito em placas de 24 poços (10^6 células/1000 μL poço) em meio de cultura RPMI 1640(Gibco) suplementado com soro bovino fetal 10% (Gibco,), 2g de bicarbonato de sódio e penicilina e estreptomicina 200 U/ml (Gibco). As células foram mantidas em estufa úmida de CO_2 à 5% e na temperatura de 37°C (ROLAND *et al.*, 2013). O forbol-12miristato-13-acetato (PMA) a 20ng/mL e a ionomicina (Iono) a $1\mu\text{g/mL}$ (Sigma-aldrich, Missouri, EUA) consistiram em estímulos positivos para a cultura. O tratamento com a atorvastatina foi realizado na combinação ou não do estímulo positivo mais o fármaco nas concentrações de 0,1; 1, 10, 50 e $100\mu\text{M}$. O medicamento metilprednisolona (MP) à $100\mu\text{M}$ foi utilizado como parâmetro anti-inflamatório *in vitro*. Os sobrenadantes das culturas foram coletados no tempo de 24h para posterior quantificação das citocinas.

3.8 Quantificação de citocinas

As citocinas foram dosadas no sobrenadante de cultura de PBMC por meio de aquisições obtidas no citômetro de fluxo BD™ Accuri C6. A análise de quantificação foi

realizada pelo BD™ FCAP Array Software v3.0 seguindo instruções do fabricante. O quadro 5 apresenta as especificações do kit utilizado.

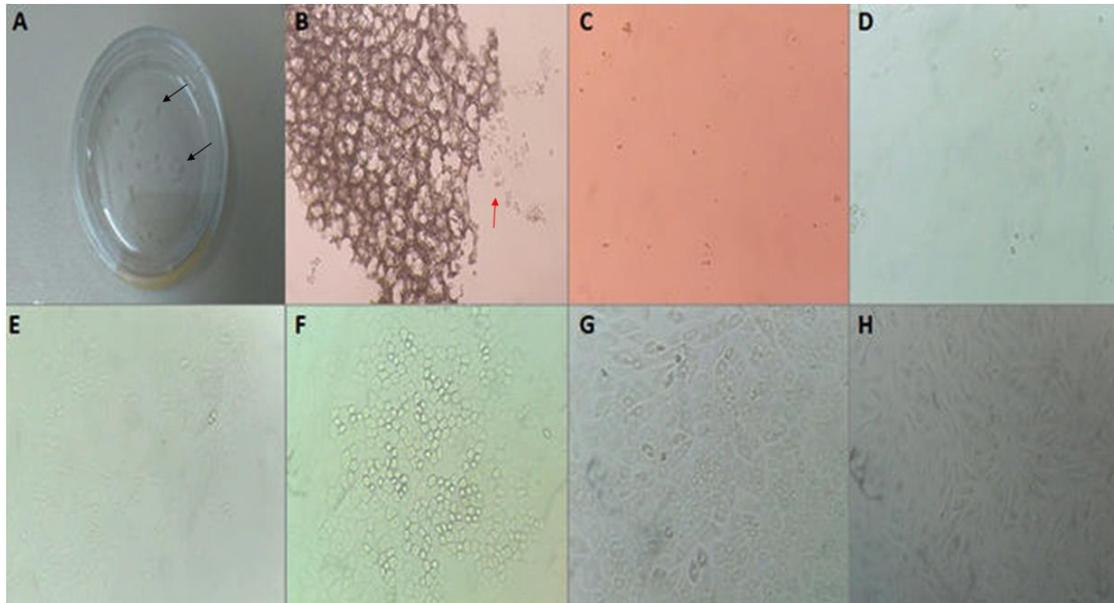
Quadro 4: Especificações do kit multiplex *human Inflammatory* (BD bioscience). pg/MI: pictogramas por mililitro; ref: referência. Fonte: autor (2018).

Kit <i>human Inflammatory</i>	Ref. 560484	pg/mL
IL-1 β		7.2- 5000
IL-6		2.5-5000
IL-10		3.3-5000
TNF		3.7-5000

3.9 Isolamento e cultura primária de condrócitos murinos

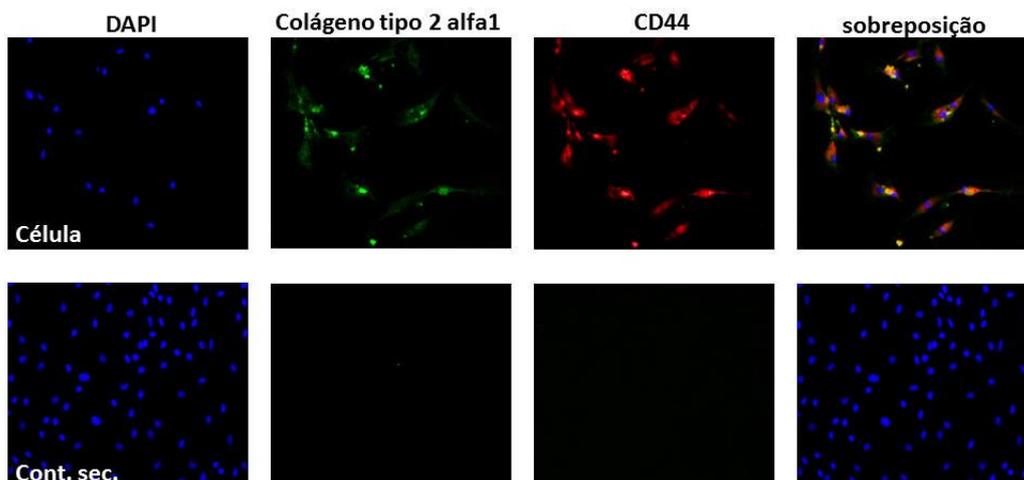
A obtenção de condrócitos murinos foi feita a partir de uma adaptação do protocolo de GOSSET e colaboradores (2008). Os condrócitos foram isolados da cartilagem dos côndilos femorais e tibiais de joelhos de ratos machos, acima de 6 meses que não sofreram nenhum tipo de intervenção e seriam descartados no biotério. Estes animais foram conduzidos ao LINAT onde foi realizada a eutanásia por meio de injeção intracardíaca com 1mL de cloreto de potássio (KCL) sob anestesia com cetamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) por via intraperitoneal. Os pedaços de cartilagem foram incubados 12h com colagenase tipo II (*Life Technologies*) à uma concentração de 3mg/mL em tampão salino estéril 1X. Após a digestão, as células que foram soltas da matriz passaram por um processo de filtração através de uma malha de *nylon* de 70 μ m, lavadas com solução salina 1X e ressuspensas em meio DMEN suplementado L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal e 200 U/ml de penicilina/estreptomicina. Elas foram cultivadas inicialmente em garrafas de cultura (22cm²), e mantidas em estufa úmida de CO₂ à atmosfera de 5% e na temperatura de 37°C. A compilação de fotos da figura 10 mostra as sucessivas etapas de isolamento e cultivo dos condrócitos.

Figura 10: Características microscópicas do isolamento e cultivo de condrócitos primários murinos. **A:** pedaços de cartilagem (seta preta) removidos dos epicôndilos tibiais e femurais em solução salina estéril. **B:** células (seta vermelha) desprendendo-se da matriz extracelular em solução de collagenase tipo II. **C:** condrócitos isolados após 12h de digestão. **D:** células isoladas ainda não aderidas ao 7º dia. **E:** 12º dia **F:** 14º dia. **G:** 19º dia de cultivo. Fotos tiradas no microscópio invertido Leica, objetiva 10X. Fonte: autor (2019).



As células foram expandidas até a terceira passagem antes de utilização nos experimentos. Previamente a realização do modelo *in vitro*, foi realizada a validação do fenótipo celular dos condrócitos por meio da marcação das proteínas CD44 e Colágeno tipo 2 alfa 1 conforme ilustrado na figura 11.

Figura 11: Caracterização fenotípica de cultura primária de condrócitos com a marcação das proteínas colágeno tipo 2 alfa 1 e CD44 (100X). Na primeira coluna estão marcados os núcleos celulares (DAPI), na segunda coluna o colágeno tipo 2 alfa 1 está marcado com o anticorpo fluorescente verde e na terceira coluna a coloração vermelha identifica a marcação da proteína CD44. CD44: cluster de diferenciação 44; DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol. Fonte: autor (2019).



3.10 Condições experimentais *in vitro*

As condições experimentais consistiram de poços somente com célula ou em adição da proteína recombinante IL-1 β 10ng/mL (Cusabio) e a proteína associada à atorvastatina nas concentrações de 1 e 10 μ M. A adição de IL-1 β foi usada em trabalhos anteriores como modelo *in vitro* do microambiente da osteoartrite (LORENZ *et al.* 2016; SPEICHERT *et al.* 2019).

3.11 Avaliação da morte celular

A avaliação quantitativa da morte celular foi realizada por citometria de fluxo por meio da marcação das células com anexina V conjugada ao fluoróforo FITC (Biolegend) em conjunto com iodeto de propídio (Sigma-aldrich, Missouri, EUA) (JIN *et al.*, 2014). As células foram plaqueadas a uma densidade de 5x 10⁴ por poço, em placas de 6 poços. Após 24h do tratamento, elas foram lavadas com PBS1X sem EDTA e deaderidas com tripsina 1x por 10 minutos à 37°C. Em seguida ao bloqueio da tripsina com soro bovino fetal 10%, as células foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, as células foram ressuspensas na solução de *binding buffer* 1X (BD biosciences) e incubadas com 5 μ L de anexina V-FITC e 2,5 μ L de iodeto (1mg/ mL) no escuro por 15 minutos. As células, então, foram lavadas com PBS 1X e ressuspensas no *binding buffer* 1x para aquisição no citometro de fluxo BD™ Accuri C6. As condições que alcançaram o patamar mínimo de 1x10³ eventos na população P1 foram incluídos na análise. Apenas a dupla marcação positiva de anexina V e iodeto foi considerado constatação de apoptose.

3.12 Avaliação da expressão proteica

Para avaliação da expressão de proteínas caspase-3 e Bcl2 e o proteoglicano agregano, as células foram plaqueadas em lamínulas redondas de 13 mm, em placas de 24 poços, a uma concentração 10⁴ células/poço. A detecção de caspase-3 e Bcl-2 foi feita por meio de imunofluorescência indireta. Na primeira etapa, as lamínulas foram retiradas e fixadas em metanol e acetona (1:1) por 20 minutos. Após lavagens com solução salina (PBS 1x); as células foram permeabilizadas com Triton X-100 à 0,5% por 30 minutos seguido por bloqueio das ligações inespecíficas com PBS1x/BSA à 5% por 1 hora. Decorrido esse tempo, os poços foram lavados e os anticorpos primários adicionados para incubação 12-16h em temperatura ambiente. Na segunda etapa, os anticorpos secundários conjugados a fluoróforos foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, mais uma etapa de lavagem foi realizada, seguida da incubação pelo DAPI por 5 minutos a temperatura ambiente. Após mais uma lavagem,

procedeu-se a montagem das lâminas com PBS/Glicerol (1:1) e observação no microscópio invertido Eclipse Ts2 (Nikon®, Tóquio, Japão).

A detecção do agrecano, por sua vez, foi realizada por imunocitoquímica (LI *et al.*, 2017). Em geral, a primeira etapa foi semelhante à imunofluorescência, exceto pelo bloqueio das ligações inespecíficas com o BSA à 10% e da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 0,03% (v/v) em metanol. Na segunda etapa, no lugar do anticorpo secundário, a peroxidase conjugada ao polímero HRP (DAKO Vision) foi adicionado por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, o cromógeno 3,3'-diaminobenzidino (DAB) foi adicionado por 2 minutos. O núcleo foi corado com hematoxilina de Meyers 1:4 (Sigma-aldrich, Missouri, EUA) por 30 segundos antes da montagem das lâminas com Entellan® (Merck Millipore, Massachusetts, EUA). As lâminas também foram observadas no microscópio invertido Eclipse Ts2 (Nikon®, Tóquio, Japão).

Quadro 5: Anticorpos usados me especificações. CD44: *cluster* de diferenciação 44; COL2A1: colágeno tipo 2 alfa 1; BCL-2: proteína 2 do linfoma de células B. FITC: isotiocianato de fluoresceína HRP: *horseradish* peroxidase; DAB: 3,3'-diaminobenzidino TR: *Texas red*. † O sistema consiste em um polímero marcado com HPR que é conjugado com os anticorpos secundário. Fonte: autor (2019).

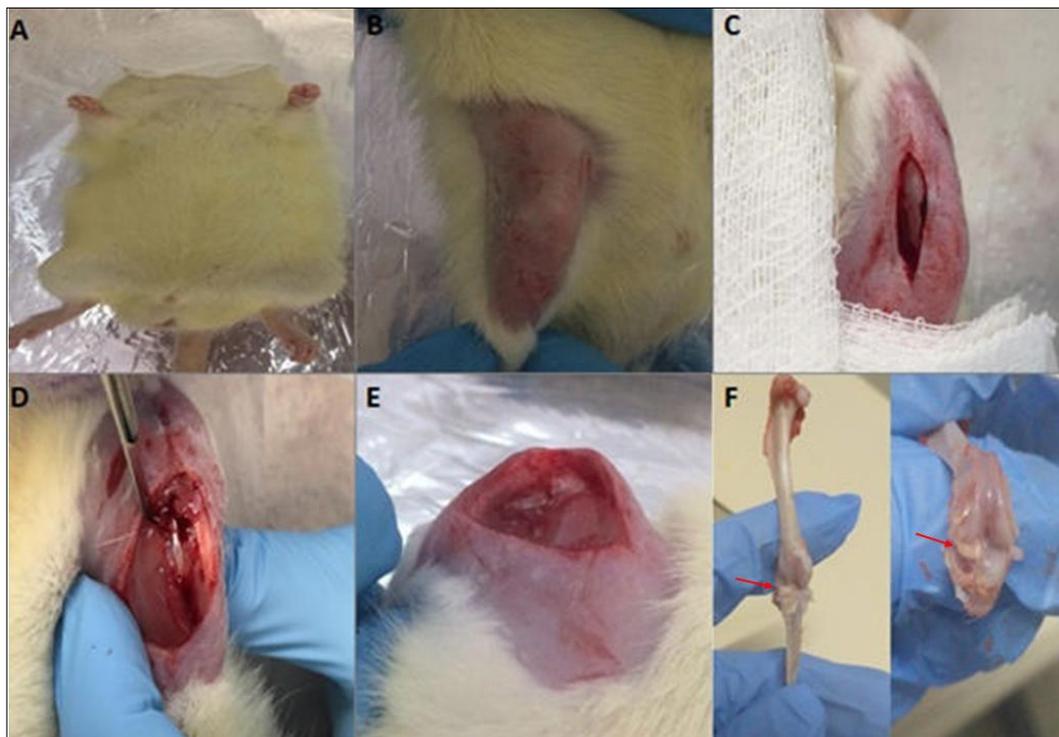
Anticorpo Primário	Origem	Diluição	Anticorpo Secundário/ fluoróforo	Cor Diluição
Anti-CD44		1:200	conjugado	Vermelho 1:300
Anti-Col2a1	coelho	1:150	Anti-coelho IgG FITC	Verde 1:300
Anti-Bcl2	camundongo	1:200	Anti-camundongo TR	Vermelho 1:300
Anti-caspase-3	cabra	1:200	Anti-cabra FITC	Verde 1:300
Anti-agrecano	camundongo	1:100	Sistema DAKO Envision†	Marrom 1:50

3.13 Indução cirúrgica de osteoartrite

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) (n=20), machos, com 250g de peso em média e 3 meses pós desmame foram anestesiados com ketamina (Dopalen®) à 100mg/kg e xilazina

(Anasedan®) à 10mg/kg, por via intraperitoneal. Foi realizada a tricotomia do joelho direito e assepsia com álcool 70%, seguido por uma incisão longitudinal da pele. A cápsula articular medial foi exposta, paralela ao ligamento colateral medial. O osso patelar foi rebatido à lateral para visualização das estruturas. O menisco medial foi removido (MM) e o ligamento colateral medial foi transeccionado (TCLM) (BENDELE, 2001). O grupo falso-operado (SHAM) foi submetido apenas à incisão da pele. A sutura interna e externa dos tecidos e pele foi feita com Vycril 5-0 cromado e Nylon 4-0, respectivamente. O monitoramento pós-operatório foi realizado nas primeiras 48h com analgesia de Dipirona (500mg/Kg), a cada 8h, por via intramuscular, antes do recolhimento ao biotério de fisiologia e farmacologia. Os animais foram mantidos com regime de água e ração *ad libitum*. As fotos das etapas do processo cirúrgico estão dispostas na figura 12.

Figura 12: Etapas da cirurgia do modelo de osteoartrite baseado na menisectomia medial (MM) associada à transecção do ligamento colateral medial (TCLM). Em (A) observa-se o animal em decúbito dorsal sob efeito anestésico. Com ausência de reflexos motores, a perna direita do animal foi tricotomizada (B) e a incisão (C) longitudinal paralela ao LCM (D). O LCM é cortado (E) enquanto que o MM é removido, como nota-se a presença (seta vermelha) desse elemento na parte lateral da articulação e ausência na parte medial no momento da eutanásia (F) Fonte: autor (2019).



3.14 Grupos experimentais e tratamento *in vivo*

Após 60 dias do procedimento cirúrgico, os animais foram distribuídos no grupo falso operado e aleatoriamente em 4 grupos experimentais de intervenção conforme disposto na tabela 2. Os ratos foram pesados diariamente por 20 dias na mesma balança, no horário entre 10:00-12:00 e antes da administração da intervenção por gavagem. No 21º dia, os animais foram eutanasiados com 1mL de KCL intracardíaco sob efeito anestésico. Os ossos da tíbia e do fêmur foram removidos para processamento posterior.

Quadro 6: Distribuição dos animais nos grupos experimentais e regimes de tratamento. Fonte: autor (2019).

Grupo	Tratamento	n
SHAM	PBS1xDMSO5%	4
	PBS1xDMSO5%	4
MM+TLCM	PBS1xDMSO5% + ATV 1mg/kg/dia	4
	PBS1xDMSO5% + ATV 10mg/kg/dia	4
	PBS1xDMSO5% + PRED 10mg/kg/dia	4

3.15 Processamento histológico e marcação proteica *in vivo*

O fêmur e a tíbia do joelho direito de cada animal foram fixados em formalina tamponada 10% por no mínimo 24h. Em resumo, foi feito manualmente e consistiu de descalcificação com ácido fórmico à 5% durante 4 dias e troca de solução a cada 24h. Em seguida as amostras foram progressivamente desidratadas com álcool etílico 70% à 100% e diafanizadas em 2 etapas distintas de xilol puro por 1 hora em cada etapa. Os cêndilos femurais e tibiais foram incluídos em parafina para confecção dos blocos histológicos e cortes frontais de 5µm foram corados com hematoxilina-eosina e Safranina-O *fast green* (KAMEKURA *et al.*, 2005; KAY *et al.*, 2010). As fotos das lâminas foram obtidas pelo microscópio invertido Eclipse Ts2 (Nikon®). O sistema de gradação histológica/histoquímica modificado de Mankin (anexo 3) foi utilizado para análise quantitativa dos achados (PAULI *et al.* 2012, Ozcan *et al.* 2017).

A marcação proteica do agrecano foi feita pela técnica de imunohistoquímica (LI *et al.*, 2017). Em suma, os cortes frontais dos ossos tibiais foram submetidos a duas etapas. A primeira parte compreende os processos de desparafinização, hidratação, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e ligações inespecíficas, com incubação 24h com o anticorpo primário. Na segunda etapa, ocorreu a incubação do polímero de amplificação (HRP) por 1h a

temperatura ambiente e do cromógeno DAB por 2 minutos. As lâminas foram coradas pela hematoxilina e o processo inverso da primeira etapa foi realizado para que as lâminas fossem montadas com Entellan® (Merck Millipore). As lâminas foram escaneadas no equipamento Panoramic MIDI II automatic digital slide scanner (3DHISTECH ltd, Budapeste, HUN). As Fotos de toda a extensão da cartilagem foi tirada no programa Panoramic viewer versão 1.15.4 (3DHISTECH ltd, Budapeste, HUN). A quantificação de condrócitos totais e marcados para a presença de agrecano foi realizada com auxílio do programa Image J versão 1.52a. (*National Institute of healthy*, Maryland, EUA).

3.16 Análise estatística

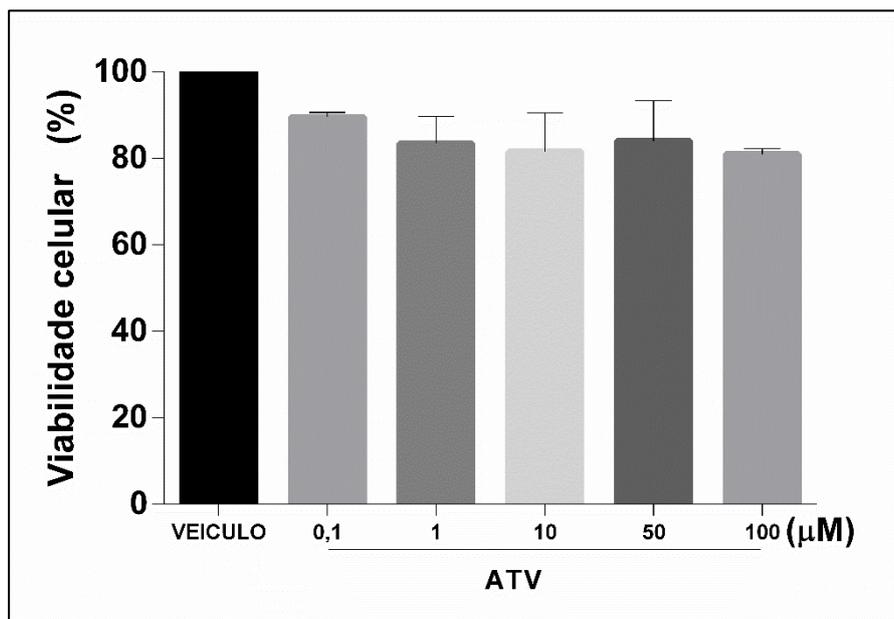
O software estatístico utilizado nas análises foi o GraphPad PRISM® versão 6.01(GraphPad Software Inc., California, EUA). Para averiguar a normalidade das variáveis utilizou-se o teste de *D'Agostino-Pearson omnibus normality test*. Para comparação dos dados com distribuição normal foram utilizados o teste pareado *t student* e o não-pareado One-way ANOVA. Para os resultados que não possuíam distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico pareado *Wilcoxon signed-rank test*. A significância estatística aceita quando o valor p foi <0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Toxicidade da atorvastatina em células de voluntários sadios

As células mononucleares do sangue periférico de três voluntários sadios foram testadas em triplicata experimental frente as concentrações 0,1;1;10;50 e 100 μ M. Como ilustrado nos gráficos da figura 12, as viabilidades das concentrações da atorvastatina em relação à solução contendo apenas o veículo (DMSO 0,1%) foram, em valor percentual e ordem crescente de concentração, 89,5 \pm 1; 83,4 \pm 6; 81,5 \pm 8; 84 \pm 9 e 80,9 \pm 1, respectivamente.

Figura 13: Percentual médio de viabilidade em PBMCs de voluntários sadios tratados *in vitro* com diferentes concentrações de atorvastatina. ATV: atorvastatina; μ M: micro molar Fonte: Elaborado pelo autor (2019).



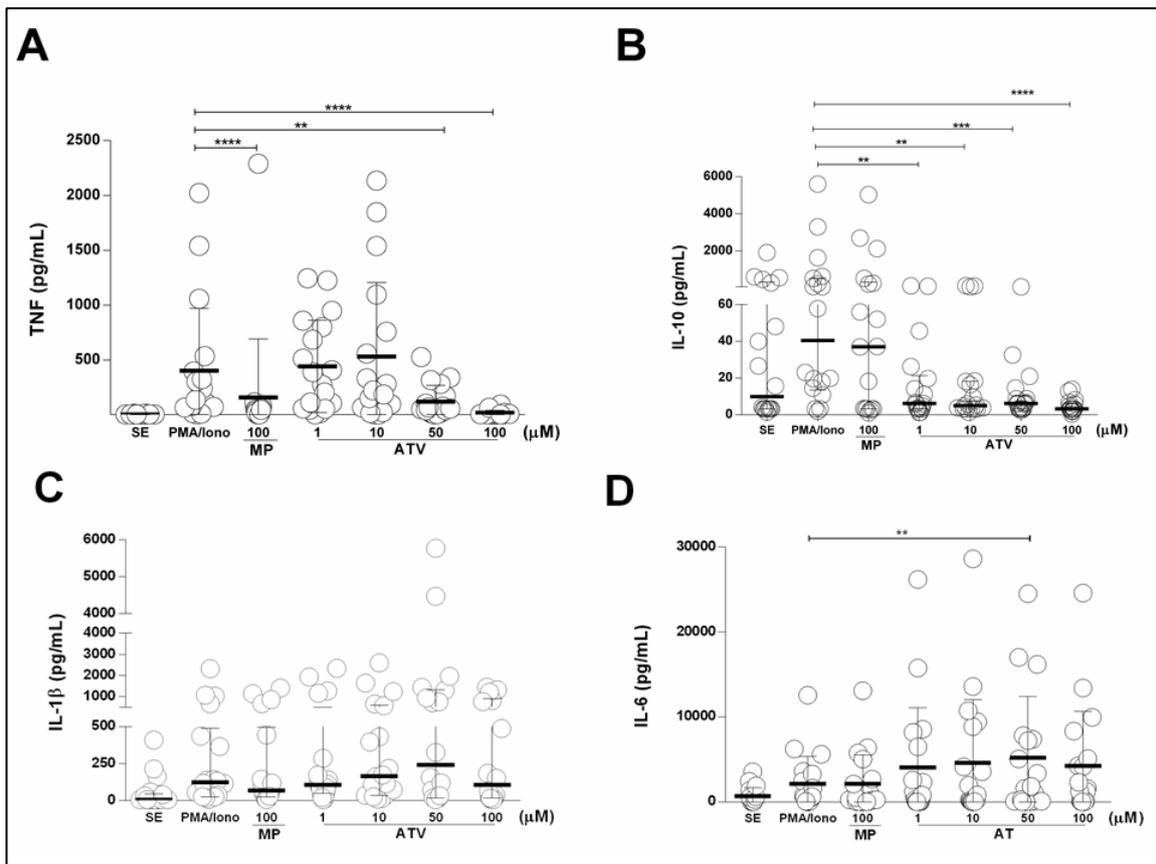
4.2 Produção de citocinas por PBMCs de pacientes com osteoartrite após tratamento *in vitro* com atorvastatina.

As concentrações avaliadas no ensaio de citotoxicidade apresentaram viabilidade acima de 80%. Dessa forma, todas foram avaliadas quanto ao potencial de modular a quantidade de citocinas no sobrenadante de cultura no tempo de 24h.

A adição da atorvastatina, nas concentrações de 50 e 100 μ M, diminuiu a quantidade TNF no sobrenadante de cultura quando comparada à condição de estímulo com PMA e Ionomicina (Figura 13A). Para estas concentrações, as comparações obtiveram significância estatística com $p=0.0046$ e $p=0.0008$, respectivamente. O mesmo efeito de inibição também foi

observado no controle anti-inflamatório, metilprednisolona (MP), à 100 μM ($p=0,0008$). Em relação a quantificação de IL-10, todas as concentrações da atorvastatina diminuíram, de maneira significativa, a secreção desta citocina no sobrenadante. Em ordem crescente de concentração, os valores de p foram 0,009; 0,007; 0,0002 e $<0,001$. Contudo, a metilprednisolona não diminuiu de maneira significativa os níveis dessa citocina (figura 13B). Também não houve diminuição dos níveis de IL-1 β e IL-6, os quais apresentaram discreto aumento concentração-dependente.

Figura 14: Níveis de A) TNF B) IL -10 C) IL -1 β D) IL -6 no sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com osteoartrite. As linhas horizontais representam os valores da mediana de cada condição e o intervalo interquartil 5-95%. ATV: atorvastatina, Iono: ionomicina; MP: metilprednisolona; μM : micro molar; PMA: *phorbol myristate acetate*; pg/mL: picogramas por mililitro. Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

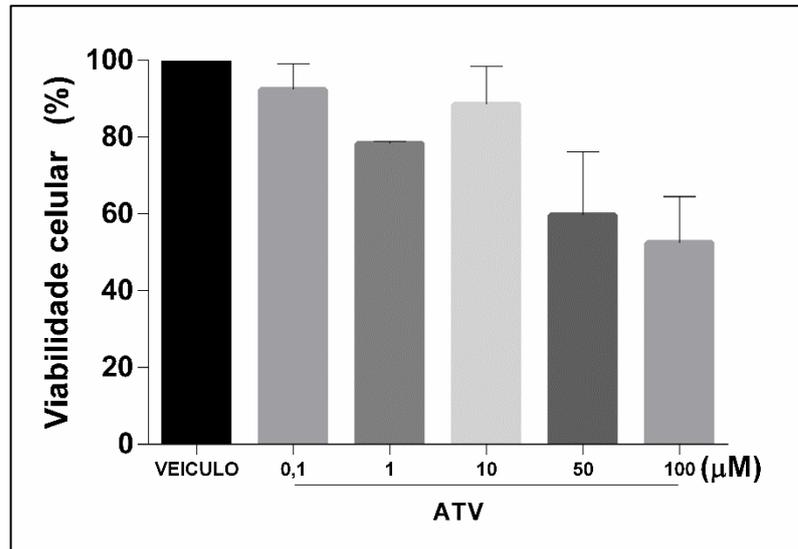


4.3 Toxicidade da atorvastatina em condrócitos murinos

O ensaio de citotoxicidade em condrócitos murinos foi realizado em triplicata experimental de 3 culturas primárias independentes. Os dados obtidos revelaram que as células apresentaram viabilidade acima de 70% apenas nas menores concentrações de ATV (0,1, 1e

10 μ M). A média das viabilidades para estas condições foram de 92,3 \pm 6% 78,5 \pm 10%; 88,6 \pm 9%, respectivamente. As concentrações de 50 e 100 μ M, mostraram toxicidade pronunciada com percentual médio de células metabolicamente ativas de 59,6 \pm 15% e 52,5 \pm 12%, respectivamente.

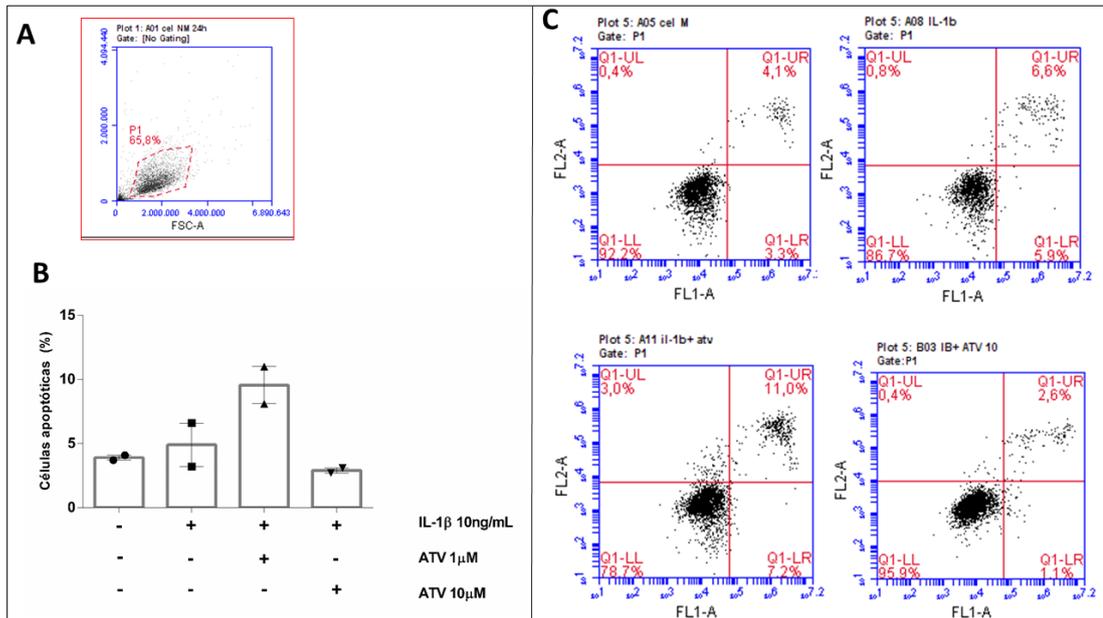
Figura 15: Percentual médio de viabilidade em condrócitos murinos tratados *in vitro* com diferentes concentrações de atorvastatina. ATV: atorvastatina; μ M: micro molar. Fonte: autor (2019).



4.4 Avaliação do efeito da atorvastatina na morte por apoptose em condrócitos murinos *in vitro*

A quantificação dos condrócitos induzidos à apoptose foi verificada através do percentual de células duplamente marcadas com a anexina V-FITC e iodeto de propídio. A análise preliminar dos dados revelou que a IL-1 β aumentou o percentual médio de células em apoptose de 3,9% para 5% no tempo de 24h. O tratamento da atorvastatina à 1 μ M mais do que duplicou a porcentagem de células duplo-positivas para 11%. Contudo, a concentração de 10 μ M reduziu a quantidade de apoptose para 2,9%, níveis próximos ao controle sem o estímulo da IL-1 β . A figura 15A mostra o gráfico do percentual de células em morte de 2 ou três experimentos independentes.

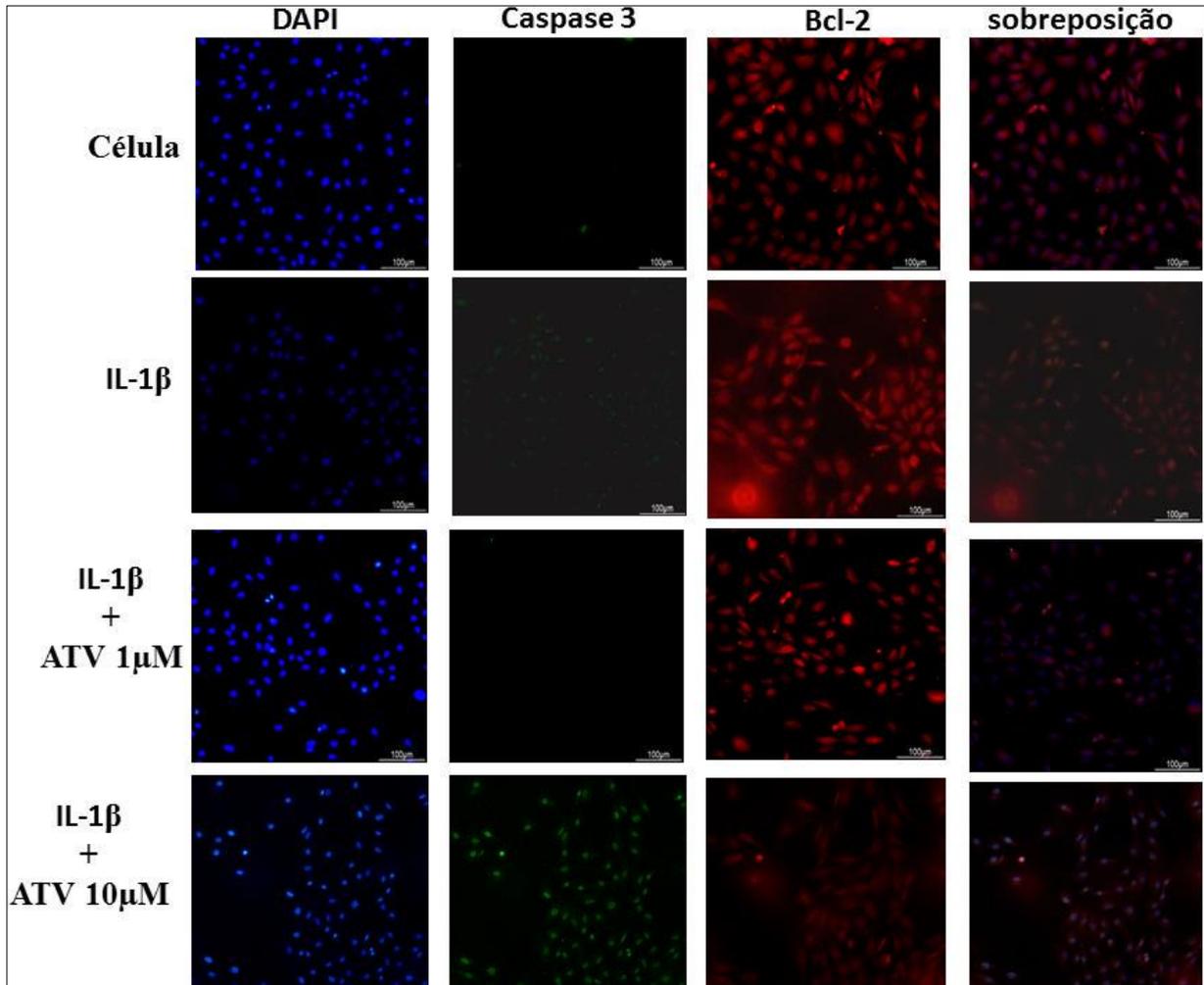
Figura 16: Efeito da atorvastatina na morte celular induzida por IL-1 β em condrócitos. Em 15A, está ilustrado a estratégia de delimitação da população alvo (P1) por tamanho (FSC-A) e granulidade (SSC-A). Os gráficos de pontos demonstrados em 15B são representativos de cada condição experimental. Em 15C, o quadrante Q1-LL limita a área de células viáveis, em Q1-UL estão as células mortas por necrose (IP+) enquanto àquelas apenas positivas para Anexina encontram-se no Q1-LR. Os condrócitos duplamente marcados no quadrante Q1-UR são células apoptóticas. LL: *low left*; UL: *upper left*; LR: *low right*; UR: *upper right* Fonte: autor (2019).



4.5 Marcação proteica *in vitro* de Caspase-3 e Bcl-2 em condrócitos murinos

A análise qualitativa das proteínas pró apoptótica caspase-3 e Bcl2 foi realizada através da imunocoloração de fluorescência indireta. Os condrócitos, em seu estado basal, expressaram no citoplasma a proteína anti-apoptótica Bcl-2. Não foi observado, porém, a presença da caspase-3. Na condição apenas de estímulo com IL-1 β , foi possível visualizar a co-marcação de caspase-3 e Bcl-2. A caspase-3, no entanto, foi detectada no núcleo dos condrócitos. O tratamento com a atorvastatina 1 μ M apresentou as marcações das proteínas de maneira semelhante à condição basal, ou seja, não houve expressão de caspase-3. Na maior concentração da atorvastatina, observou-se a dupla marcação proteica de caspase-3 nuclear e Bcl-2 citoplasmática. Contudo, a marcação de caspase-3 aparentou visualmente ser mais intensa enquanto que a Bcl-2 foi menos marcada em relação ao estímulo de IL-1 β . Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes e as fotos representativas de cada condição estão dispostas na figura 17.

Figura 17: Fotomicrografia de condrócitos murinos marcados *in vitro* para as proteínas caspase-3 (verde) e Bcl-2 (vermelho (100X)). As fotos microscópicas representam os condrócitos em estado normal (primeira linha), estímulo com IL-1 β (segunda linha) e tratamento com Atorvastatina 1 (terceira linha) e 10 μ M (quarta linha) em cultura primária de condrócitos murinos no tempo de 24h. Os núcleos dos condrócitos estão marcados pelo DAPI (azul). Escala 100 μ m. DAPI: dicloridrato de 4', 6-diamidina-2'-fenilindole. Fonte: autor (2019).

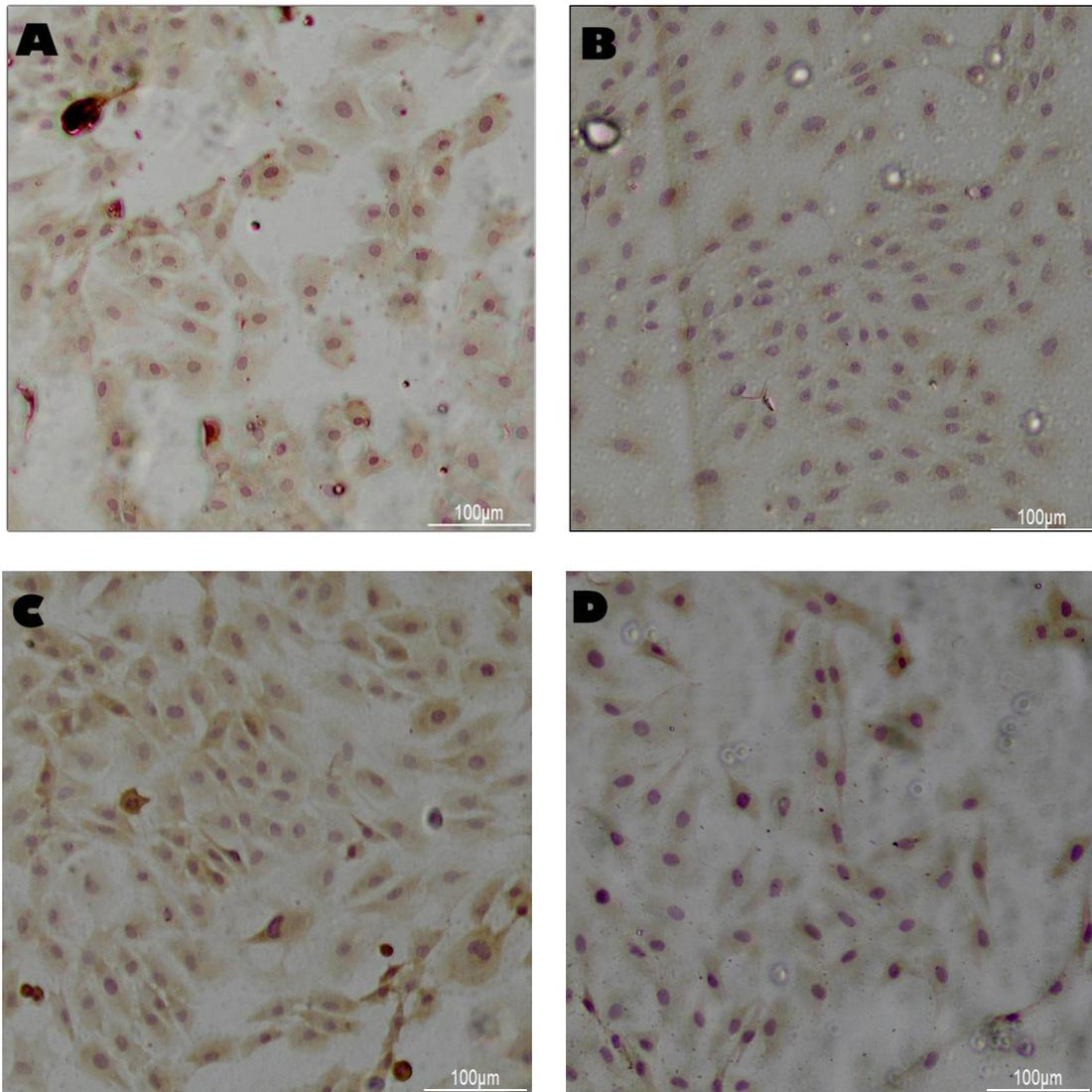


4.6 Marcação proteica *in vitro* de agrecano em condrócitos murinos

Dando continuidade a avaliação proteica *in vitro*, a detecção do agrecano foi realizada através da técnica de imunocitoquímica indireta. Após 24h de cultura, foi observado a marcação do agrecano (marrom) na condição de condrócitos sem nenhum estímulo. A marcação do agrecano revelou a morfologia poligonal, típica de condrócitos *in vitro*. Na presença de IL-1 β , contudo, a morfologia evidenciada pela detecção do agrecano revelou um citoplasma mais alongado, menos marcado que a condição basal ou quase ausente em algumas células. Na figura 18C, nota-se que a células estimuladas por IL-1 β e tratadas com ATV a 1 μ M exibiram marcação mais intensa que o estímulo de IL-1 β e uma morfologia mista. Alguns condrócitos apresentaram

citoplasma mais abundante à marcação do agregano enquanto outros permaneceram com o citoplasma delgado. Entretanto, na maior concentração da ATV (10 μ M), os condrócitos permaneceram com o citoplasma mais alongado, apesar da marcação do agregano ter sido mais evidente que a condição apenas com IL-1 β .

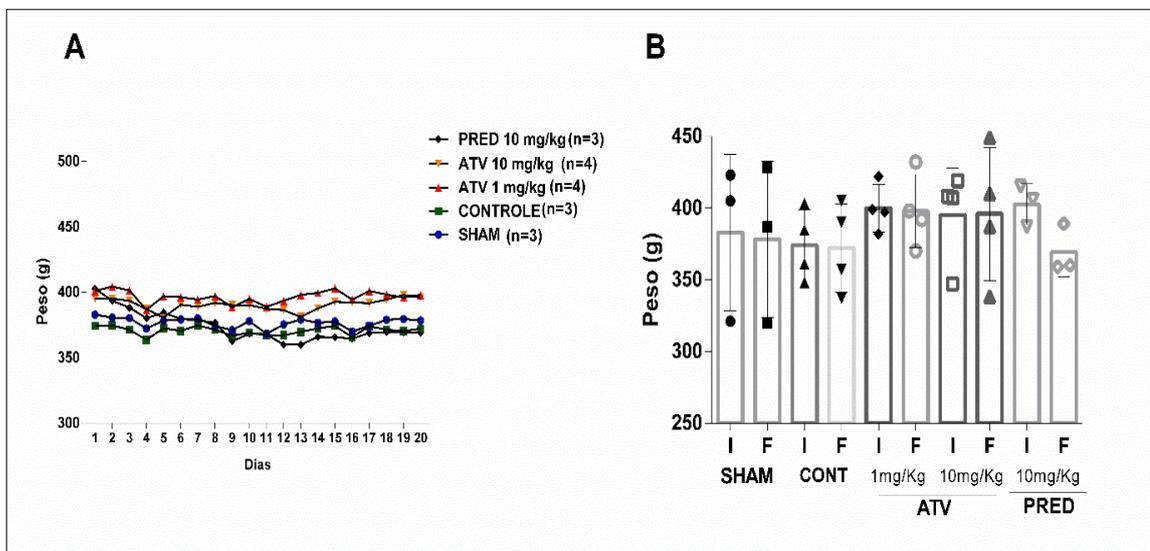
Figura 18: Fotomicrografia representativa de condrócitos murinos marcados *in vitro* para o proteoglicano agregano (marrom) (100X). As fotos microscópicas representativas de duas culturas independentes de células na ausência (A) e presença do estímulo IL-1 β (B), IL-1 β e tratamento concomitante de atorvastatina nas concentrações de 1 μ M (C) e 10 μ M (D) durante 24h. Os núcleos celulares foram corados por hematoxilina. Escala 100 μ m. Fonte: autor (2019).



4.7- Avaliação do peso corporal de ratos submetidos à MM associada a TLCM e tratados com atorvastatina e prednisona.

Após 60 dias da indução, os animais iniciaram o protocolo de tratamento. Todos os dias, os ratos foram pesados com o objetivo de calcular a concentração correta dos fármacos para cada quilograma do peso corporal. Dessa forma, foi possível analisar a variação do peso durante o período de 20 dias conforme demonstrado nos gráficos da figura 19.

Figura 19: Variação do peso corporal de ratos Wistar induzidos a modelo cirúrgico de osteoartrite. A média diária dos pesos dos animais de cada grupo está disposta em (A) enquanto em (B) encontra-se a comparação individual dos ratos de seu peso no início e final do tratamento. ATV: atorvastatina; início; F: fim; mg/kg: miligrama por quilograma; PRED: prednisona. Fonte: autor (2019).



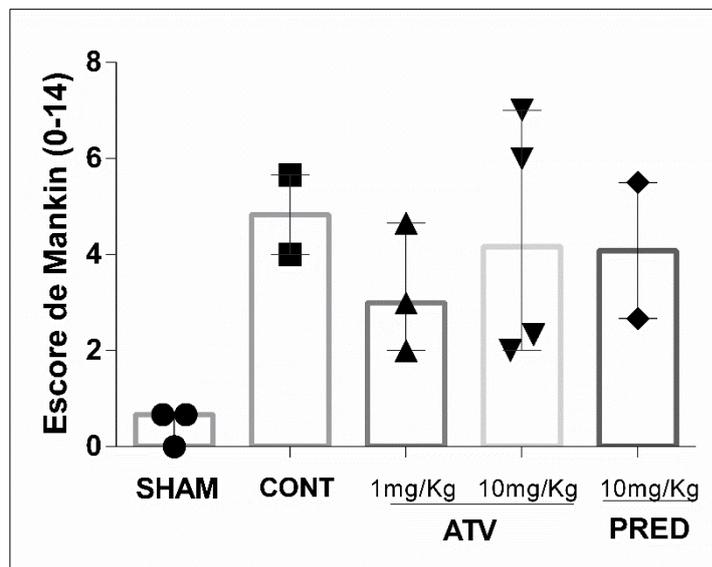
A comparação entre os grupos mostrou que não houve diferença estatística significativa do peso médio dos animais no início do tratamento ($p=0,7254$). O mesmo resultado foi verificado ao final do estudo ($p=0,7977$). A análise pareada intra-grupo também não mostrou diferença entre o peso no começo e ao término da intervenção. A condição prednisona, a qual observou-se uma variação maior entre o peso inicial e final, obteve valor de $p=0.1042$.

4.8 Análises histológicas dos cêndilos tibiais de ratos submetidos à MM associada a TLCM e tratados com atorvastatina e prednisona.

Com o intuito de avaliar as alterações histológicas induzidas pelo modelo adotado o instrumento de classificação histológica/histoquímica de Mankin foi utilizado (anexo 3). Do total de lâminas 17 lâminas confeccionadas, 3 não puderam ser analisadas devido a qualidade do tecido no momento da avaliação histológica. Para o processamento histológico, os ossos do

fêmur e da tíbia foram emblocados em parafina separadamente. Até o presente momento, apenas as tíbias completaram todo o protocolo experimental. Portanto, o gráfico da figura 20 apresenta as pontuações médias referentes apenas a porção medial do joelho direito dos animais.

Figura 20- Avaliação do dano articular pela graduação de Mankin em modelo cirúrgico de osteoartrite em ratos. As colunas representam as medianas da pontuação de Mankin uma vez que os dados não seguem distribuição normal. As figuras geométricas representam a média da pontuação de cada animal feita por 3 avaliadores independentes. CONT: controle; ATV: atorvastatina; PRED: prednisona; mg/kg: miligrama por kilograma. Fonte: autor (2019).



A avaliação preliminar dos cinco grupos mostrou que os animais falso-operados obtiveram a menor pontuação do escore de Mankin, com valor de mediana igual a 0,66, dentre todos os grupos. A alteração identificada nas lâminas que receberam pontuação neste grupo referiu-se a presença de irregularidades na superfície da cartilagem.

No grupo controle, o qual foi realizado o procedimento cirúrgico e tratamento somente com o veículo, solução salina mais DMSO 5%, o valor mediano da pontuação correspondeu a 4,83, com mínimo de 4 e máximo de 5,66. As alterações identificadas nas lâminas desses animais foram a presença de irregularidades de superfície, redução severa da coloração por safranina-o e ruptura da linha de maré por vaso sanguíneo.

O tratamento com atorvastatina na dose de 1mg/kg/dia reduziu a pontuação média para 3, mínima de 2 e máxima de 4,66 pontos. Os achados mais marcantes deste grupo incluíram irregularidades de superfície, fibrilação superficial e redução moderada da coloração por safranina-o. O grupo tratado com atorvastatina na dose de 10mg/kg/dia atingiu a maior pontuação dentre as intervenções. Com mediana de 4,16 as alterações identificadas nesse grupo

foram irregularidades de superfície, redução severa e áreas com ausência quase total de impregnação de safranina-o e zona de hipocelularidade.

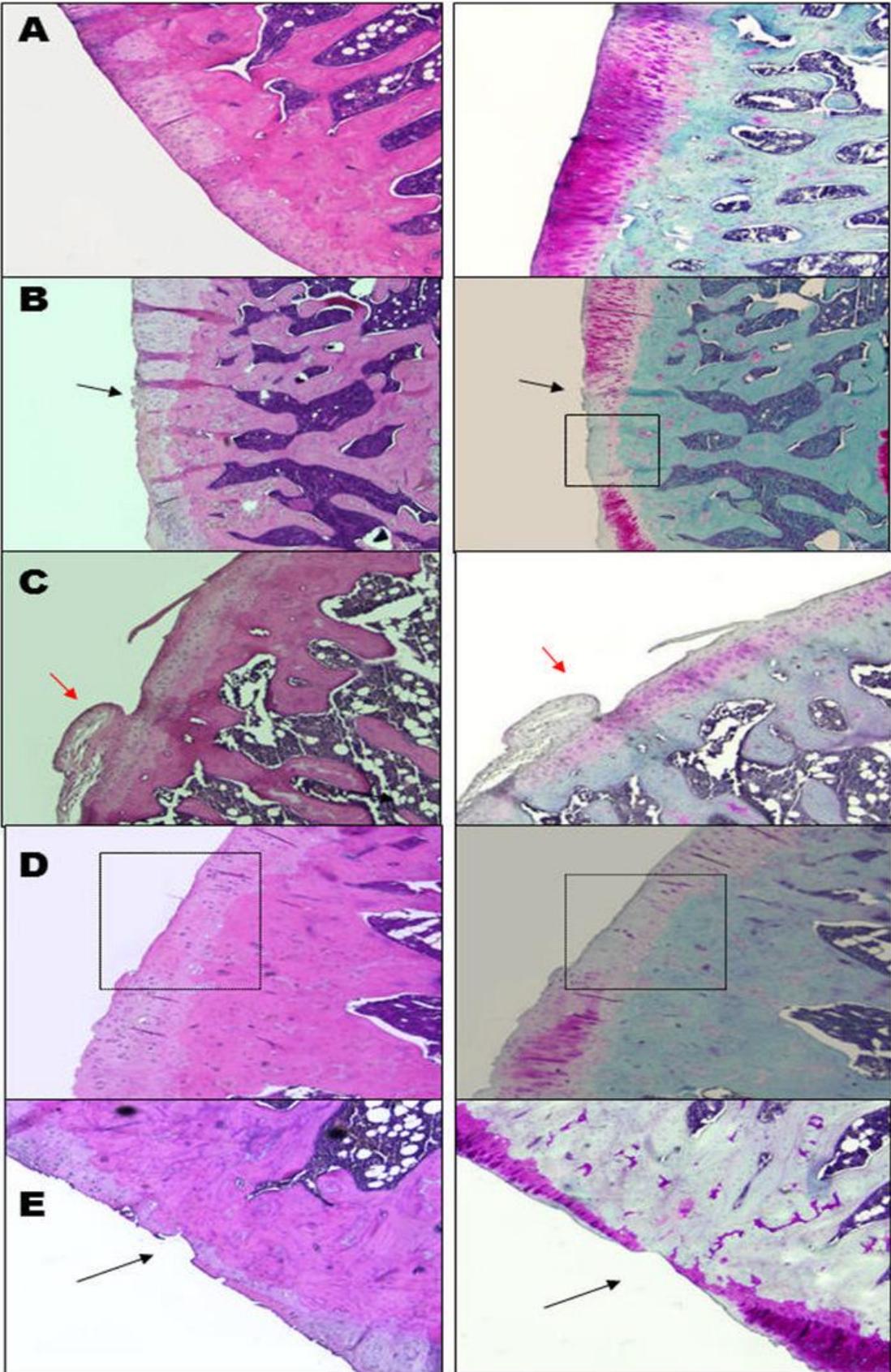
A pontuação média do grupo com tratado com prednisona (10mg/kg/dia) foi semelhante à atorvastatina na mesma concentração. A mediana para este grupo foi de 4,083 - mínimo de 2,66 e máximo de 5,5. Neste grupo foi possível observar, além de outras alterações, presença de fissuras até a zona de transição.

A figura 21 ilustra os parâmetros histológicos avaliados pelo escore de Mankin e identificados nas lâminas dos ratos submetidos a intervenção neste estudo.

Figura 21: Fotomicrografias de cortes histológicos da porção medial dos côndilos tibiais de ratos Wistar submetidos a indução de osteoartrite e tratados com atorvastatina e prednisona (100X). As imagens contidas na primeira coluna foram de lâminas coradas por hematoxilina/eosina e na segunda coluna, por safranina-o. Na primeira linha (A) encontra-se a imagem representativa do grupo falso operado; a linha da imagem (B) encontra-se o grupo controle, na qual identifica-se alterações de superfície (seta preta), área com redução de células e diminuição da marcação de safranina-o (cor rosa/roxa); em (C) está o grupo da ATV 1mg/kg/dia, com presença de fibrilação superficial (seta vermelha); na linha (D) está a imagem do grupo ATV 10mg/kg/dia onde é possível visualizar a redução da safranina-o e celularidade e em (E) encontra-se as imagens do grupo PRED 10mg/kg/dia, onde é perceptível alterações de superfície e presença de fissura. Fonte: autor (2019).

HE

Safranina-o

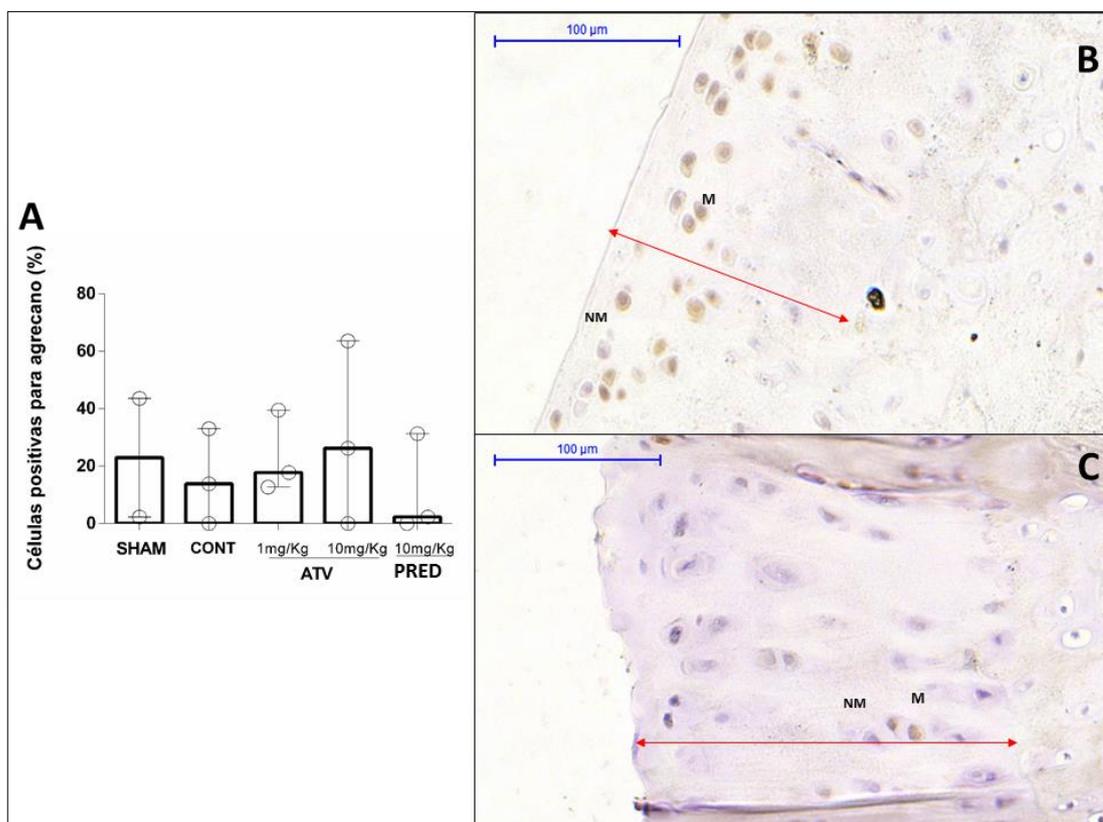


4.9 Marcação do agrecano nos cõndilos tibiais de ratos submetidos à MM associada a TLCM e tratados com atorvastatina e prednisona.

Para avaliação *in vivo* da expressão do agrecano, a detecção deste proteoglicano nos cortes histológicos foi realizada por imunohistoquímica. O efeito do tratamento foi estimado por meio da proporção de condrócitos marcados para o agrecano em relação ao total de células presentes na cartilagem.

Em todas os cortes, foi observado que a expressão do agrecano foi localizada nos *condrons*, não ultrapassando o limite das lacunas. A avaliação semi-quantitativa revelou diferença de percentual de condrócitos positivos dentro do mesmo grupo experimental e entre as diferentes intervenções. O resultado semi-quantitativo está descrito na tabela contida na figura 22A.

Figura 22: Condrócitos positivos para o agrecano em cortes histológicos da cartilagem de ratos conduzidos em protocolo experimental de osteoartrite. (A) Análise semi-quantitativa do percentual de condrócitos marcados para o proteoglicano entre os grupos experimentais. A avaliação foi realizada em toda a extensão das zonas superficial à profunda (seta vermelha). As células marcadas estão identificadas por “M” e não coradas por “NM” nos cortes representativos do grupo sham (B) e controle (C). ATV: atorvastatina; CONT: controle; PRED: prednisona. Fonte: autor (2019).



5. DISCUSSÃO

A proposta do presente estudo foi avaliar o efeito da atorvastatina em moléculas envolvidas nos processos inflamatório e de apoptose celular, considerando estes eventos importantes para o catabolismo articular da osteoartrite. A escolha de estudar uma estatina surge devido esse grupo farmacológico ter mostrando potencial benefício clínico em diversas indicações terapêuticas (MILLER *et al.*, 2014; KAVALIPATI *et al.*, 2015).

Inicialmente, avaliou-se a capacidade da atorvastatina, estatina sintética amplamente usada na prática clínica (JELLINGER *et al.*, 2017), em inibir a secreção de IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF no sobrenadante de cultura de PBMCs de pacientes. Apenas os níveis de TNF e IL-10 foram diminuídos de maneira significativa no sobrenadante. Os resultados encontrados foram congruentes a outros estudos que investigaram a modulação de estatinas em PBMCs de outras doenças (FERRARI *et al.*, 2011; NAKAGOMI *et al.*, 2012). Apesar de não investigado neste estudo, o NF- κ B, fator de transcrição central do TNF, foi negativamente regulado pelas estatinas em relatos anteriores (ORTEGA *et al.*, 1999; HÖLSCHERMANN *et al.* 2006; LANZERINNI *et al.*, 2007). Entretanto, a inibição do TNF de maneira isolada deve ser vista com cautela uma vez que, em estudos clínicos controlados, apenas subgrupos de pacientes se beneficiaram do uso dos anticorpos monoclonais bloqueadores de TNF (HERMANN *et al.*, 2018).

Em relação à IL-10, Perucha e colaboradores (2019) recentemente propuseram que a perturbação da via do colesterol induz a inibição específica da expressão de IL-10 em linfócitos TCD4⁺ humanos. No estudo, bem desenhado, foi demonstrado que a adição de atorvastatina ou 25-hidroxicolesterol reduziu, de maneira dose-dependente, os níveis transcritos e proteicos de IL-10 e de c-maf, fator de transcrição regulador de IL-10. Esse efeito foi revertido com a adição de colesterol à cultura, demonstrando ser colesterol-regulado. Além do mais, foi demonstrado que indivíduos pré-dispostos ao desenvolvimento de AR e baixa expressão gênica de enzimas da via do colesterol, apresentaram uma progressão livre de artrite menor.

A IL-10 foi identificada pioneiramente por Mosmann e colaboradores em 1989 e tem papel central na auto-limitação da resposta inflamatória (OUYANG *et al.*, 2011; LYER *et al.*, 2012). Partindo desse pressuposto, seria pertinente investigar se a inibição das estatinas sobre os linfócitos produtores de IL-10 promoveria impacto local na cartilagem. Outro ponto interessante é se esse mecanismo é linfócito-dependente uma vez que, outros tipos celulares também produzem IL-10. Na articulação, por exemplo, condrócitos e fibroblastos sinoviais são

capazes de produzir IL-10 e expressam constitutivamente o seu receptor (IANNONE *et al.* 2001).

Em relação as citocinas IL -1 β e IL -6, essas não foram inibidas pela ação da atorvastatina. Assim como o TNF, a transcrição da forma inativa da IL-1 β e a IL-6 são reguladas via ativação do NF- κ B (LIU *et al.*, 2017). Em estudos prévios também não houve a diminuição da IL-1 β por ação de alguma estatina (MONTEIRO *et al.*, 2000; BESSLER *et al.*, 2005; KUJIC *et al.*, 2007; LINDHOLM *et al.*, 2007).

Brandyn e Schertzer (2015) propuseram que as estatinas poderiam aumentar a atividade da caspase-1 via ativação do inflamassoma. A caspase-1 é a enzima proteolítica capaz de clivar a pró-IL-1 β em sua forma ativa e secretável. É sugerido que a diminuição dos intermediários da via do colesterol seja interpretada pela célula como sinal de alarme para presença de distúrbio metabólico (BRANDYN *et al.*, 2015). Em células de indivíduos saudáveis, porém, foi demonstrado que a IL-1 β e IL-6 foram inibidas pela ação da atorvastatina e da lovastatina (JAMEEL *et al.*, 2013). Podemos inferir que a ativação de NF- κ B e síntese da pró-IL-1 β não seria afetado pela posterior ação das estatinas em um ambiente inflamatório. Consequentemente, apesar de atuar na inibição do NF- κ B, o conteúdo previamente sintetizado de pró-IL-1 β seria clivado e secretado. A ação preventiva a síntese, nesse caso, talvez seja a melhor estratégia para inibir *in vitro* a secreção de IL-1 β .

A modulação da IL-6 pelas estatinas se mostra controversa entre os estudos. Em culturas de fibroblastos sinoviais, células musculares lisas e PBMCs, as estatinas modularam negativamente a secreção de IL-6 (YOKOTA *et al.*, 2006; Loppnow *et al.* 2011). Contudo, em nosso estudo e na pesquisa conduzida por Bessler e colaboradores (2005) foram observados níveis aumentados desta citocina. Chen (2005), ao investigar a cultura de fibroblastos orbitais, descreveu que a transcrição e produção da IL-6 foi induzida por IL-1 β na cultura. Apesar de ser um único estudo e em um tipo celular diferente, o resultado de IL-6 neste trabalho nos faz questionar se a IL-1 β não modulada pela atorvastatina poderia ter tido influência na secreção da IL-6. O padrão de secreção de ambas as citocinas nas concentrações de encontram-se semelhantes neste trabalho.

A osteoartrite é notadamente mais estudada a nível de cartilagem. Contudo, estudos em biópsias sinoviais de pacientes com osteoartrite identificaram aumento do infiltrado de linfócitos T, B na articulação (NAKAMURA *et al.* 1999; BENITO *et al.*, 2005). Através do ensaio de microarranjo de DNA, foi demonstrado que as PBMCs de pacientes com osteoartrite

apresentaram aumento da transcrição dos genes relacionados à: apoptose (CASP1,4,8); família do receptor do TNF (TNFRSF1A, TNFRSF9); IL-1 β (IL1B, IL18) e expressão diminuída da família do gene BCL2 quando comparado a controles sadios (CHAND *et al* 2016). Foi demonstrado, então, evidência de que a assinatura molecular patogênica da OA, inflamação e morte celular, não se restringe apenas a cartilagem.

Como sugerido por Chand e colaboradores (2016), a intervenção terapêutica, a esses alvos em PBMCs, seria uma alternativa para controlar a progressão da OA. Neste trabalho, foi realizada uma análise transversal da atividade da atorvastatina sobre os mediadores inflamatórios. Contudo, é preciso realizar uma avaliação de seguimento, com a dosagem de citocinas e correlação clínica antes e após o uso da estatina, para dimensionar o real impacto a nível sistêmico.

Prosseguindo com a avaliação a morte celular, nós avaliamos inicialmente a taxa de apoptose. Consideramos células apoptóticas somente àquelas duplamente marcadas para exposição da fosfatidilserina de membrana (anexina) e intercalação de DNA (iodeto de propídio). No tempo de 24h, observamos que a taxa de células em apoptose, após estímulo de IL-1 β , não foi tão expressiva quanto o percentual relatado em estudos anteriores (ZHOU *et al.*, 2008; XUE *et al.*, 2015; WANG *et al.* 2019). Entretanto, em um estudo que avaliou o efeito preventivo da pravastatina, estatina hidrofílica, os valores encontrados foram semelhantes ao descrito em nosso estudo, em média de 7,5%. O tratamento com a pravastatina à 20 μ M, reduziu em média apenas 1% dos condrócitos apoptóticos (MAO *et al.*, 2018). Em nosso trabalho, somente a concentração de 10 μ M obteve resultados satisfatórios quanto a redução. Curiosamente, a menor concentração (ATV 1 μ M) aumentou o percentual médio de morte celular. Mao e colaboradores (2018) manifestaram a possibilidade da IL-1 β , em estágios iniciais, impactar mais a indução de senescência e no catabolismo de MEC. A atividade da ATV 10 μ M foi mais efetiva do que dobro da concentração de pravastatina. As duas diferem quanto a solubilidade, sendo a ATV lipofílica. Essa característica facilita a passagem pela membrana celular e, assim, a observação da sua atividade em maior magnitude (SCHACHTER, 2005).

No tocante à expressão proteica das vias de morte, os tratamentos com as diferentes concentrações de ATV mostraram efeitos contrários em relação à caspase-3. Em baixa dose de ATV, verificamos que não houve marcação de caspase-3 enquanto que à 10 μ M a marcação nuclear ficou bem evidente. Em modelo de osteoartrite induzido por alta concentração de glicose, Hosseinzadneh e colaboradores (2019) mostraram que baixas concentrações de ATV

(0,1 e 0,01 μM) foram capazes de inibir significativamente a expressão de moléculas pró-apoptóticas como Bax e caspase 3 clivada. Efeito similar foi por descrito por ZHOU (2017) ao avaliar a inibição do transcrito da caspase-3 pela lovastatina à 2 μM . Em relação a Bcl-2, observamos a marcação da expressão em todas as condições e de maneira menos marcada quando acrescentada a maior dose da atorvastatina.

O papel das estatinas no processo apoptótico é controverso. Estudos em câncer e em concentrações acima de 10 μM evidenciaram uma sinalização mais pró-apoptótica. Todavia, trabalhos com células normais e em baixas concentrações < 5 μM , houve prevalência da cascata anti-apoptótica (WOOS *et al.*, 2013). A interrupção da biossíntese do colesterol com altas concentrações de estatinas, parece ser um gatilho para sinalização de morte celular (ALIZADEH *et al.*, 2017; CHIMENTO *et al.*, 2019). Talvez, a expressão mais acentuada de caspase-3 e menos marcada de Bcl-2 na condição de 10 μM possa ser reflexo desse mecanismo.

Em nosso estudo, investigamos de maneira qualitativa a expressão e localização das proteínas. Contudo, não é possível afirmar que a marcação de caspase-3 nuclear seja indicativa de um processo de apoptose ativo. A sua translocação ao núcleo é apenas sugestiva do processo já que sua forma inativa também foi descrita nesse compartimento (RAMUZ *et al.* 2003; PROKHOROVA *et al.* 2018). Para confirmar que houve apoptose é necessário avaliar os produtos finais das caspases como PARP-1 clivado, por exemplo (CHAITANYA *et al.* 2010).

Ao avaliarmos o agrecano, foi possível visualizar aparente mudança morfológica das células. No estímulo com a IL-1 β , os condrócitos apresentaram citoplasma mais alongado e menos marcado para o proteoglicano. Li e colaboradores (2017) mostraram resultado semelhante na redução de agrecano e colágeno tipo 2. Nosso resultado corrobora com achados anteriores que demonstraram que a IL-1 β diminuiu a expressão de proteínas características do fenótipo celular, tais quais agrecano, colágeno tipo 2 e SOX9 (TANG *et al.*, 2017). O SOX9 é o fator de transcrição regulador dos genes do agrecano e do colágeno tipo 2. Em condrócitos, a expressão diminuída de SOX9 aumentou a síntese das proteínas colágeno tipo 1 e alfa actina de musculo liso (α -SMA), características de fibroblastos (HARDINGHAM *et al.* 2006). Apenas com a concentração de ATV 1 μM , nós identificamos algumas células com citoplasma de semelhante a condição basal. Terabe e colaboradores (2019) demonstraram que a sinvastatina (5 μM) induziu a expressão de SOX9, reduziu α -SMA e restabeleceu a morfologia original. Alterações morfológicas impactam diretamente a funcionalidade dos condrócitos. O trabalho de Chen (2015) revelou que a IL-1 β por 24h aumentou a expressão de polímeros de F-actina.

Conseqüentemente, houve o aumento da rigidez celular promovido pelos polímeros. Essa mudança citoesquelética comprometeu a resposta contrátil induzida por agonista. Dessa forma, foi demonstrado que a IL-1 β *in vitro* através de alterações morfológicas pode interferir nas propriedades mecânicas dos condrócitos.

Por fim, investigamos a atividade da atorvastatina em um modelo cirúrgico de osteoartrite em ratos. Durante o protocolo, três animais foram eutanasiados: dois por micoplasmose e um animal por diminuição acentuada de peso. A micoplasmose é uma infecção causada pelo agente *mycoplasma spp.*, que muitas vezes se apresenta de maneira subclínica. Foi relatado que, em locais de experimentação animal, a taxa de infecção seja em torno de 75-80% (CEOLA *et al.*, 2016). É provável que, transitoriamente, a baixa imunidade provocada pela cirurgia tenha promovido a exacerbação dos sinais clínicos dos animais que estavam infectados. O terceiro animal que não completou o protocolo, perdeu peso de maneira acentuada nos primeiros 9 dias. Esse animal pertencia ao grupo tratado com prednisona 10mg/Kg/dia. LIU e colaboradores (2011) demonstraram que a hidrocortisona promoveu a perda de peso corporal, apetite e expressão peptídeo regulador do apetite no hipotálamo de ratos obesos e não obesos. Em nosso caso, não podemos afirmar que houve diminuição do consumo de ração, uma vez que não realizamos o controle metabólico das gaiolas. Entretanto, no geral, não houve diferença significativa do peso entre os grupos e antes e após o tratamento. Dessa maneira, a perda ou excesso de peso não foi fator influenciador na progressão do modelo entre os grupos experimentais.

Em relação ao modelo, a remoção do menisco medial associada à ruptura do ligamento colateral medial promoveu alterações histopatológicas mais significativas a nível de platô tibial. Esse resultado foi esperado uma vez que, o menisco medial é inserido no platô da tíbia e é responsável por distribuir a carga axial de maneira uniforme pelo compartimento (CRUZ *et al.*, 2017). Em nosso estudo, o grupo não tratado apresentou modificações histológicas compatíveis ao processo degenerativo. Foi possível observar a perturbação da integridade superficial, perda de condrócitos e proteoglicanos. Isso ocorre porque em modelos com remoção de menisco, a cartilagem absorve diretamente o impacto mecânico (BENDELE *et al.*, 2001; JANUSZ *et al.*, 2002). Para indução de lesões mais severas, alguns protocolos recomendam esperar entre 6 e 8 semanas. Nós realizamos o modelo com 8 semanas e, no entanto, não foi possível identificar uma destruição severa no grupo não tratado (ZHANG *et al.* 2016; FEI-HAN *et al.*, 2017; ALI *et al.*, 2018). É preciso prosseguir com avaliação do compartimento medial do osso femorais destes animais.

Verificamos que alguns animais dos grupos tratados apresentaram diminuição no escore de degeneração histológica. O grupo tratado com ATV 1mg/kg/dia revelou resultado mais promissor, com mediana abaixo do grupo não tratado. Os grupos tratados com ATV e PRED à 10mg/kg/dia mostraram resultados individuais contrários. Em cada condição, metade da população diminuiu os achados histológicos de degeneração, indicando possível melhora ao tratamento, enquanto que os demais a pontuação foi mais alta em relação ao controle. Em relação ao agrecano, a expressão do proteoglicano se mostrou bastante heterogênea entre os grupos.

A prednisona é um corticoide usado na rotina ambulatorial e, neste trabalho, serviu como referência de um fármaco tem potente atividade anti-inflamatória. Em recente ECR duplo-cego controlado, o HOPE, o regime de prednisona 10mg, via oral por 6 semanas de tratamento, melhorou consideravelmente os sintomas em pacientes com OA dolorosa da mão e sinais de inflamação (KROON *et al.*2019). É valido salientar que os pacientes do estudo HOPE foram avaliados quanto à melhora da dor e da funcionalidade. Não foi observado nesta pesquisa diminuição evidente das alterações histopatológicas referentes ao grupo PRED 10 mg/Kg/dia. Contudo, os alvos investigados no modelo *in vivo* não são mediadores inflamatórios e sim, parâmetros histológicos que podem ser alterados em um ambiente de inflamação. Ademais, não foi alvo deste estudo avaliar as atividades nociceptiva e de funcionalidade.

Em outros modelos animais de osteoartrite, as estatinas mostraram potencial terapêutico. Goto e colaboradores (2017) avaliaram a fluvastatina associada à microesferas em um sistema de liberação intra-articular controlado. Durante 5 semanas, as coelhas submetidas à ruptura do ligamento cruzado anterior foram tratadas com 1mg/kg/dia da fluvastatina peguilada. O grupo tratado apresentou superfícies relativamente lisas e maior densidade de coloração por safranina-o. A pontuação do escore da OARSI foi significativamente menor que o grupo não tratado. O sucesso do tratamento pode ser atribuído a via de administração e ao tempo de tratamento bem maior que em outros ensaios. A injeção-intraarticular é utilizada como forma de driblar o metabolismo de primeira e aumentar a biodisponibilidade do fármaco. Sabe-se que as estatinas sofrem intenso metabolismo hepático (SCHACHTER, 2005).

A própria atorvastatina foi investigada em modelo químico induzido por monoiodoacetado. Os ratos foram tratados nas doses de 3,10 e 30 mg/kg/dia via gavagem por 20 dias. O resultado descrito por Pathak e colaboradores (2015) revelou que o grupo tratado com ATV à 10mg/kg/dia mostrou recuperação parcial da superfície articular e reversão

completa dos danos à placa de crescimento entre epífise e metáfise. Ainda assim, e preciso salientar que os modelos induzidos cirurgicamente representam melhor apenas um dos vários fenótipos da osteoartrite. Na osteoartrite que ocorre espontaneamente em camundongos STR/Ort, a dieta com sinvastatina 40 e 80mg/kg/dia por 16 semanas não afetou o desenvolvimento de degeneração articular.

É preciso reconhecer que este estudo possui algumas limitações metodológicas importantes. A amostra de pacientes usados na cultura de PBMCs foi pequena frente a prevalência da doença na população. Além do mais se mostrou bastante heterogênea quanto as variáveis clínicas. O uso prévio de medicamentos, por exemplo, pode ter pré-sensibilizado as células na resposta *in vitro*. Entretanto, para minimizar esse viés foram realizadas análises por subgrupo de pacientes e não houve modificação nos resultados apresentados. Nas culturas primárias bem como nos grupos de animais, o baixo número de replicatas experimentais impossibilitou uma análise estatística adequada dos resultados. Todavia, os resultados preliminares descritos nesta pesquisa indicam que inibir a biossíntese do colesterol, por meio do uso da atorvasatina, seja uma estratégia promissora em modelos *in vitro* e *vivo* de osteoartrite.

6. CONCLUSÕES

- A atorvastatina apresentou atividade imunomoduladora *in vitro* ao diminuir os níveis de TNF e IL-10 e aumentar IL-6 no sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com OA;
- A taxa de apoptose celular foi alterada pelo uso *in vitro* da atorvastatina em modelo inflamatório *in vitro* induzido por IL- β em condrócitos murinos;
- A atorvastatina modulou a expressão proteica celular de caspase-3 e Bcl-2 em modelo inflamatório *in vitro* induzido por IL- β em condrócitos murinos;
- A atorvastatina, em baixa concentração, parece reverter as alterações morfológicas celulares e expressão de agregano em condrócitos murinos estimulados por IL- IL- β ;
- O modelo cirúrgico de MM+TCLM induziu alterações histológicas características de degeneração da cartilagem no platô do côndilo tibial;
- Embora preliminar, o tratamento com atorvastatina *in vivo* diminuiu as alterações histológicas em modelo murino de MM+TCLM;
- Embora preliminar, o tratamento com atorvastatina *in vivo* não modificou a expressão de agregano *in situ* em modelo murino de MM+TCLM.

7. PERSPECTIVAS

- Reproduzir os ensaios *in vitro* de apoptose para análise estatística dos dados;
- Quantificar TNF, IL-6 e IL-10 em sobrenadante de cultura de condrocitos murinos estimulados por IL-1 β e tratados ou não de maneira prévia com atorvastatina;
- Quantificar os níveis proteicos de caspase-3 e bcl-2, bax, bid em 24h de cultura e parp-1 clivado em 48h;
- Quantificar a taxa de apoptose dos condrocitos no tempo de 48h.
- Re-processar os blocos de parafina dos animais cujas lâminas não foram conduzidas à avaliação histológica;
- Avaliar, *in situ*, a expressão de colágeno tipo 2 em cortes histológicos de tíbias de Wistar submetidos à menisectomia medial associada a transecção do ligamento colateral medial e tratados com atorvastatina.
- Realizar a avaliação histológica dos côndilos femorais de ratos Wistar submetidos à menisectomia medial associada a transecção do ligamento colateral medial e tratados com atorvastatina

REFERÊNCIAS

- A VISSER, et al. Adiposity and hand osteoarthritis: the Netherlands Epidemiology of Obesity study. **Arthritis Research & Therapy**, vol 16, n. 1;19-20, 2014.
- ADÃES, S.; MENDONÇA, M.; SANTOS, T. N.; CASTRO-LOPES, J. M.; FERREIRA-GOMES, J.; NETO, F. L. Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2014.
- AHN, K. S.; SETHI, G.; AGGARWAL, B.B. Simvastatin Potentiates TNF- α -Induced Apoptosis through the Down-Regulation of NF- κ B-Dependent Antiapoptotic Gene Products: Role of I κ B α Kinase and TGF- β -Activated Kinase-1. **The Journal Of Immunology**, v. 178, n. 4, p.2507-2516, 2007.
- AIGNER, T.; KIM, H. A. Apoptosis and cellular vitality: Issues in osteoarthritic cartilage degeneration. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 8, p. 1986-1996, 2002.
- ALI, T. S.; PRASADAM, I.; XIOA, Y.; MOMOT, K. I. Progression of Post-Traumatic Osteoarthritis in rat meniscectomy models: Comprehensive monitoring using MRI. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6861, 2018.
- ALIZADEH J; ZEKI AA; MIRZAEI N, et al. Mevalonate Cascade Inhibition by Simvastatin Induces the Intrinsic Apoptosis Pathway via Depletion of Isoprenoids in Tumor Cells. **Sci Rep**, 7: 44841, 2017.
- ALTMAN, R. et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 33, n. 11, p. 1601-1610, 1990.
- ALTMAN, R.; ALARCÓN, G.; APPELROUTH, D.; BLOCH, D.; BORENSTEIN, D.; BRANDT, K.; BROWN, C.; COOKE, T. D.; DANIEL, W.; FELDMAN, D.; et al. The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. **Arthritis and Rheumatism**, v. 34, n. 5, p. 505-514, 1991.
- ALTMAN, R.; ASCH, E.; BLOCH, D.; BOLE, G.; BORENSTEIN, D.; BRANDT, K.; CHRISTY, W.; COOKE, T. D.; GREENWALD, R.; HOCHBERG, M.; et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. **Arthritis and Rheumatism**, v. 29, n. 8, p. 1039-1049, 1986.
- AMEYE, LG, YOUNG, MF. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the “Holy Grail.” **Curr Opin Rheumatol**, v.18, n. 5, p. 537–547, 2006.
- AMOAKO A.O.; PUJALTE GG. Osteoarthritis in young, active, and athletic individuals. **Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord**, vol 22, n 7, p.27-32,2014.
- ANDERSEN, S.; THYGESEN, L. C.; DAVIDSEN, M.; HELWEG-LARSEN, K. Cumulative years in occupation and the risk of hip or knee osteoarthritis in men and women: A register-based follow-up study. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 69, n. 5, p. 325-330, 2012.

- APPLETON, CT, MCERLAIN, DD, PITELKA, V. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 9, n. 1, p.R13, 2007.
- ARLIANI, G. G.; ASTUR, D. C.; YAMADA, R. K. F.; YAMADA, A. F.; MIYASHITA, G. K.; MANDELBAUM, B.; COHEN, M. Early osteoarthritis and reduced quality of life after retirement in former professional soccer players. **Clinics (São Paulo)**, v. 69, n. 9, p. 589-594, 2014.
- ASCER, E.; BERTOLAMI, M. C.; VENTURINELLI, M. L.; BUCCHERI, V.; SOUZA, J.; NICOLAU, J. C.; RAMIRES, J. A.; SERRANO, C. V. JR. Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, v. 177, n. 1, p. 161–166, 2004.
- BANNURU RR, OSANI MC, VAYSBROT EE, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 27, n.11, p. 1578–1589, 2019.
- BAUDART, P.; LOUATI, K.; MARCELLI, C.; BERENBAUM, F.; SELLAM, J. Association between osteoarthritis and dyslipidaemia: a systematic literature review and meta-analysis. **RMD Open**, v. 3, n. 2, p. e000442, 2017.
- BEATTIE, M. S.; LANE, N. E.; HUNG, Y. Y.; NEVITT, M. C. Association of statin use and development and progression of hip osteoarthritis in elderly women. **The Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 1, p. 106-110, 2005.
- BENDELE, A.M. Animal models of osteoarthritis. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 1, n. 4, p. 363–376, 2001.
- BENNEL, K.; HUNTER, D. J.; VICENZINO, B. Long-term effects of sport: preventing and managing OA in the athlete. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 8, n. 12, p. 747-752, 2012.
- BERENBAUM F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 1, p. 16-21, 2013.
- BESSLER, H.; SALMAN, H.; BERGMAN, M.; STRAUSSBERG, R.; DJALDETTI, M. In vitro effect of statins on cytokine production and mitogen response of human peripheral blood mononuclear cells. **Clinical Immunology**, v. 117, n. 1, p. 73-77, 2005.
- BETTERIDGE, J. The statins: a drug class to celebrate. **Trends in Urology & Men's Health**, v. 1, n. 1, p. 14-17, 2010.
- BIFULCO, Maurizio; MALFITANO, Anna Maria; MARASCO, Giuseppe. Potential therapeutic role of statins in neurological disorders. **Expert Review Of Neurotherapeutics**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.827-837, maio 2008. Informa UK Limited.
- BLALOCK D, MILLER A, TILLEY M, WANG J. Joint instability and osteoarthritis. **Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord**, vol 8, p. 15–23, 2015.
- BOYAN, B.D et al. Addressing the gaps: sex differences in osteoarthritis of the knee. **Biology Of Sex Differences**, v. 4, n. 1, p.4-5, 2013.

- BRENNAN-OLSEN, S. L.; COOK, S.; LEECH, M. T.; BOWE, S. J.; KOWAL, P.; NAIDOO, N.; ACKERMAN, I. N.; PAGE, R. S.; HOSKING, S. M.; PASCO, J. A.; MOHEBBI, M. Prevalence of arthritis according to age, sex and socioeconomic status in six low and middle income countries: analysis of data from the World Health Organization study on global AGEing and adult health (SAGE) Wave 1. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 18, n. 1, p. 271, 2017.
- BURGOS-VARGAS, R.; CARDIEL, M. H.; LOYOLA-SÁNCHEZ, A.; DE ABREU, M. M.; PONS-ESTEL, B. A.; ROSSIGNOL, M.; AVOUAC, B.; FERRAZ, M. B.; HALHOL, H. Characterization of knee osteoarthritis in Latin America. A comparative analysis of clinical and health care utilization in Argentina, Brazil, and Mexico. **Reumatología Clínica**, v. 10, n. 3, p. 152-159, 2014.
- BURRAGE, P. S.; MIX, K. S.; BRINCKERHOFF, C. E. Matrix Metalloproteinases: role in arthritis. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. , p. 529-543, 2006.
- CALICH, A. L.; DOMICIANO, D. S.; FULLER, R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? **Clinical Rheumatology**, v. 29, n. 5, p. 451-455, 2010.
- CEOLA C.F.; SAMPAIO J.; SOLANGE LÚCIA BLATT S.L.; CORDOVA C.M. Infecção por micoplasma e efeitos inflamatórios em roedores criados em laboratório para pesquisa experimental. **Rev Pan-Amaz Saude** v.7 n.2, 2016
- CEPEDA, M Soledad et al. Tramadol for osteoarthritis. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [s.l.], p.543-555, 19 jul. 2006. Wiley.
- CHADJICHRISTOS, C.; GHAYOR, C.; KYPRIOTOU, M.; MARTIN, G.; RENARD, E.; ALA-KOKKO, L.; SUSKE, G.; DE CROMBRUGGHE, B.; PUJOL, J. P.; GALÉRA, P. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 41, p. 39762–39772, 2003.
- CHAITANYA, G.V.; STEVEN, A.J.; BABU, P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Commun Signal**, vol 8, n. 31, 2010
- CHAND, V.; PATEL, S. L.; MISHRA, R.; TRIPATHY, B. C.; PRAKASH, J.; ASHRAF, Md. T.; GUPTA, V. Molecular signatures in peripheral blood mononuclear cells with osteoarthritis. **International Journal of Clinical Rheumatology**, v. 11, n. 6, p. 82-91, 2016.
- CHARLIER, E.; RELIC, B.; DEROYER, C.; MALAISE, O.; NEUVILLE, S.; COLLÉE, J.; MALAISE, M. G.; DE SENY, D. Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2146, 2016.
- CHEN, C.; XIE, J.; RAJAPPA, R.; DENG, L.; FREDBERG, J.; YANG, L. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α increase stiffness and impair contractile function of articular chondrocytes. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, vol. 47, n. 2, p. 121–129, 2015.
- CHEN, Yu-an et al. Simvastatin Therapy for Drug Repositioning to Reduce the Risk of Prostate Cancer Mortality in Patients With Hyperlipidemia. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 9, p.1-7, 22 mar. 2018. Frontiers Media SA.
- CHENG, Y. Y.; KOA, C. L.; LIN, S. Y.; CHANG, S. T.; WEI, T. S.; CHANG, S. N.; LIN, C. H. Effect of an increased dosage of statins on spinal degenerative joint disease: a retrospective cohort study. **BMJ Open**, v. 8, n. 2, p. e017442, 2018.

CHIMENTO, A. et al. Cholesterol and Its Metabolites in Tumor Growth: Therapeutic Potential of Statins in Cancer Treatment. **Frontiers in endocrinology**, 9: 807; 2019.

CHODICK, G.; AMITAL, H.; SHALEM, Y.; KOKIA, E.; HEYMANN, A. D.; PORATH, A.; SHALEV, V. Persistence with statins and onset of rheumatoid arthritis: a populationbased cohort study. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 9, p. e1000336, 2010.

CHU, C. Q.; SWART, D.; ALCORN, D.; TOCKER, J.; ELKON, K. B. Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 4, p. 1145-1151, 2007.

CHURCHWARD, M. A.; TODD, K. G. Statin treatment affects cytokine release and phagocytic activity in primary cultured microglia through two separable mechanisms. **Molecular Brain**, v. 7, n. 85, p. 1-12, 2014.

CLOCKAERTS S, VAN OSCH GJ, BASTIAANSEN-JENNISKENS YM, et al. Statin use is associated with reduced incidence and progression of knee osteoarthritis in the Rotterdam study [published correction appears in *Ann Rheum Dis*. 2012 Jul;71(7):1264]. **Ann Rheum Dis**. 2012;71(5):642–647.

COIMBRA, I. B.; PASTOR, E. H.; GREVE, J. M. D.; PUCCINELLI, M. L. C.; FULLER, R.; CAVALCANTI, F. S.; MACIEL, F. M. B.; HONDA, E. Osteoartrite (osteoartrite): Tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 6, p. 450-453, 2004.

COJOCARU, L.; RUSALI, A. C.; ŞUŢA, C.; RĂDULESCU, A. M.; ŞUŢA, M.; CRAIU, E. The Role of Simvastatin in the Therapeutic Approach of Rheumatoid Arthritis. **Autoimmune Diseases**, v. 2013, n. , p. 1-7, 2013.

CROSS, M.; SMITH, E.; HOY, D.; NOLTE, S.; ACKERMAN, I.; FRANSEN, M.; BRIDGETT, L.; WILLIAMS, S.; GUILLEMIN, F.; HILL, C. L.; LASLETT, L. L.; JONES, G.; CICUTTINI, F.; OSBORNE, R.; VOS, T.; BUCHBINDER, R.; WOOLF, A.; MARCH, L. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 7, p. 1323-1330, 2014.

CRUZ, R. S.; FERRARI, M. B.; METSAVAHT, L.; LAPRADE, R. F. Compreendendo as lesões das raízes posteriores dos meniscos: da ciência básica OA tratamento. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 52, n. 4, p. 463-472, 2017.

CULLEY, K. L.; DRAGOMIR, C. L.; CHANG, J.; WONDIMU, E. B.; COICO, J.; PLUMB, D. A.; OTERO, M.; GOLDRING, M. B. Mouse models of osteoarthritis: surgical model of posttraumatic osteoarthritis induced by destabilization of the medial meniscus. **Methods in molecular biology**, v. 1226, n. , p. 143-173, 2015.

DA MOTA, L. M.; DOS SANTOS NETO, L. L.; BURLINGAME, R.; MÉNARD, H. A.; LAURINDO, I. M. Laboratory characteristics of a cohort of patients with early rheumatoid arthritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 375-388, 2010.

DAS S, MOHANTY M, PADHAN P. Outcome of rheumatoid arthritis following adjunct statin therapy. **Indian J Pharmacol**, v. 47, n. 6, p. 605–609, 2015.

DAVIES, J. T.; DELFINO, S. F.; FEINBERG, C. E.; JOHNSON, M. F.; NAPPI, V. L.; OLINGER, J. T.; SCHWAB, A. P.; SWANSON, H. I. Current and Emerging Uses of Statins in Clinical Therapeutics: A Review. **Lipid Insights**, v. 9, n. , p. 13-29, 2016.

DE BOER, T. N. et al. Serum adipokines in osteoarthritis; comparison with controls and relationship with local parameters of synovial inflammation and cartilage damage.

Osteoarthritis and cartilage, v. 20, n. 8, p. 846-853, 2012.

DILLIGAN, N. N.; BARRY, A. J.; ABENE, M. F. "Hip and Knee pain." In: HARRIS, D. E.; BUDD, R. C.; FIRESTEIN, G. S. **Kelley's textbook of Rheumatology**, 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

D'LIMA, D. D.; HASHIMOTO, S.; CHEN, P. C.; COLWELL, C. W. JR.; LOTZ, M. K. Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, n. 8, p. 712-719, 2001.

DOGGRELL, S. A. Is Atorvastatin Superior to Other Statins? Analysis of the Clinical Trials with Atorvastatin Having Cardiovascular Endpoints. **Reviews on Recent Clinical Trials**, v. 1, n. 2, p. 143-153, 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicology Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 86, n. 5, p. 484-493, 2010.

EYMARD, F.; PARSONS, C.; EDWARDS, M. H.; PETIT-DOP, F.; REGINSTER, J. Y.; BRUYÈRE, O.; CHEVALIER, X.; COOPER, C.; RICHETTE, P. Statin use and knee osteoarthritis progression: Results from a post-hoc analysis of the SEKOIA trial. **Joint, Bone, Spine**, v. 1297-1319, n. 17, p. 30186-30190, 2017.

FANJUL-FERNÁNDEZ M, FOLGUERAS AR, CABRERA S, LÓPEZ-OTÍN C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochim Biophys Acta**, v 1803, n (1), p. 3-19,2010.

FARRUGIA M. AND BARON. B. The role of TNF- α in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells **Journal of Clinical and Translational Research**, vol 2, n 3, p. 84-90, 2016.

FERRARI, G. L.; QUINTO, B. M.; QUEIROZ, K. C. S.; LIZUKA, I. J.; MONTE, J. C.; DALBONI, M. A.; DURÃO, M. S.; CENDOROGLO NETO, M.; DOS SANTOS, O. F.; BATISTA, M. C. Effects of simvastatin on cytokines secretion from mononuclear cells from critically ill patients with acute kidney injury. **Cytokine**, v. 54, n. 2, p. 144-148, 2011.

FERREIRA, M. C.; OLIVEIRA, J. C. P.; ZIDAN, F. F.; FRANCIOZI, C. E. S.; LUZO, M. V. M.; ABDALLA, R. J. Total knee and hip arthroplasty: the reality of ASSISTANCE IN BRAZILIAN PUBLIC HEALTH CARE. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. , n. , p. 1-9, 2018.

FOLGUERAS, A. R.; CABRERA, S.; LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, n. 1, p. 3-19, 2010.

FONSECA, F. A. H. Pharmacokinetics of statins. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, n. 5, p. 9-14, 2005.

FOX, A. J.; BEDI, A.; RODEO, S. A. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. **Sports Health**, v. 1, n. 6, p. 461-468, 2009

FRANKLIN, J.; INGVARSSON, T.; ENGLUND, M.; LOHMANDER, S. Association between occupation and knee and hip replacement due to osteoarthritis: A case-control study. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 3, p. R102, 2010.

FUKUYAMA, R.; FUJITA, T.; AZUMA, Y.; HIRANO, A.; NAKAMUTA, H.; KOIDA, M.; KOMORI, T. Statins inhibit osteoblast migration by inhibiting Rac–Akt signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 3, p. 636-642, 2004.

GALLUZZI, L., VITALE, I., AARONSON, S. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ**, v 25, p. 486–541, 2018.

GARRIDO, C. Pascual *et al.* Anti-apoptotic treatments prevent cartilage degradation after acute trauma to human ankle cartilage. **Osteoarthritis And Cartilage**, [s.l.], v. 17, n. 9, p.1244-1251, set. 2009. Elsevier BV.

GHOURI, A.; CONAGHAN, P. G. Treating osteoarthritis pain: recent approaches using pharmacological therapies. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 37, n. 5, p. 124-129, 2019.

GIBSON, G. Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification. **Microscopy Research And Technique**, [s.l.], v. 43, n. 2, p.191-204, 15 out. 1998. Wiley.

GLANT, T. T.; RADACS, M.; NAGYERI, G.; OLASZ, K.; LASZLO, A.; BOLDIZSAR, F.; HEGYI, A.; FINNEGAN, A.; MIKECZ, K. Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1 domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 5, p. 1312-1321, 2011.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY 2013 COLLABORATORS. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 743–800, 2015.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Fernando *et al.* Cerivastatin prevents tumor necrosis factor- α -induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase: role of endothelial cytosolic proteins. **Atherosclerosis**, v. 155, n. 1, p.61-70, mar. 2001.

GOSSET M, BERENBAUM F, THIRION S, JACQUES C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. **Nat Protoc**, v. 3, n. 8, p. 1253–1260, 2008.

GOTO N, OKAZAKI K, AKASAKI Y, ISHIHARA K, MURAKAMI K, KOYANO K, AYUKAWA Y², YASUNAMI N², MASUZAKI T³, NAKASHIMA Y¹. Single intra-articular injection of fluvastatin-PLGA microspheres reduces cartilage degradation in rabbits with experimental osteoarthritis. **J Orthop Res**, vol 35, n. 11, p. 2465-2475, 2017.

GÜNTHER, K. P. Surgical approaches for osteoarthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 15, n. 4, p. 627-643, 2001.

HALL, A.C. The Role of Chondrocyte Morphology and Volume in Controlling Phenotype—Implications for Osteoarthritis, Cartilage Repair, and Cartilage Engineering. **Current**

Rheumatology Reports, v. 21, n. 8, 15 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

HAQUE, T.; KHAN, B. V. Atorvastatin: a review of its pharmacological properties and use in familial hypercholesterolemia. **Clinical Lipidology**, v. 5, n. 5, p. 615-625, 2010.

HARDINGHAM, T. E.; OLDERSHAW, R. A. and TEW, S. R. Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. **Journal of Anatomy**, vol. 209, p. 469-480, 2009.

HAWORTH, C.; BRENNAN, F. M.; CHANTRY, D.; TURNER, M.; MAINI, R. N.; FELDMANN, M. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor- α . **European Journal of Immunology**, v. 21, n. 10, p. 2575–2579, 1991.

HEINE, G.; DROZDENKO, G.; GRÜN, JR.; CHANG, H. D.; RADBRUCH, A.; WORM, M. Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 6, p. 1615-1621, 2014.

HENDRANI, A. D.; ADESIYUN, T.; QUISPE, R.; JONES, S.; STONE, N. J.; BLUMENTHAL, R. S.; MARTIN, S. S. Dyslipidemia management in primary prevention of cardiovascular disease: Current guidelines and strategies. **World Journal of Cardiology**, v. 8, n. 2, p. 201-210, 2016.

HENROTIN, Y.; KURZ, B.; AIGNER, T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 8, p. 643-654, 2005.

HEW, M.; BHAVSAR, P.; TORREGO, A.; MEAH, S.; KHORASANI, N.; BARNES, P. J.; ADCOCK, I.; CHUNG, K. F. Relative corticosteroid insensitivity of peripheral blood mononuclear cells in severe asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 174, n. 2, p. 134-141, 2006.

HIDA, Daisuke et al. CD44 knock-down in bovine and human chondrocytes results in release of bound HYAL2. **Matrix Biology**, [s.l.], v. 48, p.42-54, out. 2015. Elsevier BV.

HILGENDORFF, A.; MUTH, H.; PARVIZ, B.; STAUBITZ, A.; HABERBOSCH, W.; TILLMANN, H.; HÖLSCHERMANN, H. Statins differ in their ability to block NF- κ B activation in human blood monocytes. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, n. 9, p. 397-401, 2003.

HILL, C. L.; HUNTER, D. J.; NIU, J.; CLANCY, M.; GUERMAZI, A.; GENANT, H.; GALE, D.; GRAINGER, A.; CONAGHAN, P.; FELSON, D. T. Synovitis detected on magnetic resonance imaging and its relation to pain and cartilage loss in knee osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 66, n. 12, p. 1599-1603, 2007.

HOLSCHERMANN, H.; SCHUSTER, D.; PARVIZ, B.; HABERBOSCH, W.; TILLMANN, H.; MUTH, H. Statins prevent NF- κ B transactivation independently of the IKK-pathway in human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 185, n. 2, p. 240-245, 2006.

HORECKA, A.; HORDYJEWSKA, A.; Blicharski, T.; KOCOT, J.; ŻELAZOWSKA, R.; LEWANDOWSKA, A.; KURZEPA, J. Simvastatin Effect on Calcium and Silicon Plasma Levels in Postmenopausal Women with Osteoarthritis. **Biological Trace Element Research**, v. 171, n. 1, p. 1-5, 2016.

HUNTER, C. J.; DE PLAEN, I. J. Inflammatory signaling in NEC: role of NFKB and cytokines. **Pathophysiology**, v. 21, n. 1, p. 55-65, 2014.

HUSSAIN, S. M. et al. Female hormonal factors and osteoarthritis of the knee, hip and hand: a narrative review. **Climacteric**, [s.l.], v. 21, n. 2, p.132-139, 2018.

HWANG, H.; KIM, H. A. Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 11, p. 26035-26054, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação**. 2019. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>, acesso em: 13 de outubro de 2019.

IWATA, A.; SHIRAI, R.; ISHII, H.; KUSHIMA, H.; OTANI, S.; HASHINAGA, S.; UMEKI, K.; KISHI, K.; TOKIMATSU, I.; HIRAMATSU, K.; KADOTA, J. Inhibitory effect of statins on inflammatory cytokine production from human bronchial epithelial cells. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 168, n. 2, p. 234-240, 2012.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 32, n. 1, p. 23-63, 2012.

JAKKULA, E.; MELKONIEMI, M.; KIVIRANTA, I.; LOHINIVA, J.; RÄINÄ, S. S.; PERÄLÄ, M.; WARMAN, M. L.; AHONEN, K.; KRÖGER, H.; GÖRING, H. H.; ALA-KOKKO, L. The role of sequence variations within the genes encoding collagen II, IX and XI in non-syndromic, early-onset osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 6, p. 497–507, 2005.

JAKOWLEV, K.; LIVSHITS, G.; KALICHMAN, L.; BEN-ASHER, E.; MALKIN, I.; LANCET, D.; KOBLYANSKY, E. Search for hand osteoarthritis susceptibility locus on chromosome 6p12.3-p12.1. **Human Biology**, v. 79, n. 1, p. 1-14, 2007.

JAMEEL, A.; OOI, K. G-J.; JEFFS, N. R.; GALATOWICZ, G.; LIGHTMAN, S. L.; CALDER, V. L. Statin Modulation of Human T-Cell Proliferation, IL-1 and IL-17 Production, and IFN- T Cell Expression: Synergy with Conventional Immunosuppressive Agents. **International Journal of Inflammation**, v. 2013, n. , p. 1-11, 2013.

JANUSZ, M. J.; BENDELE, A. M.; BROWN, K. K.; TAIWO, Y. O.; HSIEH, L.; HEITMEYER, S. A. Induction of osteoarthritis in the rat by surgical tear of the meniscus: inhibition of joint damage by a matrix metalloproteinase inhibitor. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 10, n. 10, p. 785–791, 2002.

JELLINGER, P. S.; HANDELSMAN, Y.; ROSENBLIT, P. D.; BLOOMGARDEN, Z. T.; FONSECA, V. A.; GARBER, A. J.; GRUNBERGER, G.; GUERIN, C. K.; BELL, D. S. H.; MECHANICK, J. I.; PESSAH-POLLACK, R.; WYNE, K.; SMITH, D.; BRINTON, E. A.; FAZIO, S.; DAVIDSON, M.; ZANGENEH, F.; BUSH, M. A. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology guidelines for the management of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease. **Endocrine Practice**, v. 23, n. 4, p. 479-497, 2017.

JENSEN, L. K.; MIKKELSEN, S.; LOFT, I. P.; EENBERG, W.; BERGMANN, I.; LØGAGER, V. Radiographic knee osteoarthritis in floorlayers and carpenters. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v. 26, n. 3, p. 257-262, 2000.

JEONG, Claire G. et al. Application of complex in vitro models (CIVMs) in drug discovery for safety testing and disease modeling. **Microfluidic Cell Culture Systems**, [s.l.], p.121-158, 2019. Elsevier.

JIN, L. et al. Role of miR-146a in human chondrocyte apoptosis in response to mechanical pressure injury in vitro. **International Journal Of Molecular Medicine**, v. 34, n. 2, p.451-463, 2014.

JOHNSON, Craig I.; ARGYLE, David J.; CLEMENTS, Dylan N.. In vitro models for the study of osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, [s.l.], v. 209, p.40-49, mar. 2016. Elsevier BV.

JONATHAN, T. D.; DELFINO, S. F.; FEINBERG, C. E.; JOHNSON, M. F.; NAPPI, V. L.; OLINGER, J. T.; SCHWAB, A. P.; SWANSON, H. I. Current and Emerging Uses of Statins in Clinical Therapeutics: A Review. **Lipid Insights**, v. 9, p. 13–29, 2016.

JUNEJA, P.; HUBBARD, J.B. Anatomy, Joints. **Statpearls Publishing**. [s.i.], p. 1-7. 19 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507893/>>. Acesso em: 13 out. 2019.

JUNG, J. Knee osteoarthritis and menopausal hormone therapy in postmenopausal women: a nationwide cross-sectional study. **Menopause**, v. 26, n. 6, p. 598-602, 2019.

KADAM, U. T.; BLAGOJEVIC, M.; BELCHER, J. Statin Use and Clinical Osteoarthritis in the General Population: A Longitudinal Study. **Journal of General Internal Medicine**, v. 28, n. 7, p. 943-949, 2013.

KAMADA, S.; KIKKAWA, U.; TSUJIMOTO, Y.; HUNTER T. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s), **J Biol Chem**, vol 14; n. 280(2), p. 857-60, 2005.

KANEKO, S.; SATOH, T.; CHIBA, J. J. U. C.; INOUE, K.; KAGAWA, J. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. **Cytokines, cellular & molecular therapy**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2000.

KAVALIPATI N, JAY SHAH, ANANTHRAMAN RAMAKRISHAN, HARDIK VASNAWALA. Pleiotropic effects of statins. **Indian J Endocrinol Metab**, v. 19, n. 5, p. 554–562, 2015.

KHATTRI, S.; ZANDMAN-GODARD, G. Statins and autoimmunity. **Immunologic Research**, v. 145, n. 9, p. 399-403, 2015.

KIM, H. A.; BLANCO, F. J. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage. **Current Drug Targets**, v. 8, n. 2, p. 333-345, 2007.

KIRKHAM, B. W.; LASSERE, M. N.; EDMONDS, J. P.; JUHASZ, K. M.; BIRD, P. A.; LEE, C. S.; SHNIER, R.; PORTEK, I. J. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 4, p. 1122-1131, 2006.

KLARESKOG, L.; STOLT, P.; LUNDBERG, K.; KÄLLBERG, H.; BENGTSSON, C.; GRUNEWALD, J.; RÖNNELID, J.; HARRIS, H. E.; ULFGREN, A. K.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S.; EKLUND, A.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted

- immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 1, p. 38–46, 2006.
- KOBAYASHI, Yusuke et al. Drug repositioning of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents for ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p.72147-72156, 2017.
- KODAMAN, Pinar H.; DULEBA, Antoni J. Statins in the treatment of polycystic ovary syndrome. In: **Seminars in reproductive medicine**. © Thieme Medical Publishers, 2008. p. 127-138.
- KOHN, M. D.; SASSOON, A. A.; FERNANDO, N. D. Classifications in Brief Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 474, n. 8, p. 1886-1893, 2016.
- KRAUS, V. B.; McDANIEL, G.; HUEBNER, J. L.; STABLER, T. V.; PIEPER, C. F.; SHIPES, S. W.; PETRY, N. A.; LOW, P. S.; SHEN, J.; McNEARNEY, T. A.; MITCHELL, P. Direct in vivo evidence of activated macrophages in human osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 9, p. 1613-1621, 2016.
- KROON F, KORTEKAAS M, BOONEN A, *et al*
KROON, F.; KORTEKAAS, M.; BOONEN, A. et al Low-dose prednisolone in patients with hand osteoarthritis (hope): results from a randomised double-blind placebo-controlled trial. **Annals of the Rheumatic Diseases**, vol. 78, p.165-166, 2019.
- KUNWAR, A.; KUMAR, M.; SINGH, S. Pathological perspective of chondrocyte apoptosis in osteoarthritis. **Journal of Orthopedics, Traumatology and Rehabilitation**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2017.
- KUYINU, E. L.; NARAYANAN, G.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 63, n. 5, p. 1312-1321, 2016.
- 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**, v. 28, n. 8, p. 531-536, 2007.
- LEDFORD, H. Pharmaceutical industry anxiously struggles to retool as Lipitor patent expires. **Nature**, v. 480, 2011.
- LEE, Jungsun et al. Fully Dedifferentiated Chondrocytes Expanded in Specific Mesenchymal Stem Cell Growth Medium with FGF2 Obtains Mesenchymal Stem Cell Phenotype In Vitro but Retains Chondrocyte Phenotype In Vivo. **Cell Transplantation**, v. 26, n. 10, p.1673-1687, 2017.
- LEE, Y. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases. **BMB reports**, v. 46, n. 10, p. 479-483, 2013.
- LI, J.; DONG, S.. The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. **Stem Cells International**, [s.l.], v. 2016, p.1-12, 2016. Hindawi Limited.
- LI, P.; SCHWARZ, E. M. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 25, n. 1, p. 19-33, 2003.

LI, Q.; AMANO, K.; LINK, T. M.; MA, C. B. Advanced Imaging in Osteoarthritis. **Sports Health**, vol. 8, n. 5, p. 418-28, 2016.

LI, X et al. Morphological, Immunocytochemical, and Biochemical Studies of Rat Costal Chondrocytes Exposed to IL-1 β and TGF- β 1. **Journal Of Healthcare Engineering**, v. 2017, p.1-7, 2017.

LIEBERTHAL, J.; SAMBAMURTHY, N.; SCANZELLO, C. R. Inflammation in joint injury and post-traumatic osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 11, p. 1825-1834, 2015.

LINDAHL U, COUCHMAN J, KIMATA K, ET AL. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. 2017. IN: VARKI A, CUMMINGS RD, ESKO JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017. Chapter 17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453033/> doi: 10.1101/glycobiology.3e.017

LIOA, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 89-118, 2005.

LITWIC, A.; EDWARDS, M. H.; DENNISON, E. M.; COOPER, C. Epidemiology and Burden of Osteoarthritis. **British Medical Bulletin**, v. 105, p. 185–199, 2013.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 17023, p. 1-9, 2017.

LIU, XIAO-YAN et al. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. **Experimental and therapeutic medicine**, vol. 2,5, p.977-984, 2011.

LIVSHITS, G.; ZHAI, G.; HART, D. J.; KATO, B. S.; WANG, H.; WILLIAMS, F. M.; SPECTOR, T. D. Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis: The Chingford Study. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 7, p. 2037-2045, 2009.

LOESER, R. F.; COLLINS, J. A.; DIEKMAN, B. O.; Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 7, p. 412–420, 2016.

LOESER, R.F. The role of aging in the development of osteoarthritis. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 128, p. 44, 2017.

LORENZ, J. et al. Norepinephrine modulates osteoarthritic chondrocyte metabolism and inflammatory responses. **Osteoarthritis And Cartilage**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.325-334, fev. 2016. Elsevier BV.

LOTZ, Martin K. et al. Cartilage cell clusters. **Arthritis & Rheumatism**, [s.l.], v. 62, n. 8, p.2206-2218, 21 abr. 2010. Wiley.

LV S, LIU Y, ZOU Z, et al. The impact of statins therapy on disease activity and inflammatory factor in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 33, n. 1, p. 69–76, 2015.

MACHADO, M. A. A.; ACURCIO, F. A.; BRANDÃO, C. M. R; FALEIROS, D. R.; GUERRA, A. A. JR.; CHERCHIGLIA, M. L; ANDRADE, E. I. G. Judicialização do acesso a

medicamentos no Estado de Minas Gerais, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 3, p. 590-598, 2011.

MAHAJAN, Annil; PATNI, Ranu. Menopause and Osteoarthritis: Any Association ?. **Journal Of Mid-life Health**, vol. 9, n. 4, p.171-172, 2018. Medknow.

MAKRIS, E. A.; HADIDI, P.; ATHANASIOU, K. A. The knee meniscus: structure–function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. **Biomaterials**, v. 32, n. 30, p. 7411-7431, 2011.

MAN G.S.; MOLOGHIANU G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. **J Med Life**, 7(1):37–41, 2014.

MANSI, I. A.; MORTENSEN, E. M.; PUGH, M. J.; WEGNER, M.; FREI, C. R. Incidence of musculoskeletal and neoplastic diseases in patients on statin therapy: results of a retrospective cohort analysis. **The American Journal of the Medical Science**, v. 345, n. 5, p. 343-348, 2013.

MARANVILLE, J. C.; MICIC, D.; HANAUER, S. B.; RIENZO, A. D.; KUPFER, S. S. *In vitro* sensitivity assays and clinical response to glucocorticoids in patients with inflammatory bowel disease. **Journal Crohns Colitis**, v. 8, n. 11, p. 1539-1547, 2014.

MARIESWARAN, M. et al. A Review on Biomechanics of Anterior Cruciate Ligament and Materials for Reconstruction. **Applied Bionics And Biomechanics**, vol. 2018, p.1-14, 2018.

MASON RM, CHAMBERS MG, FLANNELLY J, GAFFEN JD, DUDHIA J, BAYLISS MT. The STR/ort mouse and its use as a model of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v.9, n 2, p.85–91, 2001

MATHIESSEN, A.; CONAGHAN, P. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. **Arthritis Research & Therapy**, v. 19, n. 18, p. 1-9, 2017.

McCAREY, D. W.; MCINNES, I. B.; MADHOK, R.; HAMPSON, R.; SCHERBAKOV, O.; FORD, I.; CAPELL, H. A.; SATTAR, N. Trial of atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind, randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 363, n. 9426, p. 2015-2021, 2004.

McCOY, A. M. Animal models of osteoarthritis: comparisons and key considerations. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 5, p. 803-818, 2015.

McFARLAND, A. J.; DAVEY, A. K.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S. Statins Reduce Lipopolysaccharide-Induced Cytokine and Inflammatory Mediator Release in an In Vitro Model of Microglial-Like Cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, n. , p. 1-10, 2017.

McGONAGLE, D.; TAN, A. L.; CAREY, J.; BENJAMIN, M. The anatomical basis for a novel classification of osteoarthritis and allied disorders. **Journal of anatomy**, v. 216, n. 3, p. 279-291, 2010.

McILLWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 4, p. a008656, 2013.

McINNES, I. B.; KIM, H. Y.; LEE, S. H.; MANDEL, D.; SONG, Y. W.; CONNELL, C. A.; LUO, Z.; BROSANAN, M. J.; ZUCKERMAN, A.; ZWILLICH, S. H.; BRADLEY, J. D. Open-label tofacitinib and double-blind atorvastatin in rheumatoid arthritis patients: a randomised study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 1, p. 124-131, 2014.

- MENDES, F. A. Osteoosteoartrite: o preço de vivermos mais? Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia e Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra. Disponível em: http://www.plural.pt/portals/farbeira/documentos/artigooa_afmendes.pdf >. Acesso em 08 de out. de 2017.
- MOBASHERI, A.; BATT, M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 59, n. 5, p. 333-339, 2016.
- MONFORT J, ABARCA B, CARNÉ X, et al. 0813 an expert consensus on the appropriate use of oral sysadoas for the treatment of the osteoarthritic patient in primary health care: a delphi study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v 78, p.1878, 2019.
- MONTOYA, F.; MARTÍNEZ, F.; GARCÍA-ROBLES, M.; BALMACEDA-AGUILERA, C.; KOCH, X.; RODRÍGUEZ, F.; SILVA-ÁLVAREZ, C.; SALAZAR, K.; ULLOA, V.; NUALART, F. Clinical and experimental approaches to knee cartilage lesion repair and mesenchymal stem cell chondrocyte differentiation. **Biological Research**, v. 46, n. 4, p. 441-451, 2013.
- MOWLA, K.; RAJAI, E.; GHORBANI, A.; DARGAHI-MALAMIR, M.; BAHADORAM, M.; MOHAMMADI, S. Effect of Atorvastatin on the Disease Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis: Double-Blind Randomized Controlled Trial. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 5, p. 32-36, 2016.
- MUSUMECI, G.; GIOVANNI, P. C.; TROVATO, F. M.; WEINBERG, A. M.; AL-ASIYAH, M. K.; ALQAHTANI, M. H.; MOBASHERI, A. Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20560-20575, 2015.
- NAJM, Aurélie et al. Knee joint synovitis: study of correlations and diagnostic performances of ultrasonography compared with histopathology. **Rmd Open**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-16, fev. 2018. BMJ.
- NAKAGOMI, A.; SEINO, Y.; KOHASHI, K.; KOSUGI, M.; ENDOH, Y.; KUSAMA, Y.; ATARASHI, H.; MIZUNO, K. Effects of statin therapy on the production of monocyte pro-inflammatory cytokines, cardiac function, and long-term prognosis in chronic heart failure patients with dyslipidemia. **Circ J**, vol 76, n. 9, p. 2130-8, 2012.
- OAC Histopathology Supplement. In: AIGNER, T.; LOHMANDER, S. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 18, S. 3, p. S1-S122, 2010.
- OBERMANN, Mark; HOLLE, Dagny. Faculty of 1000 evaluation for Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.. **F1000 - Post-publication Peer Review Of The Biomedical Literature**, [s.l.], p.2163-2196, 17 nov. 2016. F1000 (Faculty of 1000 Ltd).
- OHSHIMA, S.; SAEKI, Y.; MIMA, T.; SASAI, M.; NISHIOKA, K.; NOMURA, S.; KOPF, M.; KATADA, Y.; TANAKA, T.; SUEMURA, M.; KISHIMOTO, T. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 8222-8226, 1998.

OKA, H.; ISHII, H.; IWATA, A.; KUSHIMA, H.; TOBA, S.; HASHINAGA, K.; UMEKI, K.; TOKIMATSU, I.; HIRAMATSU, K.; KADOTA, J. Inhibitory effects of pitavastatin on fibrogenic mediator production by human lung fibroblasts. **Life Sciences**, v. 93, n. 25-26, p. 968-974, 2013.

OO, Win Min et al. Disease-modifying drugs in osteoarthritis: current understanding and future therapeutics. **Expert Opinion On Emerging Drugs**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.331-347, 2 out. 2018. Informa UK Limited.

ORELLANA, C.; SAEVARSDOTTIR, S.; KLARESKOG, L.; KARLSON, E. W.; ALFREDSSON, L.; BENGTSSON, C. Postmenopausal hormone therapy and the risk of rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA population-based case-control study. **European Journal of Epidemiology**, v. 30, n. 5, p. 449–457, 2015.

ORTEGO, M.; BUSTOS, C.; HERNÁNDEZ-PRESA, M. A.; TUÑÓN, J.; DÍAZ, C.; HERNÁNDEZ, G.; EGIDO, J. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. **Atherosclerosis**, v. 147, n. 2, p. 253-261, 1999.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. , p. 71-109, 2011.

ÖZCAN, Mustafa Soner et al. O efeito de levobupivacaína intra-articular na cartilagem do ombro em doses diferentes—estudo experimental. **Brazilian Journal Of Anesthesiology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p.42-49, jan. 2017. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjan.2016.09.008>.

PACCA, D. M.; DE-CAMPOS, G. C.; ZORZI, A. R.; CHAIM, E. A.; DE-MIRANDA, J. B. Prevalence of joint pain and osteoarthritis in obese Brazilian population. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 31, n. 1, p. e1344, 2018.

PALMER, J.S. et al. Surgical interventions for symptomatic mild to moderate knee osteoarthritis. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, [s.l.], 19 jul. 2019. Wiley.

PARK, J. et al. Relationship between hormone replacement therapy and spinal osteoarthritis: a nationwide health survey analysis of the elderly Korean population. **Bmj Open**, vol. 7, n. 11, p.018-063, nov. 2017. BMJ.

PATEL, T. R.; CORBETT, S. A. Simvastatin supresses LPS-induced Akt phosphorylation in the human monocyte cell line THP-1. **The Journal of Surgical Research**, v. 116, n. 1, p. 116-120, 2004.

PATHAK, N.N.; BALAGANUR, V.; LINGARAJU, M.C.; KANT, V.; KUMAR, D.; KUMAR, D.; SHARMA, A.K.; TANDAN, S.K. Effect of atorvastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain: implication for osteoarthritis therapy. **Pharmacol Rep**, vol. 67, n. 3, p. 513-9, 2015.

PAULI, C. et al. Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. **Osteoarthritis And Cartilage**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.476-485, jun. 2012. Elsevier BV.

- PELLETIER, J.; BOILEAU, C.; ALTMAN, R. D.; MARTEL-PELLETIER, J. Experimental models of osteoarthritis: usefulness in the development of disease-modifying osteoarthritis drugs/agents. **Therapy**, v. 7, n. 6, p. 621-634, 2010.
- PELLETIER, J. P.; RAYNAULD, J. P.; CARON, J.; MINEAU, F.; ABRAM, F.; DORAIS, M.; HAROAU, B.; CHOQUETTE, B.; MARTEL-PELLETIER, J. Decrease in serum level of matrix metalloproteinases is predictive of the disease-modifying effect of osteoarthritis drugs assessed by quantitative MRI in patients with knee osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 12, p. 2095-2101, 2010.
- PENG-FEI, H.; CHENG-LONG, C.; ZHI, T.; PENG-CUI, L.; LEI, W.; ZHI, L.; XIOA-CHUN, W. How to establish an expected animal model of post-traumatic osteoarthritis? **Chinese Nursing Research**, v. 4, n. 2, p. 57-63, 2017.
- PITCHER, T.; SOUSA-VALENTE, J.; MALCANGIO, M. The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse. **Journal of Visualized Experiments**, v. 16, n. 111, p. e53746, 2016.
- PORÉE, B.; KYPRIOTOU, M.; CHADJICHRISTOS, C.; BEAUCHEF, G.; RENARD, E.; LEGENDRE, F.; MELIN, M.; GUERET, S.; HARTMANN, D. J.; MALLÉIN-GERIN, F.; PUJOL, J. P.; BOUMEDIENE, K.; GALÉRA, P. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 8, p. 4850-4865, 2008.
- PORRECA, E.; SERGI, R.; BACCANTE, G.; REALE, M.; ORSINI, L.; FEBBO, C. D.; CASELLI, G.; CUCCURULLO, F.; BERTINI, R. Peripheral blood mononuclear cell production of interleukin-8 and IL-8-dependent neutrophil function in hypercholesterolemic patients. **Atherosclerosis**, v. 146, n. 2, p. 345-350, 1999.
- PRETORIUS, E.; AKEREDOLU, O-F.; SOMA, P.; KELL, D. B. Major involvement of bacterial components in rheumatoid arthritis and its accompanying oxidative stress, systemic inflammation and hypercoagulability. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 4, p. 355-373, 2017.
- PROKHOROVA, E.A.; KOPEINA, G.S.; LAVRIK, I.N. *et al.* Apoptosis regulation by subcellular relocation of caspases. **Sci Rep**, 8:12199, 2018.
- PUNZI, L.; GALOZZI, P.; LUISETTO, R.; FAVERO, M.; RAMONDA, R.; OLIVIERO, F.; SCANU, A. Post-traumatic arthritis: overview on pathogenic mechanisms and role of inflammation. **RMD Open**, v. 2, n. 2, p. e000279, 2016.
- RACHEL, E. M.; RICHARD, J. M.; ANNE-MARIE, MALFAIT. Osteoarthritis joint pain: the cytokine connection. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 185-193, 2014.
- RAMKUMAR, S.; RAGHUNATH, A.; RAGHUNATH, S. Statin Therapy: Review of Safety and Potential Side Effects. **Acta Cardiologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 631-639, 2016.
- RAMUZ, O.; ISNARDON, D.; DEVILARD, E. *et al.* Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy. **Int J Exp Pathol**, vol 84, n. 2, p.75-81, 2003.
- REZAIIE-MAJD, A.; MACA, T.; BUCEK, R. A.; VALENT, P.; MÜLLER, M. R.; HUSSLEIN, P.; KASHANIPOUR, A.; MINAR, E.; BAGHESTANIAN, M. Simvastatin

Reduces Expression of Cytokines Interleukin-6, Interleukin-8, and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Circulating Monocytes From Hypercholesterolemic Patients. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 22, n. 7, p. 1194-1199, 2002.

REZENDE, M. U.; CAMPOS, G. C.; PAILO, A. F. Current Concepts in Osteoarthritis. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 120-122, 2013.

ROACH, H. I.; AIGNER, T.; KOURI, J. B. Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? **Apoptosis**, v. 9, n. 3, p. 265–277, 2004.

ROOS, E. M.; ARDEN, N. K. Strategies for the prevention of knee osteoarthritis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 12, n. 2, p. 92-101, 2016.

ROUGHLEY, Peter J; MORT, John S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. **Journal Of Experimental Orthopaedics**, [s.l.], v. 1, n. 1, 16 jul. 2014. Springer Nature.

ROUSSET, F.; HAZANE-PUCH, F.; PINOSA, C.; NGUYEN, MV.; GRANGE, L.; SOLDINI, A.; RUBENS-DUVAL, B.; DUPUY, C.; MOREL, F.; LARDY, B. IL-1beta mediates MMP secretion and IL-1beta neosynthesis via upregulation of p22(phox) and NOX4 activity in human articular chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 11, p. 1972-1980, 2015.

RUTJES, A.W.; JÜNI, P.; DA COSTA, B.R.; TRELLE, S.; NÜESCH, E.; REICHENBACH, S. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee. **Annals Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 157, n. 3, p.180-191, 7 ago. 2012. American College of Physicians

SALZMANN, G. M.; PREISS, S.; ZENOBI-WONG, M.; HARDER, L. P.; MAIER, D.; DVORÁK, J. Osteoarthritis in Football. With a Special Focus on Knee Joint Degeneration. **Cartilage**, v. 8, n. 2, p. 162-172, 2016.

SANDELL, L. J. Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 8, n. 2, p. 77-89, 2012.

SCANZELLO, Carla R.; GOLDRING, Steven R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 249-257, 2012.

SCHACHTER M: Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundam Clin Pharmacol**, vol 19, n. 1, p. 117-25, 2005.

SCHACHTER, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 19, n. 1, p. 117-125, 2005.

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. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594-597, 2004. SHARMA, L.; CHMIEL, J. S.; ALMAGOR, O.; FELSON, D.; GUERMAZI, A.; ROEMER, F.; LEWIS, C. E.; SEGAL, N.; TORNER, J.; COOKE, T. D.; HIETPAS, J.; LYNCH, J.; NEVITT, M. The role of varus and valgus alignment in the initial development of knee cartilage damage by MRI: the MOST study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 2, p. 235-240, 2013.

- SHARMA, L.; SONG, J.; DUNLOP, D.; FELSON, D.; LEWIS, C. E.; SEGAL, N.; TORNER, J.; COOKE, T. D.; HIETPAS, J.; LYNCH, J.; NEVITT, M. Varus and valgus alignment and incident and progressive knee osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 11, p. 1940-1945, 2010.
- SOFAT, N.; EJINDU, V.; KIELY, P. What makes osteoarthritis painful? The evidence for local and central pain processing. **Rheumatology**, v. 50, n. 12, p. 2157-2165, 2011.
- SPEICHERT, S et al. Role of Norepinephrine in IL-1 β -Induced Chondrocyte Dedifferentiation under Physioxia. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p.1212-1213, 2019.
- SRIKANTH VK, FRYER JL, ZHAI G, WINZENBERG TM, HOSMER D, JONES G. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, vol. 13, n. 9, p. 769–81, 2005.
- SRIKANTH, Velandai K. et al. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 13, n. 9, p. 769-781, 2005.
- STANNUS, O.; JONES, G.; CICUTTINI, F.; PARAMESWARAN, V.; QUINN, S.; BURGESS, J.; DING, C. Circulating levels of IL-6 and TNF-alpha are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n. 11, p. 1441-1447, 2010.
- SYLVESTER PW. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Methods Mol Biol**, v 716, p.157–168, 2011.
- TAKAHASHI, A.; DE ANDRÉS, M. C.; HASHIMOTO, K.; ITOI, E.; OREFFO, R. O. C. Epigenetic regulation of interleukin-8, an inflammatory chemokine, in osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 23, n. 11, p. 1946-1954, 2015.
- TAMER, T. M. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 6, n. 3, p. 111-125, 2013.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 6, n. 10, p. a016295, 2014.
- TANG, Q.; ZHENG, G.; FENG, Z. et al. Wogonoside inhibits IL-1 β induced catabolism and hypertrophy in mouse chondrocyte and ameliorates murine osteoarthritis. **Oncotarget**, vol. 8, n. 37, p. 61440–61456, 2017.
- TEEPLE, E.; JAY, G. D.; ELSAID, K. A.; FLEMING, B. C. Animal Models of Osteoarthritis: Challenges of Model Selection and Analysis. **The AAPS Journal**, v. 15, n. 2, p. 438-446, 2013.
- TEICHTAHL, A. J.; WLUKA, A. E.; TANAMAS, S. K.; WANG, Y.; STRAUSS, B. J.; PROIETTO, J.; DIXON, J. B.; JONES, G.; FORBES, A.; CICUTTINI, F. M. Weight change and change in tibial cartilage volume and symptoms in obese adults. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 6, p. 1024-1029, 2015.
- TEICHTAHL, A. J.; WLUKA, A. E.; WANG, Y.; STRAUSS, B. J.; PROIETTO, J.; DIXON, J. B.; JONES, G.; FORBES, A.; KOULOYAN-ILIC, S.; MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P.; CICUTTINI, F. M. The longitudinal relationship between changes in

body weight and changes in medial tibial cartilage, and pain among community-based adults with and without meniscal tears. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 9, p. 1652-1658, 2014.

TERABE, K.; TAKAHASHI, N.; COBB, M.; ASKEW, E.B.; KNUDSON C.B.; KNUDSON, W. Simvastatin promotes restoration of chondrocyte morphology and phenotype. **Arch Biochem Biophys**, vol. 15, n. 665, p. 1-11, 2019.

TSUZAKI, M.; GUYTON, G.; GARRETT, W.; ARCHAMBAULT, J. M.; HERZOG, W.; ALMEKINDERS, L.; BYNUM, D.; YANG, X.; BANES, A. J. IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 21, n. 2, p. 256-264, 2003.

TU, C. et al. An extensive review regarding the adipokines in the pathogenesis and progression of osteoarthritis. **Cytokine**, v. 113, p. 1-12, 2019.

USUI, M.; SUDA, R.; MIYAZA, Y.; KOBAYASHI, W.; YOSHIMASA OKAMATSU, Y.; TAKIGUCHI, H.; SUZUKI, M.; AMAMOTO, M. Statin decreases IL-1 and LPS-induced inflammatory cytokines production in oral epithelial cells. **New Frontiers in Lifestyle-Related Diseases**, p. 125-131, 2008.

UTOMO, L.; VAN OSCH, G. J.; VERHAAR, J. A.; BASTIAANSEN-JENNISKENS, Y. M. Macrophage phenotype modulation to control synovial inflammation. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 2, p. A266, 2015.

UZZAN, B et al. Effects of statins on bone mineral density: A meta-analysis of clinical studies. **Bone**, v. 40, n. 6, p.1581-1587, 2007.

VALDES, A. M.; ZHANG, W.; MUIR, K.; MACIEWICZ, R. A.; DOHERTY, S.; DOHERTY, M. Use of statins is associated with a lower prevalence of generalised osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 73, n. 5, p. 943-945, 2014.

VALDES, A. M.; EVANGELOU, E.; KERKHOF, H. J.; TAMM, A.; DOHERTY, S. A.; KISAND, K.; TAMM, A.; KERNA, I.; UITTERLINDEN, A.; HOFMAN, A.; RIVADENEIRA, F.; COOPER, C.; DENNISON, E. M.; ZHANG, W.; MUIR, K. R.; IOANNIDIS, J. P.; WHEELER, M.; MACIEWICZ, R. A.; VAN MEURS, J. B.; ARDEN, N. K.; SPECTOR, T. D.; DOHERTY, M. The GDF5 rs143383 polymorphism is associated with osteoarthritis of the knee with genome-wide statistical significance. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 5, p. 873-875, 2011.

VALDES, A. M.; LOUGHLIN, J.; OENE, M. V.; CHAPMAN, K.; SURDULESCU, G. L.; DOHERTY, M.; SPECTOR, T. D. Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 1, p. 137-146, 2007.

VAN SPIL, et al. Osteoarthritis phenotypes and novel therapeutic targets. **Biochemical Pharmacology**, v. 165, p.41-48, 2019..

VARK, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. 2. ed. [s.i.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1900/>>. Acesso em: 13 out. 2019.

VASANTHI, P.; NALINI, G.; RAJASEKHAR, G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. **APLAR Journal of Rheumatology**, v. 10, n. 4, p. 270-274, 2007.

VASILIADIS, Haris S; TSIKOPOULOS, Konstantinos. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. **World Journal Of Orthopedics**, v. 8, n. 1, p.1-11, 2017.

VIATOUR, P et al. NF- κ B2/p100 induces Bcl-2 expression. **Leukemia**, v. 17, n. 7, p.1349-1356, 2003.

VISSER, A. W.; IOAN-FACSINAY, A.; DE MUTSERT, R.; WIDYA, R. L.; LOEF, M.; DE ROOS, A.; LE CESSIE, S.; DEN HEIJER, M.; ROSENDAAL, F. R.; KLOPPENBURG, M. Adiposity and hand osteoarthritis: the Netherlands Epidemiology of Obesity study. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 1, p. R19, 2014.

VOS T, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, vol. 380, p. 2163–2196, 2012.

WANG B.W., JIANG Y., YAO Z.L., CHEN P.S., YU B., WANG S.N. Aucubin Protects Chondrocytes against IL-1 β -Induced Apoptosis In Vitro And Inhibits Osteoarthritis In Mice Model. **Drug Des Devel Ther**, 9; 13:3529-3538, 2019.

WANG, Y.; WEI, L.; ZENG, L.; HE, D.; WEI, X. Nutrition and degeneration of articular cartilage. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 21, n. 8, p. 1751–1762, 2013.

WEN-YI, T.; YI-SHU, H.; HSI-HSIEN, L.; SHUE-FEN, L.; FIONA, MCC.; KAY, MCN.; FELIX, C.; RICHARD, W. TNFR signalling and its clinical implications. **Cytokine**, v. 101, p. 19-25, 2018.

WESTACOTT, C. I.; BARAKAT, A. F.; WOOD, L.; PERRY, M. J.; NEISON, P.; BISBINAS, I.; ARMSTRONG, L.; MILLAR, A. B.; ELSON, C. J. Tumor necrosis factor alpha can contribute to focal loss of cartilage in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 8, n. 3, p. 213-221, 2000.

WIBAUT-BERLAIMONT, V.; RANDI, A. M.; MANDRYKO, V.; LUNNON, M. W.; HASKARD, D. O.; NOAUMOVA, R. P. Atorvastatin affects leukocyte gene expression in dyslipidemia patients: in vivo regulation of hemostasis, inflammation and apoptosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 4, p. 677-685, 2005.

WISE, B.I. et al. The association of parity with osteoarthritis and knee replacement in the Multicenter Osteoarthritis Study. **Osteoarthritis And Cartilage**, v. 21, n. 12, p.1849-1854, 2013.

WOOD, W. G.; IGBAVBOA, U.; MULLER, W. E.; ECKERT, G. P. Statins, Bcl-2, and apoptosis: cell death or cell protection? **Molecular Neurobiology**, v. 48, n. 2, p. 308-314, 2013.

WOOLF, A. D. How to assess musculoskeletal conditions. History and physical examination. **Best Practice & Research. Clinical Rheumatology**, v. 17, n. 3, p. 381-402, 2003.

- WRIGHT, J. L. et al. Statin Reverses Smoke-induced Pulmonary Hypertension and Prevents Emphysema but Not Airway Remodeling. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v. 183, n. 1, p.50-58, jan. 2011. American Thoracic Society.
- XAVIER, H. T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J. R.; ASSAD, M. H.; ROCHA, V. Z.; SPOSITO, A. C.; FONSECA, F. A.; DOS SANTOS, J. E.; SANTOS, R. D.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A. A.; MARTINEZ, T. L. R.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, A.; FORTI, N. A.; MORIGUCHI, E.; CHAGAS, A. C. P.; COELHO, O. R.; RAMIRES, J. A. F. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 1-22, 2013.
- XUE, H.; TU, Y.; MA, T.; LIU, X.; WEN, T.; CAI, M.; XIA, Z.; MEI, J. Lactoferrin Inhibits IL-1 β -Induced Chondrocyte Apoptosis Through AKT1- Induced CREB1 Activation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 2456-2465, 2015.
- YANG, X. K.; LIU, J.; LIU, J.; LIANG, Y.; XU, W. D.; LENG, R. X.; PAN, H. F.; YE, D. Q. Associations Between PADI4 Gene Polymorphisms and Rheumatoid Arthritis: An Updated Meta-analysis. **Archives of Medical Research**, v. 46, n. 4, p. 317-325, 2015.
- YAP, F. Y.; SKALSKI, M. R.; PATEL, D. B.; SCHEIN, A. J.; WHITE, E. A.; TOMASIAN, A.; MASIH, S.; MATCUK, G. R. JR. Hypertrophic Osteoarthropathy: Clinical and Imaging Features. **Radiographics**, v. 37, n. 1, p. 157-195, 2017.
- YEH, T. T.; WEN, Z. H.; LEE, H. S.; LEE, C. H.; YANG, Z.; JEAN, Y. H.; WU, S. S.; NIMNI, M. E.; HAN, B. Intra-articular injection of collagenase induced experimental osteoarthritis of the lumbar facet joint in rats. **European Spine Journal**, v. 17, n. 5, p. 734-742, 2008.
- YOSHIHARA, Y.; NAKAMURA, H.; OBATA, K.; YAMADA, H.; HAYAKAWA, T.; FUJIKAWA, K.; OKADA, Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 59, n. 6, p. 455-461, 2000.
- YUCESOY, B.; CHARLES, L. E.; BAKER, B.; BURCHFIEL, C. M. Occupational and genetic risk factors for osteoarthritis: A review. **Work**, v. 50, n. 2, p. 261-273, 2015.
- YUDOH, K.; KARASAWA, R. Statin prevents chondrocyte aging and degeneration of articular cartilage in osteoarthritis (OA). **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 12, p. 990-998, 2010.
- ZAMLI, Z.; SHARIF, M. Chondrocyte apoptosis: A cause or consequence of osteoarthritis? **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 14, n. 2, p. 159-166, 2011.
- ZENG, G. Q.; CHEN, A. B.; LI, W.; SONG, J. H.; GOA, C. Y. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 14811-14822, 2015.
- ZHANG, W.; DOHERTY, M.; PEAT, G.; BIERMA-ZEINSTRAS, S. M. A.; ARDEN, N. K.; BRESNIHAN, B.; HERRERO-BEAUMONT, G.; KIRSCHNER, S.; LEEB, B. F.; LOHMANDER, L. S.; MAZIÈRES, B.; PAVELKA, K.; PUNZI, L.; SO, A. K.; TUNCER, T. **EULAR evidence based recommendations for the diagnosis of knee osteoarthritis**. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 3, p. 483-489, 2010.

ZHANG, W. *et al.* . EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, n. 5, p. 669-681, 2005.

ZHANG, W.; MOSKOWITZ, R. W.; NUKI, G.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R. D.; ARDEN, N.; BIERMA-ZEINSTRAS, S.; BRANDT, K. D.; CROFT, P.; DOHERTY, M.; DOUGADOS, M.; HOCHBERG, M.; HUNTER, D. J.; KWOH, K.; LOHMANDER, L. S.; TUGWELL, P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, part I: critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 9, p. 981-1000, 2007.

ZHANG, W.; MOSKOWITZ, R. W.; NUKI, G.; ABRAMSON, S.; ALTMAN, R. D.; ARDEN, N.; BIERMA-ZEINSTRAS, S.; BRANDT, K. D.; CROFT, P.; DOHERTY, M.; DOUGADOS, M.; HOCHBERG, M.; HUNTER, D. J.; KWOH, K.; LOHMANDER, L. S.; TUGWELL, P. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 2, p. 137-162, 2008.

ZHANG, Z. Chondrons and the Pericellular Matrix of Chondrocytes. **Tissue Engineering: Part B**, v. 21, n. 3, p. 267-277, 2015.

ZHANG, Z.; LEONG, D. J.; XU, L.; HE, Z.; WANG, A.; NAVATI, M.; KIM, S. J.; HIRSH, D. M.; HARDIN, J. A.; COBELLI, N. J.; FRIEDMAN, J. M.; SUN, H. B. Curcumin slows osteoarthritis progression and relieves osteoarthritis-associated pain symptoms in a post-traumatic osteoarthritis mouse model. **Arthritis Research & Therapy**, v. 18, n. 128, p. 1-12, 2016.

ZHOU, B.; CHEN, D.; XU, H.; ZHANG, X. Proliferation of rabbit chondrocyte and inhibition of IL-1 β -induced apoptosis through MEK/ERK signaling by statins. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 53, n. 2, p. 124-131, 2017.

ZHOU, P. H.; LIU, S. Q.; PENG, H. The effect of hyaluronic acid on IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis in a rat model of osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 12, p. 1643-1648, 2008.

APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE EESCLARECIDO PARA CIDADÃOS ALFABETIZADOS

« Avaliação in vitro e in vivo dos mecanismos imunomodulatórios da curcumina e de novos derivados tiazolidínicos em pacientes portadores de Osteoartrite»

Nós o convidamos a participar de uma pesquisa que visa estudar o que acontece no corpo fazendo com que a Osteoartrite se desenvolva. Como pesquisadores responsáveis deste estudo, nosso objetivo é descobrir o que está desregulado no seu corpo, levando OA desenvolvimento da doença. Também pretendemos testar novos possíveis candidatos a fármacos que possam, no futuro, ser alternativas terapêuticas para o tratamento da sua doença. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células presentes no seu sangue ou quando houver indicação, células da sua articulação. Deste modo, nenhum medicamento será administrado em você durante toda a pesquisa.

É importante ressaltar que:

1. Sua participação é inteiramente **voluntária**;
2. Você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser;
3. Nós solicitaremos novamente sua aprovação (verbal) no momento de cada coleta;
4. Suas informações nunca serão divulgadas, ou seja, permanecerão confidenciais;
5. Faremos um banco de dados e caso a pesquisa traga bons resultados, você será um dos primeiros beneficiados.

A Osteoartrite (OA) é popularmente conhecida como osteoartrite e é uma desordem degenerativa das articulações. O número de pessoas com osteoartrite está em ascensão devido OA 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 novas abordagens terapêuticas para o tratamento da osteoartrite é uma demanda urgente e necessária.

Portanto, nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é **um voluntário portador desta doença**. Este estudo inclui a participação de 60 indivíduos.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células do seu sangue. Esta amostra será coletada por profissional capacitado flebotomista, não havendo necessidade de nenhum procedimento adicional. 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. A remoção da cartilagem para inserção de prótese é uma abordagem já utilizada na rotina clínica e, portanto, os riscos desse procedimento não são de responsabilidade deste projeto. Com relação OAs benefícios, você será submetido a uma avaliação clínica e, caso seja detectada alguma alteração, será encaminhado para um acompanhamento adequado.

Os dados coletados pelo estudo ficarão armazenados em pastas de arquivos no Laboratório de Imunomodulação e Novas abordagens Terapêuticas-LINAT sob a responsabilidade da doutoranda Priscilla Stela Santana de Oliveira. Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contatar:

Profa. Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, Médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: aduarte@terra.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 3454.0155.

Profa. Dra. Maira Galdino Da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Pesquisadora Priscilla Stela Santana de Oliveira, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE. E-mail: priusan@gmail.com. Telefone/Fax 55 (81) 2126-8346

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CCS, o **Professor Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto**, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, situado na Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588.

Você ficará com uma cópia deste documento.

Nome do responsável pela coleta de sangue: _____

Nome do responsável pela coleta da cartilagem: _____

Se você aceitar participar deste estudo, por favor, preencha o formulário abaixo.

Nome: _____

RG: _____ **Data:** _____

Endereço: _____

Assinatura: _____

Testemunha 1: _____

RG: _____ **Data:** _____

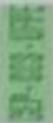
Testemunha 2: _____

RG: _____ **Data:** _____

Pesquisador Responsável: _____ **Data:** _____

Assinatura: _____

ANEXO A – Aprovação comitê de ética humano

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos  UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE- 

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

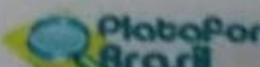
CAAE: 58263116.5.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.777.025

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos  UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE- 

Continuação do Parecer: 1.777.025

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RECIFE, 17 de Outubro de 2016

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

ANEXO B – Aprovação comitê de ética Animal (CEUA)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: (55 81) 2126 8640 / 2126 8351
 Fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccbi.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. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 CDAPE 2345341

ANEXO C – Sistema de graduação histológica e histoquímica modificado de mankin
(OZCAN *et al.*,2017)

1. Estrutura	Normal	0
	Irregularidades da superfície	1
	Irregularidades da superfície e do pannus	2
	Fissura na zona de transição	3
	Fissura na zona radial	4
	Fissura na zona calcificada	5
	Desorganização completa	6
2. Células	Normal	0
	Hiper celularidade difusa	1
	Clonagem	2
	Hipocelularidade	3
3. Coloração Safranina-O	Normal	0
	Redução leve	1
	Redução moderada	2
	Redução grave	3
	Sem corante observado	4
4. Integridade da linha de maré	Intacta	0
	Atravessada por vasos sanguíneos	1