



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vitor Alfredo de Santana Silva

**EFEITO TERAPÊUTICO DE DIFERENTES CONDROITINS SULFATO EM
MODELO ANIMAL DE OSTEOARTRITE**

Recife
2022

Vitor Alfredo de Santana Silva

Efeito Terapêutico de Diferentes Condroitins Sulfato em Modelo Animal de Osteoartrite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria das Graças Carneiro da Cunha
Coorientador: Prof^o. Dr. Paulo Antônio Galindo Soares

Recife
2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Victor Alfredo de Santana

Efeito terapêutico de diferentes condroitins de sulfato em modelo animal em modelo animal de osteoartrite / Victor Alfredo de Santana Silva. - 2022.

138 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha.

Coorientador: Profa. Dra. Paulo Antônio Galindo Soares

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Osteoartrite. 2. Musculoesqueléticos. 3. Terapêutica. I. Cunha, Maria das Graças Carneiro (orientadora). II. Soares, Paulo Antônio (coorientador). III. Título.

616.72

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-085

Vitor Alfredo de Santana Silva

Efeito Terapêutico de Diferentes Condroitins Sulfato em Modelo Animal de Osteoartrite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 23/02/2022

Prof^ª. Dr^ª. Maria das Graças Carneiro da Cunha (Suplente interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Banca Examinadora

Prof^º. Dr. Paulo Antônio Galindo Soares (Co-orientador/Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr. Rafael Matos Ximenes (Avaliador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^ª. Kátia Alves Ribeiro (Avaliador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho à toda minha família, sobretudo minha mãe que sempre me deu força e coragem para enfrentar momentos difíceis. Agradeço também à todas as pessoas que fizeram parte desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sabedoria e discernimento em todos os momentos vividos; À minha família pelo apoio e paciência durante a caminhada; À Dr. Kátia por toda assistência no desenvolvimento dessa pesquisa; Aos meus orientadores, Prof^a. Dr^a. Maria das Graças e Prof^o. Dr. Paulo Soares por ter acreditado em mim, pela inteligente lapidação que realizou no meu projeto e pelos ensinamentos que eu pude adquirir com a convivência; Ao Prof^o. Dr. Rafael, pela gentileza em permitir que eu fizesse o uso do seu laboratório de pesquisa e pelas suas diversas contribuições em minha pesquisa; A todos os demais professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas que contribuíram para minha formação; Aos amigos do laboratório de biotecnologia pela parceria e colaboração; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Meus sinceros agradecimentos.

“Na ciência, o crédito vai para o homem que convence o mundo de uma ideia, não para aquele que a teve primeiro”.

William Osler

RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma doença sem tratamento claro e eficaz que afeta mais de 237 milhões de pessoas no mundo. Devido a ineficácia dos tratamentos atuais, novas alternativas terapêuticas mais eficazes e com menos efeitos colaterais têm sido necessários. O sulfato de condroitina (CS) é um polissacarídeo sulfatado (PS) bastante recomendado para o tratamento de pacientes com OA de joelho, apesar de sua eficácia terapêutica ainda não estar bem estabelecida. O fucosil condroitina sulfato (FCS) é um PS extraído de organismos marinhos e que possui uma estrutura análoga ao CS de mamíferos, e que por apresentarem excelentes propriedades anti-inflamatórias, é um candidato promissor para o tratamento da OA. Devido ao potencial terapêutico desses PSs, este trabalho visou avaliar o efeito terapêutico do CS de traqueia bovina (CS-A), da cartilagem de tubarão (CS-C) e do FCS da parede corporal do pepino-do-mar *Holothuria grisea* em modelo *in vivo* de OA induzido por iodoacetato monossódico na articulação femoropatelar de camundongos C57BL/6. Após indução da OA, os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos (n = 5) de acordo com o tratamento oral diário durante 28 dias: (1) Sham (falso operado, salina 0,9 % v.o.); (2) controle negativo (doente, salina 0,9% v.o); (3) CS-A (doente, 100mg/kg v.o); (4) CS-C (doente, 100mg/kg v.o) e (5) FCS (doente, 100mg/kg v.o). A eficácia dos tratamentos foi avaliada através da mensuração da alodinia (50% do limiar de nocicepção), atividade motora, migração de leucócitos, atividade anti-inflamatória (dosagem de IL-10), análise morfométrica e escore histopatológico OARSI. Durante 28 dias de experimentação, o CS-A (100 mg/kg), CS-C (100 mg/kg) e FCS (100 mg/kg) conseguiram induzir analgesia, aumentar a atividade motora e reduzir a migração de leucócitos de camundongos osteoartíticos de forma significativa em relação ao controle negativo (salina 0,9 %). Além disso, a morfometria revelou um aumento significativo da cartilagem sobre a tíbia para os animais tratado com CS-A e FCS, cujos resultados foram confirmados pela análise histopatológica OARSI, mostrando uma redução da gravidade da OA em relação ao controle negativo. Contudo, apenas CS-A (100 mg/kg) aumentou significativamente os níveis de IL-10, sugerindo que esta molécula possui uma atividade protetora contra a degeneração da cartilagem através da regulação da inflamação. Apesar de preliminares, os mecanismos envolvidos no tratamento com FCS precisam ser melhores investigados, visto que seu efeito protetor na OA foi semelhante ao apresentado para o CS-A.

Palavras-chave: fucosil condroitina sulfato; inflamação; osteoartrite.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a disease with no clear and effective treatment that affects more than 237 million people worldwide. Due to the ineffectiveness of current treatments, new more effective therapeutic alternatives with fewer side effects have been necessary. Chondroitin sulfate (CS) is a sulfated polysaccharide (PS) widely recommended for the treatment of patients with knee OA, although its therapeutic efficacy is not yet well established. Fucosylated chondroitin sulfate (FCS) is a PS extracted from marine organisms and which has a structure like the CS of mammals, and which, due to its excellent anti-inflammatory properties, is a promising candidate for the treatment of OA. Due to the therapeutic potential of these PSs, this work aimed to evaluate the therapeutic effect of CS from bovine trachea (CS-A), shark cartilage (CS-C) and FCS from the body wall of the sea cucumber *Holothuria grisea* in a *in vivo* model of OA induced by monosodium iodoacetate in the patellofemoral joint of C57BL/6 mice. After OA induction, mice were randomly divided into groups (n = 5) according to daily oral treatment for 28 days: (1) Sham (sham operated, saline 0.9% v.o.); (2) negative control (illness, 0.9% saline v.o.); (3) CS-A (illness, 100mg/kg v.o.); (4) CS-C (illness, 100mg/kg v.o) and (5) FCS (illness, 100mg/kg v.o). The effectiveness of the treatments was evaluated by measuring allodynia (50% of the nociception threshold), motor activity, leukocyte migration, anti-inflammatory activity (IL-10 dosage), morphometric analysis and histopathological OARSI Score. During 28 days of experimentation, CS-A (100 mg/kg), CS-C (100 mg/kg) and FCS (100 mg/kg) could induce analgesia, increase motor activity and reduce leukocyte migration in osteoarthritic mice significantly compared to the negative control (saline 0.9%). In addition, morphometry revealed a significant increase in cartilage over the tibia for the animals treated with CS-A and FCS, whose results were confirmed by OARSI histopathological analysis, showing a reduction in OA severity compared to the negative control. However, only CS-A (100 mg/kg) significantly increased IL-10 levels, suggesting that this molecule has a protective activity against cartilage degeneration by regulating inflammation. Despite being preliminary, the mechanisms involved in FCS treatment need to be further investigated, since its protective effect on OA was similar to that presented for CS-A.

Keywords: fucosylated chondroitin sulfate; inflammation; osteoarthritis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Polissacarídeos nas doenças humanas.....	22
Figura 2 - Unidade de dissacarídeo de repetição de cada glicosaminoglicano.....	24
Figura 3 - Figura 3. Representações estruturais das estruturas cristalinas dos GAGs e suas interações com proteínas e funções relevantes para doenças específicas. (A) Hp 4-mer + proteína 1-alfa inflamatória de macrófago; (B) Hp 5-mer + fator plaquetário 4; (C) Tetrassacarídeo de Hp + Complexo de heparanase humana; (D) Hp 6-mer + d- glucuronil C5-epimerase; (E) SD 6-mer + monômero de cathepsina K; (F) CS-A 4-mer + Monômero Sonic Hedgehog	25
Figura 4 - Aplicação de GAGs em sistemas de engenharia de tecidos.....	27
Figura 5 - Estrutura química das cadeias de diferentes condroitins sulfato. “S” significa o padrão de sulfatação nas unidades dissacarídicas	28
Figura 6 - Participação de GAGs na composição do agregam no processo de compressão e relaxamento da cartilagem articular	30
Figura 7 - Representação estrutural da unidade de repetição do fucosil condroitina sulfato (FCS) de <i>H. grisea</i>	32
Figura 8 - A convergência das escolhas de envelhecimento, obesidade e estilo de vida no desenvolvimento de inflamação e condrossenescência na OA	35
Figura 9 - Exercícios de intensidade moderada recomendados para pacientes com OA	37
Figura 10 – Mecanismo de inflamação em OA	39
Figura 11 - Migração dos leucócitos através do endotélio vascular. Fases: 1 e 2) captura; 3) rolagem, 4) parada, 5) adesão e migração transendotelial	43
Figura 12 - Interações neuro-imunes em terminais nervosos periféricos e medula espinhal na dor	47

ARTIGO I

Figura 1 - Efeito do tratamento terapêutico da inflamação osteoartrítica com diferentes condroitins sulfato (CS-A: 100 mg/kg, v.o.; CS-C: 100 mg/kg, v.o.; e FCS: 100 mg/kg, v.o.) no ensaio de hipersensibilidade mecânica (A) e no condicionamento motor dos animais (B). Os valores representam a média dos valores do limiar hipernociceptivo±desvio padrão mensurado nos dias 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 e 28 (n = 5 - 10 camundongos/grupo, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 em comparação com o grupo MIA, teste t não pareado)	60
--	----

Figura 2 - Efeito do tratamento terapêutico da inflamação osteoartrítica com diferentes condroitins sulfato (CS-A: 100 mg/kg, v.o.; CS-C: 100 mg/kg, v.o.; e FCS: 100 mg/kg, v.o.) na contagem de leucócitos totais presentes no lavado articular (A) e na expressão de IL-10 na cartilagem articular de camundongos osteoartríticos. Os valores foram expressos como média±desvio padrão (n = 3-7 animais/grupo, ^{###}P <0,001 vs. grupo Sham, *p value < 0,05, **p value <0,01 e ***p value < 0,001 vs. grupo MIA, One-way ANOVA não paramétrico seguido do teste de Bonferroni) 63

Figura 3 - Micrografias da cartilagem sinovial dos animais osteoartríticos após 28 dias de tratamento com diferentes condroitins sulfato (CS-A: 100 mg/kg, v.o.; CS-C: 100 mg/kg, v.o.; e FCS: 100 mg/kg, v.o.). As lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina (HE), Tricômio de gomori (TG) e Azul de toluidina (AZ). Colchetes: grupos de condrócitos funcionais; \$: hipocelularidade e morte celular; *: neoformações ósseas; IF: infiltrado inflamatório; #: cartilagem preservada; +: erosão da cartilagem; Barra: deformação da cartilagem; Setas: proteoglicanos na superfície da cartilagem articular. Escala: 50 e 500 µm 65

Figura 4 - Área de tecido cartilaginoso hialino sobre tíbia (A) e fêmur (B); e escore histológico OARSI do dano articular (C) nos animais osteoartríticos após 28 dias de tratamento com diferentes condroitins sulfato (CS-A: 100 mg/kg, v.o.; CS-C: 100 mg/kg, v.o.; e FCS: 100 mg/kg, v.o.). Os valores expressos em média±desvio padrão (n = 3-5 animais/grupo, ^{##}P <0,01 vs. grupo Sham, *p value < 0,05 e ***p value < 0,001 vs. grupo MIA, One-way ANOVA não paramétrico seguido do teste de Bonferroni) 67

ARTIGO II

Figura 1 - Mecanismo de atividade anti-inflamatória de SYSADOAs com vias inflamatórias da OA. [espécie reativa de oxigênio (ROS), prostaglandina E2 (PGE2), C-telopeptídeo (CTX-1), fosfatase alcalina (ALP), molécula de adesão intercelular 1(ICAM1), proteína quimiotática de monócitos – 1 (MCP-1), metaloproteinases de matriz-3 (MMP-3), proteína C-reativa (PCR), padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), fragmentos de matriz extracelular (EMFs), fragmentos de fibronectina (Fn-f), proteínas de choque térmico (SHps), I-kappa quinase (IKK) (IκBα)] 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Receptores de Ácido Hialurônico	76
Tabela 2 - Receptores de Sulfato de Condroitina	84
Tabela 3 - Novas Perspectivas Terapêuticas para Osteoartrite	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OA	Osteoartrite
HA	Ácido hialurônico
IA	Intra-articular
AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
ALT	Alanina aminotransferase
CAMs	Moléculas de adesão celular
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CS	Sulfato de condroitina
CS-A	Condroitina-4-sulfato
CS-B	Condroitina-2,4-dissulfato
CS-C	Condroitina-6-sulfato
CS-D	Condroitina-2,6-sulfato
CS-E	Condroitina-4,6-dissulfato
FCS	Fucosil condroitina sulfato
FS	Fucana sulfatada
PS	Polissacarídeo sulfatado
DS	Sulfato de dermatana
KS	Sulfato de queratana
Hp	Heparina
HS	Sulfato de heparana
AR	Artrite reumatóide
EDTA	Ácido propilenodiaminotetraacético
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
Fucp	Fucopirranose

H. grisea	<i>Holothuria grisea</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
GalNac	N-acetilgalactosamina
GlcA	Ácido glicurônico
G	Glicosamina
GAc	N-Acetilglicosamina
GS	Sulfato de glicosamina
SH	Sulfato de heparana
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IdoA	Ácido idurônico
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento neuronal
NO	Óxido nítrico
PG	Proteoglicano
PS	Polissacarídeos sulfatados
AU	Ácido urônico
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
SNC	Sistema nervoso central
CE	Célula endotelial

SD	Sulfato de dermatano
SQ	Sulfato de queratana
PLA2	Fosfolipase A2
PKC	Proteína quinase C
PGI2	Prostaciclina
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária
HE	Hematoxilina-eosina
TG	Tricômio de gomori
AZ	Azul de toluidina
FLS	Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos
LCA	Ligamento cruzado anterior
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
EA	Eventos adversos
EAG	Eventos adversos graves
CSPG	Proteoglicados de sulfato de condroitina

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
mg	Miligramma
v.o.	Via oral
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
Da	Dalton
KDa	Kilo Dalton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.1.1 Objetivo Específico.....	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 Polissacarídeos	21
3.1.1 Polissacarídeos Sulfatados	22
3.2 Glicosaminoglicanos	23
3.2.1 Características Estruturais	23
3.2.2 Aplicações Biomédicas de GAGs	25
3.2.3 Sulfato de Condroitina	27
3.2.4 GAGs de Invertebrados Marinhos	31
3.3 Osteoartrite	33
3.3.1 Aspectos Gerais	33
3.3.2 Características Clínicas e Epidemiológicas	34
3.3.3 Fisiopatologia	37
3.3.4 Tratamento	39
3.4 Inflamação e Dor	41
3.4.1 Mediadores da Inflamação	41
3.4.2 Dor Inflamatória	44
3.5 Modelos de Osteoartrite	48
4 ARTIGO 1 - Efeito terapêutico de diferentes sulfato de condroitina em osteoartrite induzida por iodoacetato monossódico	52
5 ARTIGO 2- Evidências de segurança, eficácia e mecanismo de ação de SYSADOAs e novas perspectivas terapêuticas em osteoartrite	70
6 CONCLUSÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS	98
ANEXO A – CÓDIGO DE ÉTICA DA FIOCRUZ	137
ANEXO B - SÚMULA CURRICULAR	138

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são grandes polímeros naturais formados por cadeias de monossacarídeos ligados entre si por ligações glicosídicas. Estes polímeros são considerados macromoléculas biológicas vitais para todos os organismos, sendo predominantemente encontrados em plantas, animais, bactérias, fungos, algas marinhas. Podem diferir entre si na posição da ligação glicosídica, comprimento da cadeia, grau de ramificação e grupos substituintes (ZHANG; WANG, 2015; ULLAH et al., 2019). Devido às suas inúmeras possibilidades de variação estrutural, os polissacarídeos apresentam moléculas ricas em informação e possuem diversas propriedades biológicas como componentes da matriz extracelular (MEC) e do glicocálice das células, incluindo participação em processos de adesão, proliferação e diferenciação celular (ROSA et al., 2021).

Os polissacarídeos sulfatados (PS) formam um grupo de macromoléculas amplamente distribuídos entre os seres vivos, estabelecem compostos com grande variedade estrutural e alta densidade de carga negativa devido à presença de ésteres de sulfato e/ou grupamentos carboxila (ULLAH et al., 2019). Os PS são amplamente distribuídos em uma grande variedade de organismos, tais como vertebrados, invertebrados e algas marinhas (ULLAH et al., 2019; CIANCIA et al. 2020), sendo em organismos marinhos (invertebrados e algas marinhas), encontrados majoritariamente como fucanas sulfatadas e galactanas sulfatadas, mas também, na forma sulfato de heparana, sulfato de dermatano e fucosil condroitina sulfato (FCS) (MOURÃO, 2015). Em virtude de sua ampla diversidade estrutural, esses compostos apresentam várias propriedades biológicas importantes como atividade anticoagulante, anti-inflamatória, antitrombótica, anticâncer e antivirais (KIM et al. 2017; POMIN; MULLOY, 2018; ISMAIL; AMER, 2020).

A osteoartrite (OA) é uma doença crônico-degenerativa, de alta prevalência mundial, que afeta principalmente as articulações dos joelhos, mãos, quadris e coluna (KOHN et al., 2016). Vários fatores de risco como envelhecimento, trabalho físico excessivo, movimentos repetitivos e obesidade têm sido associados com a OA (MANCUSO et al., 2019). A etiopatogenia da OA é complexa e, provavelmente, multifatorial, associando-se ao envolvimento de mediadores inflamatórios, fatores genéticos, envelhecimento, obesidade, deformidades articulares ou lesões articulares, atividade ocupacional ou esportiva, densidade mineral óssea, deficiência de estrógeno e desregulação metabólica (MORA et al., 2018). Alguns autores sugerem que a OA estaria

associada a múltiplos traumas da cartilagem articular, formação de fragmentos de fibronectina e de matriz extracelular e metaloproteases da matriz (MMPs) que contribuiriam para a destruição da cartilagem, característica principal da doença (WANG; HE, 2018).

No tratamento farmacológico da OA são utilizados anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), corticoides intra-articulares e analgésicos. No entanto, são moderadamente eficazes para o alívio da dor e não retardam ou interrompem a progressão da doença. Além disso, o uso prolongado desses agentes aumenta consideravelmente as chances de efeitos adversos graves, incluindo toxicidade gastrointestinal, cardiovascular e renal (STEINMEYER et al., 2018).

O sulfato de condroitina (CS) é um glicosaminoglicano (GAG) presente em vários tecidos conjuntivos, como cartilagem, ligamentos ossos, tendões e pele. Sua estrutura é composta por ácido glicurônico (GlcA) e N-acetilgalactosamina (GalNAc), com grupos sulfato em um ou mais dos grupos –OH em C4 e C6 da GalNAc e C2 e C3 do GlcA (BISHNOI et al., 2016). O CS pode ser encontrado em bovinos, suínos e frangos, ou fontes marinhas, como peixes cartilaginosos (tubarões e raias) (VOLPI et al., 2009; MACCARI et al., 2010). Atualmente, o CS é um GAG recomendado fortemente pela Sociedade Europeia para Aspectos Clínicos e Econômicos da Osteoporose, Osteoartrite e Doenças Musculoesqueléticas (ECSEO) para o tratamento de pacientes com OA de joelho (BRUYÈRE et al., 2019).

Os pepinos-do-mar possuem uma parede corporal rica em polissacarídeos sulfatados. Proteoglicanos da parede corporal desses animais são constituídos por longas cadeias de fucosil condroitina sulfato (FCS) e fucana sulfatada (FS). O FCS tem uma cadeia central formada por ácido D-glicurônico e N-acetil-D-galactosamina, semelhante ao sulfato de condroitina (CS) de vertebrados, porém com ramificações de L-fucose ligados na posição 3 do ácido glicurônico da unidade dissacarídica central. Contudo, o padrão de sulfatação dessas moléculas também variam bastante entre as diferentes espécies de pepinos-do-mar. A espécie *Holothuria grisea* possui uma cadeia de sulfato de condroitina contendo três diferentes ramificações: monossacarídeos de α -Fuc-2,4diSO₄ (~27%), α -Fuc-3,4diSO₄ (~20%) e um dissacarídeo compostos por α -Fuc1→2- α -Fuc-3SO₄ (~53%) (FONSECA; MOURÃO, 2021). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que FCSs obtido de diferentes espécies de pepino-do-mar são resistentes à degradação por condroitinase e são capazes de reduzir o recrutamento de células inflamatórias para o sítio de lesão em diferentes modelos animais (BORSIG et al., 2007;

MELO-FILHO et al., 2010). Além disso, um amplo espectro de atividades biológicas foi determinado para os FCSs de holotúricos (pepino-do-mar), incluindo atividades anticoagulantes (FONSECA et al., 2017), antitrombóticas (YAN L. et al., 2021), antitumorais e anti-inflamatórias (USTYUZHANINA et al., 2019).

Diante da carência de terapias que retardam a progressão da OA, o presente estudo se propôs a avaliar o mecanismo de ação de diferentes CSs em modelo animal de OA e definir estrutura vs efeitos terapêuticos de CSs majoritariamente 4-sulfatado extraído da traqueia de bovino (CS-A), 6-sulfatado extraído da cartilagem de tubarão (CS-C) e 4 e 6-sulfatado de equinodermos (FCS) extraído da parede corporal de *Holothuria grisea* (pepino-do-mar) como uma base para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da OA.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito terapêutico de diferentes condroitins sulfato em modelo animal de osteoartrite.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar a eficácia do tratamento terapêutico de diferentes preparações de CS (traqueia bovina e cartilagem de tubarão) e do FCS (pepino-do-mar) sobre a inflamação e nocicepção em modelo de osteoartrite induzida *in vivo*;
- Avaliar a atividade motora dos animais tratados com de diferentes preparações de CS (traqueia bovina e cartilagem de tubarão) e do FCS (pepino-do-mar);
- Avaliar o processo histopatológico da articulação induzida com MIA sob tratamento com os diferentes CSs;
- Quantificar o número de leucócitos totais do lavado articular dos animais tratados com os diferentes CS (traqueia bovina e cartilagem de tubarão) e FCS (pepino-do-mar);
- Determinar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva dos CSs, avaliando os níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias na cartilagem articular.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Polissacarídeos

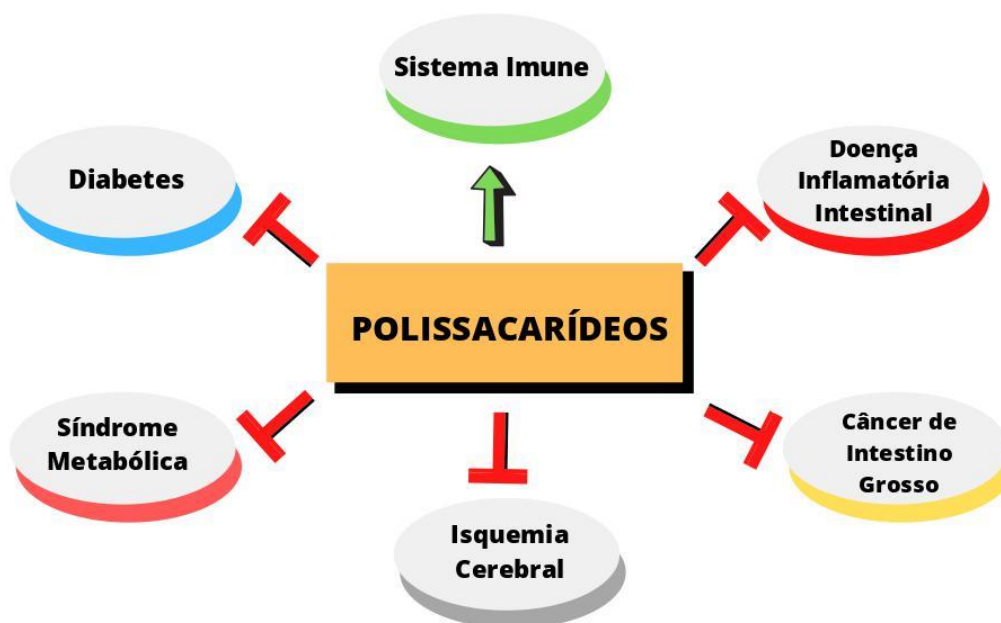
Os polissacarídeos são considerados macromoléculas biológicas vitais para todos os organismos vivos, estruturalmente apresentam homo (glicogênio e celulose) ou hetero monossacarídeos (ex: heparina) e ácidos urônicos conectados por ligações glicosídicas, diferindo entre si na posição das ligações glicosídicas, comprimento da cadeia, grau de ramificação e grupos substituintes. São predominantemente abundantes em plantas (pectina, inulina), animais (sulfato de condroitina, heparina e ácido hialurônico), bactérias (peptidoglicanos), líquens, fungos, algas marinhas (ZHANG; WANG, 2015; ULLAH et al., 2019).

Em virtude de suas inúmeras possibilidades de variação estrutural, os polissacarídeos apresentam moléculas ricas em informação e possuem diversas propriedades biológicas, tais como componentes da matriz extracelular (MEC) e do glicocálice das células, bem como participação em processos de adesão, proliferação e diferenciação celular (ROSA et al., 2021).

Os polissacarídeos se destacam como produtos farmacêuticos e como biomateriais médicos devido sua boa degradabilidade, natureza não tóxica, biocompatibilidade e baixo custo de processamento. A identificação de estruturas polissacarídicas novas e originais constitui um campo de pesquisa importante para aplicações de polissacarídeos nas indústrias alimentares e no campo da medicina (SONG et al., 2018).

Atualmente, os polissacarídeos têm sido usados para diagnóstico de doenças, inibição e tratamento do câncer, entrega de fármacos e engenharia de tecidos, tornando-se um ingrediente valioso nas áreas de produtos farmacêuticos, nutracêuticos, alimentícios e cosméticos (ULLAH et al., 2019). Estudos têm mostrado que os polissacarídeos podem exercer uma gama de atividades farmacológicas relacionadas a processos antivirais, antioxidantes, antimicrobianos, neuroprotetores, imunomoduladores, antiestresse, antiosteoartríticos, antidiabéticos e agentes anticâncer, o que os torna bastante promissores como compostos bioativos para o tratamento de doenças (Figura 1) (DUTTAROY, 2021).

Figura 1. Polissacarídeos nas doenças humanas



Fonte: Adaptada de DUTTAROY, 2021.

3.1.1 Polissacarídeos Sulfatados

Os polissacarídeos sulfatados (PS) formam um grupo de macromoléculas amplamente distribuídos entre os seres vivos, estabelecendo compostos com grande variedade estrutural e alta densidade de carga negativa devido à presença de ésteres de sulfato e/ou grupamentos carboxila (ULLAH et al., 2019). Em contraste com os polissacarídeos terrestres, os polissacarídeos marinhos são altamente sulfatados, especialmente os da parede celular das macroalgas que abrigam uma grande diversidade de PS (fucoidanas, agaranas, carrageninas, ulvanas, etc.), os quais constituem maiores números de estudos (HELBERT et al., 2017).

Os PS estão presentes nos tecidos de vertebrados e invertebrados na forma de glicosaminoglicanos (GAGs). Os GAGs não estão dispostos livremente, mas ligados covalentemente a proteínas formando os proteoglicanos. Os principais exemplos de GAGs encontrados em vertebrados são sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparana e heparina. No entanto, em invertebrados marinhos (equinodermos e algas marinhas) são encontrados majoritariamente como fucanas e galactanas sulfatadas, sulfato de heparana, sulfato de dermatano e fucosil condroitina sulfato (FCS) (MOURÃO, 2015).

Sua diversidade decorre dos diferentes tipos de açúcares (ex.: glucose, fucose, galactose, etc), configurações (α ou β), formas enantioméricas (L ou D), posições das ligações glicosídicas (2, 3, 4 ou 6), presença ou ausência de ramificações e das posições dos grupamentos sulfatos (POMIN, 2008). Em virtude de sua ampla diversidade estrutural, estudos demonstraram que os polissacarídeos sulfatados apresentam propriedades biológicas relacionadas a atividade anticoagulante, anti-inflamatória, antitrombótica, anticâncer e antiviral (KIM et al. 2017; POMIN; MULLOY, 2018; ISMAIL; AMER 2020).

3.2 Glicosaminoglicanos

3.2.1 Características Estruturais

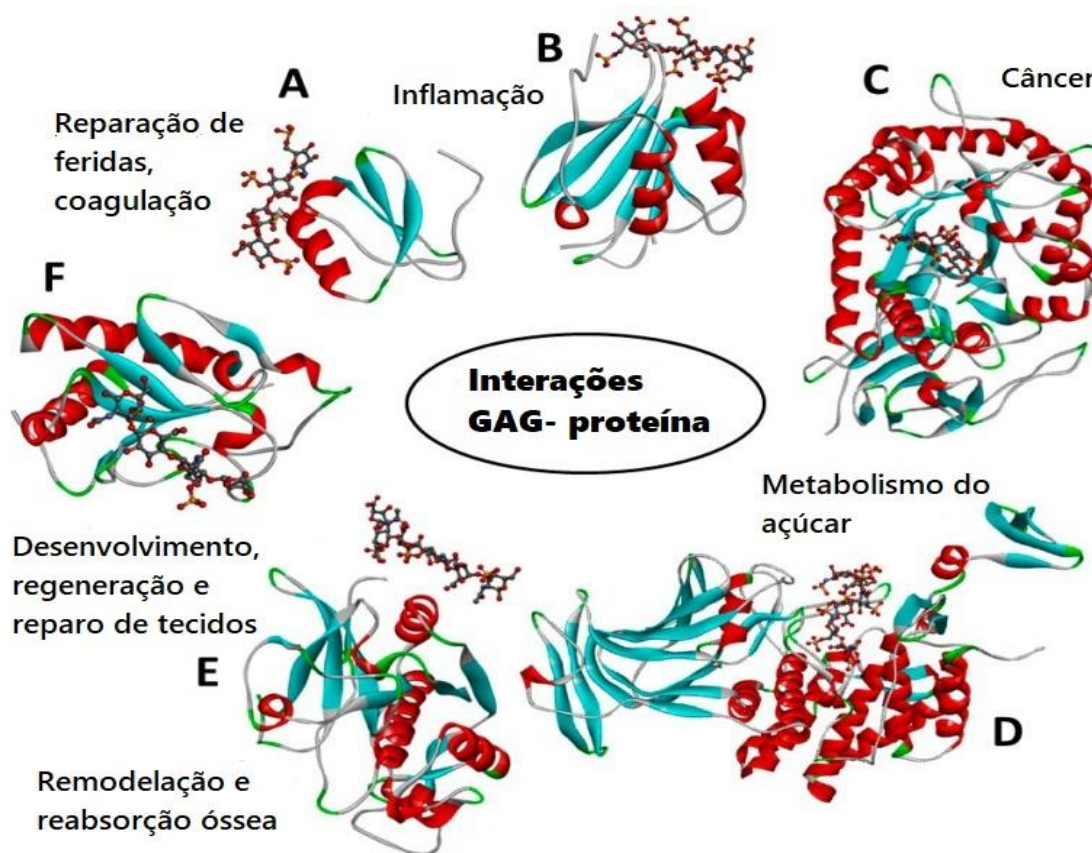
Os glicosaminoglicanos (GAGs) são formados por longas cadeias de heteropolissacarídeos lineares, não ramificadas e constituídas principalmente por unidades de dissacarídeos repetidas, compostas por um amino açúcar (α - D- ou β - D- ácido glicurônico - G ou N-acetil- β - D- galactosamina - GalNAc) e um ácido urônico (β - D- glicurônico - GlcA ou sua versão epimerizada C5, ácido α - L -idurônico - IdoA) ou galactose ligados por ligação glicosídica. Assim, os GAGs podem diferir de acordo com o tipo de hexosamina, hexose ou unidade de ácido hexurônicos, e com base na geometria da ligação glicosídica entre essas unidades (VASILIADIS; TSIKOPOULOS, 2017).

Os GAGs são sulfatados em vários graus, com exceção do ácido hialurônico (HA), que não apresenta sulfatação. A presença dos grupos sulfatos (SO_4^{2-}) e carboxilatos ($-\text{COOH}$) dos resíduos de ácidos urônicos resultam em cadeias com um grande caráter aniônico que são responsáveis pelas suas habilidades como retenção de água, ligação celular, controle de fluxos de íons e sinalização neuronal (SODHI; PANITCH, 2021). A capacidade dos GAGs de reter grandes quantidades de água promove a hidratação da matriz extracelular (MEC), conferindo resistência às forças compressivas, especialmente em tecidos de alta carga, como a cartilagem, permitindo processos de dessorção e reabsorção (NEVES et al., 2020). A presença do caráter aniônico aliado a grande heterogeneidade estrutural permite aos GAGs interagir com diversas proteínas, incluindo proteases e moléculas de sinalização extracelular, que são responsáveis por uma variedade de ações biológicas (SHI et al., 2021). O padrão estrutural das unidades

3.2.2 Aplicações Biomédicas de GAGs

Os GAGs têm demonstrado regular vários processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário, a regulação das atividades enzimáticas e a ligação do ligante a receptores (VALLET et al., 2021). Também, são componentes nativos da matriz extracelular, controlam o microambiente ao redor das células e interagem com proteínas e moléculas de sinalização celular em vários contextos fisiológicos e patológicos. Devido a essa versatilidade de interações biológicas os GAGs têm sido amplamente usados para produção de compostos imunomoduladores, antioxidantes, anticancerígenos, anti-inflamatórios, antivirais, neuroprotetores, antiproliferativos e anticoagulantes (Figura 3) (BALBINOT-ALFARO et al., 2021).

Figura 3. Representações estruturais das estruturas cristalinas dos GAGs, interações com proteínas e funções relevantes para doenças específicas. (A) Hp 4-mer + proteína 1-alfa inflamatória de macrófago; (B) Hp 5-mer + fator plaquetário 4; (C) Tetrassacarídeo de Hp + Complexo de heparanase humana; (D) Hp 6-mer + d- glucuronil C5-epimerase; (E) SD 6-mer + monômero de catepsina K; (F) CS-A 4-mer + Monômero Sonic Hedgehog.



Fonte: Adaptada de POMIN; MULLOY, 2021.

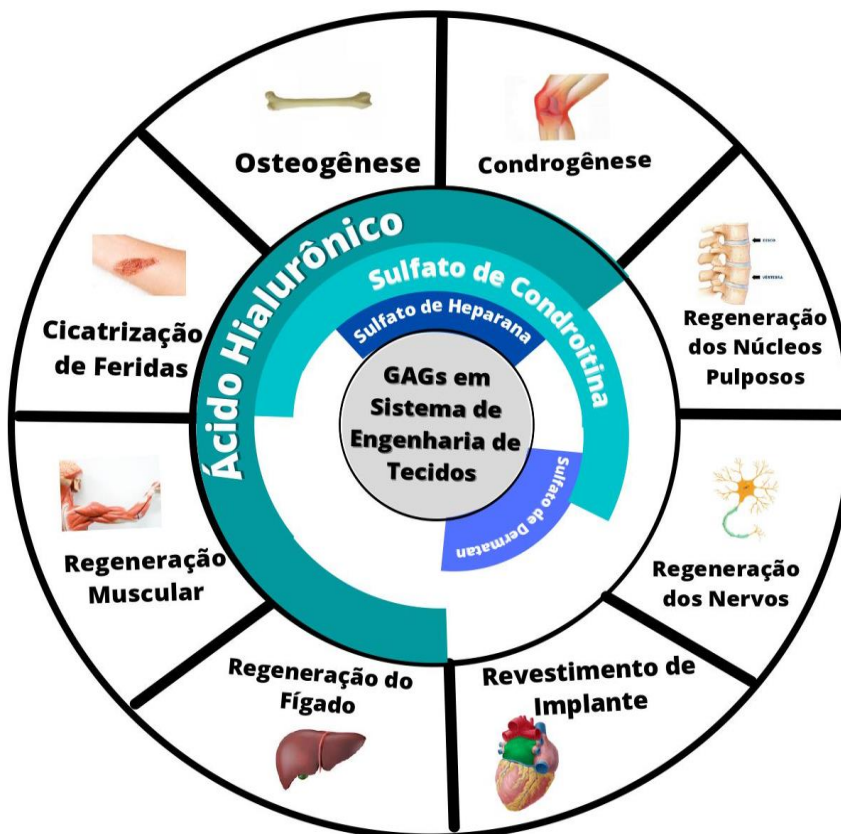
Os PGs são uma família diversa de moléculas com múltiplas funções relacionadas com o desenvolvimento, saúde e doença (AROKIASAY et al., 2020). São combinados por moléculas de GAGs sulfatadas e não sulfatadas que estão covalentemente ligadas ao núcleo da proteína glicosilada (BALBINOT-ALFARO et al., 2021). A maioria das células de mamíferos produzem PGs e as secretam na MEC, podendo as inserir na membrana plasmática ou as armazenar em grânulos secretores (COSTA et al., 2017). Os PGs atuam predominantemente no espaço extracelular, seja como elementos estruturais ou como ligantes para pequenos fatores de crescimento de proteínas, citocinas, quimiocinas e morfógenos que regulam o desenvolvimento embrionário, respostas inflamatórias a patógenos e lesões, e comunicação entre as células (KANG et al., 2018; POMIN; MULLOY et al., 2018; SHI et al., 2021).

Devido os GAGs exercerem funções vitais em múltiplos processos fisiológicos como componentes estruturais e efetores na atividade celular, seus benefícios têm sido explorados em aplicações biomédicas para o desenvolvimento de biomateriais na engenharia de tecidos e medicina regenerativa (KÖWITSCH et al., 2017). Diferentes tipos de biomateriais baseados em GAG são descritos e caracterizados como hidrogéis baseados em derivados de CS ou HA para cartilagem (DONNELLY et al., 2017) e tecidos neurais (KARVINEN, J. et al., 2018). O ácido hialurônico (HA) na forma de gelatina pode acelerar a cicatrização de feridas (EBRAHIMI-HOSSEINZADEH et al., 2016), regenerar o tecido muscular (POVEDA-REYES et al., 2016), induzir a condrogênese, osteogênese e a cicatrização de feridas por meio do comportamento de células-tronco (SODHI; PANITCH, 2021).

Sistemas de gel à base de CS foram desenvolvidos e aplicados na engenharia de tecidos em variados tipos de doenças, incluindo condrogênicas (CORRADETTI et al., 2016), osteogênicas (KIM et al., 2017), bem como para regeneração de núcleos pulposos (WACSH et al., 2017) e na regeneração neuronal (BIRDWHISTELL, 2018). O sulfato de dermatana tem sido aplicado em dispositivos implantáveis, como próteses vasculares (HAYDER et al., 2018) e, também, para conduzir a diferenciação de células-tronco em construções de engenharia de tecidos neuronais semelhantes ao uso de HA e CS (OGURA et al., 2020). A pesquisa de engenharia de tecidos demonstrou que géis contendo sulfato de heparana podem ser aplicados para regeneração óssea (SEFKOW-WERNER et al., 2020), angiogênese (WANG et al., 2014) e regeneração de cartilagem (LEE et al., 2019). Contudo, o uso do sulfato de queratano é menos compreendido (MELROSE et al., 2019),

e suas aplicações na engenharia de tecido até o momento são inexistentes (figura 4) (SODHI; PANITCH, 2021).

Figura 4. Aplicação de GAGs em sistemas de engenharia de tecidos



Fonte: Adaptada de SODHI; PANITCHA, 2021.

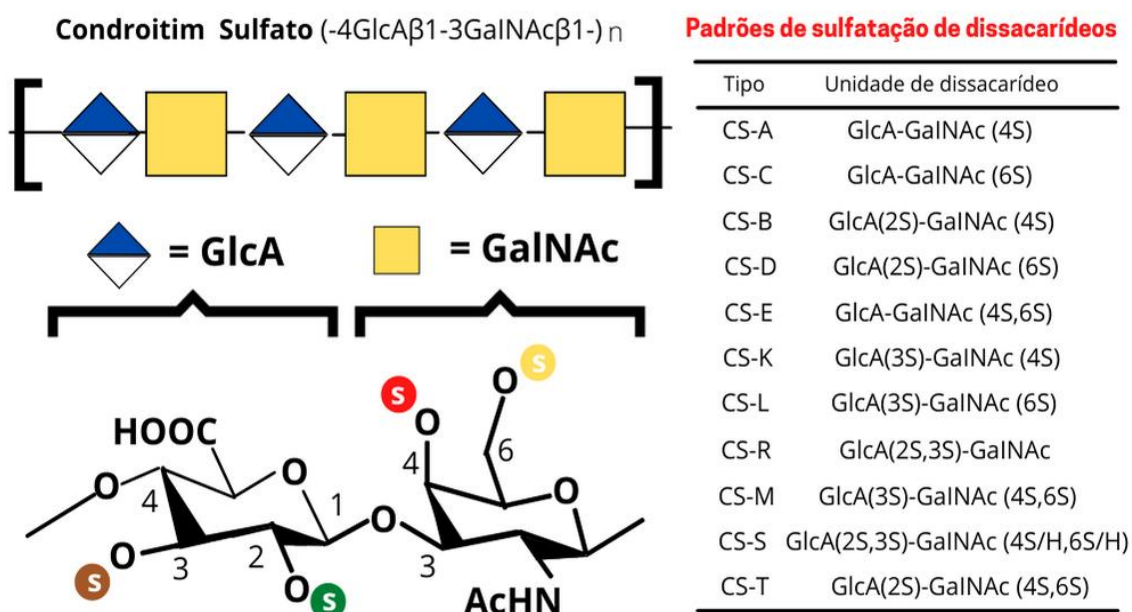
3.2.3 Sulfato de Condroitina

O CS é uma família de GAGs sulfatados distribuídos de forma ubíqua na MEC e nas superfícies celulares, geralmente encontrado ligados a proteínas na forma de proteoglicanos (BEDINI et al., 2016). Estes polissacarídeos são compostos por unidades dissacarídicas repetitivas de $[4) -\beta - \text{GlcA} - (1 \rightarrow 3) -\beta - \text{GalNAc} - (1 \rightarrow)]$ (GlcA = ácido glicurônico, GalNAc = *N*-acetilgalactosamina) cujos grupos hidroxila (OH) podem ser sulfatados (-SO₃) na posição C4 e/ou C6 da *N*-acetil-d-galactosamina e/ou C-2 e/ou C-3 do ácido D-glicurônico (VESSELLA G. et al., 2021).

São integrantes de todos os tecidos conjuntivos de mamíferos, como cartilagem, pele, osso, vasos sanguíneos, ligamentos e tendões (BISHNOI et al., 2016). Os CS extraídos de fontes animais terrestres são formados por estruturas que carregam

especialmente dissacarídeos monosulfatados 4-O- ou 6-O-GalNAc (CS-A e CS-C respectivamente), e uma baixa porcentagem de dissacarídeo não sulfatado (CS-0), enquanto dissacarídeos dissulfatados (CS-B, CS-D, CS-E, CS-K e CS-L) e trissulfatados (CS-M, CS-S e CS-T) são majoritariamente encontrados em espécies marinhas (figura 5) (VESSELLA et al., 2021).

Figura 5. Estrutura química das cadeias de diferentes condroitins sulfato. “S” significa o padrão de sulfatação nas unidades dissacarídicas.



Fonte: Adaptada de VESSELLA et al., 2021.

O CS é um heteropolissacarídeo com características semelhantes às do gel (lubrificação, retenção de água, resistência de carga), representa um percentual de 80% de todos os GAGs da cartilagem articular (LIN et al., 2020) e possuiu alto peso molecular variando entre 50.000 a 100.000 Da (BISHNOI et al., 2016). A produção comercial de CS é obtida através da matéria-prima terrestre de bovinos, suínos e frangos, ou fontes marinhas, como peixes cartilaginosos (tubarões e raias) (VOLPI et al., 2009; MACCARI et al., 2010). As preparações de origem animal podem causar potenciais problemas de segurança associado a presença de agentes infecciosos transmissíveis como vírus, bactérias e moléculas proteicas com propriedades infectantes ou partículas proteicas infecciosas (prions) (MIRAGLIA et al., 2016), além de contaminações com outros GAGs devido a falhas durante o processo de purificação (RESTAINO et al., 2017). CS está

disponível comercialmente como produto de grau farmacêutico (pCS) e grau nutracêutico, sendo a última preparação com grandes variações na composição e/ou pureza (CHEVALIER et al., 2017; HONVO et al., 2019).

A absorção do CS ocorre parcialmente como polissacarídeo de alto peso molecular no intestino delgado e/ou como oligossacarídeos (a maioria do CS) por catabolismo enzimático no trato distal, ceco e cólon (VOLPI et al., 2007). Os oligossacarídeos formados por despolimerização parcial e dessulfatação são gerados por enzimas hidrolítica no trato inferior do aparelho digestivo (MACCARI et al., 2016). A absorção oral de CS é relativamente rápida, apresentando biodisponibilidade oral moderada (10% - 20%) (LAUDER, 2009).

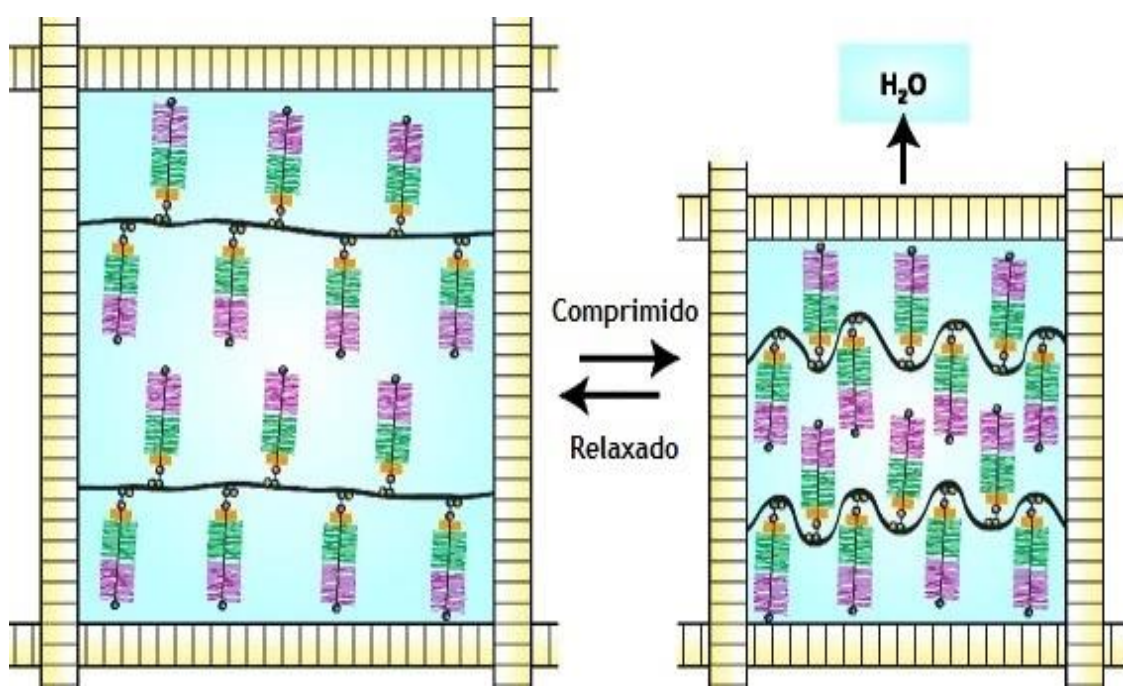
A porcentagem de CS absorvido vai depender do peso molecular e sua absorção depende do grau de despolimerização pela mucosa intestinal (VOLPI, 2006). O CS demonstrou exercer atividades benéficas *in vitro* no metabolismo de diferentes linhagens celulares, como condrócitos, sinoviócitos, macrófagos e células do osso subcondral (BISHNOI et al., 2016). Desde então, a administração exógena de CS tem sido proposta para atuar contra a OA por meio de vários mecanismos de sinalização celular, mediando a promoção de efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antiapoptótico, anticatabólicos e anabólico (AJISAKA et al., 2016; CHEVALIER; CONROZIER, 2017; MOREIRA et al., 2019).

Em virtude desses efeitos, a Sociedade Europeia para Aspectos Clínicos e Econômicos de Osteoporose e Osteoartrite (ESCEO, sigla em inglês) recomenda fortemente o CS de grau farmacêutico como terapia de base a longo prazo para o tratamento da OA de joelho. Dentre as drogas sintomáticas de ação lenta para osteoartrite (SYSADOA) recomendadas, o CS é o de maior evidência (forte recomendação) em termos de eficácia terapêutica, porém essa forma de prescrição deve ser diferenciada de produtos de venda livre (medicamento sem receita). Além disso, estudos clínicos mostram que o CS comercial é bem tolerado, sem efeitos adversos acima do placebo e sem interações medicamentosas (BRUYÈRE et al., 2019).

Na cartilagem articular o CS (roxo e verde) está compondo o proteoglicano agregam junto ao KS (laranja), fornecendo ao agregam alta carga aniônica que auxilia na captação de água do tecido em processos de compressão e relaxamento. No estado relaxado, os agregados de proteoglicanos incham à medida que o CS aniônico e as cadeias de KS atraem água para o tecido, até que um equilíbrio seja alcançado, no qual o inchaço

é equilibrado pelas forças de tração nas fibrilas de colágeno. Porém, sob compressão, a água é deslocada e as cadeias de sulfato de CS e KS ficam mais próximas, aumentando seu potencial de dilatação e equilibrando a carga aplicada. Contudo, o potencial de inchamento aumentado é dissipado com a remoção da carga, conforme o equilíbrio original é restaurado (figura 6) (ROUGHLEY; MORT, 2014).

Figura 6. Participação de GAGs na composição do agregam no processo de compressão e relaxamento da cartilagem articular



Fonte: Adaptada de ROUGHLEY; MORT, 2014

Por ser um componente básico da cartilagem e do líquido sinovial, o CS estimula o processo anabólico do metabolismo da cartilagem, levando ao aumento de colágeno tipo II e a síntese de proteoglicano na cartilagem articular (HASEGAWA et al., 2020). Diversos estudos demonstraram que o CS pode exercer atividades benéficas *in vitro* no metabolismo de diferentes linhagens celulares, como condrócitos, sinoviócitos, macrófagos e células do osso subcondral (BISHNOI et al., 2016). Além disso, a administração exógena de CS tem sido proposta para atuar contra a OA por meio de vários mecanismos de sinalização celular, mediando a promoção de efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antiapoptótico, anticatabólico e anabólico (AJISAKA et al., 2016; CHEVALIER; CONROZIER; 2017; MOREIRA et al., 2019).

As funções anti-inflamatórias do CS são associadas a redução de fatores pró-inflamatórios, proteases e melhora do equilíbrio anabólico/catabólico da matriz da cartilagem extracelular. Suas funções também estão implicadas com a redução das lesões histopatológicas sinoviais (LARGO et al., 2010), redução da perda de volume da cartilagem (PELLETIER et al., 2016), redução da dor, rigidez, limitação funcional e edema/derrame articular (HOCHBERG et al., 2015), redução de taxas de declinação do espaço articular (HOCHBERG, 2010), redução de metaloproteinases da matriz (MMP), incluindo MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14 e desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina 4 (ADAMTS4) (IOVU et al., 2008; IMADA et al., 2010; JOO et al., 2018), redução de enzimas pró-inflamatórias, incluindo ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintetase-2 (NOS-2), redução de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 β (EWALD, 2021), e redução da translocação nuclear de fatores de transcrição NF- κ B canônicos, p65, p50, c-Rel e RelB (STABLER et al., 2017).

3.2.4 GAGs de Invertebrados Marinhos

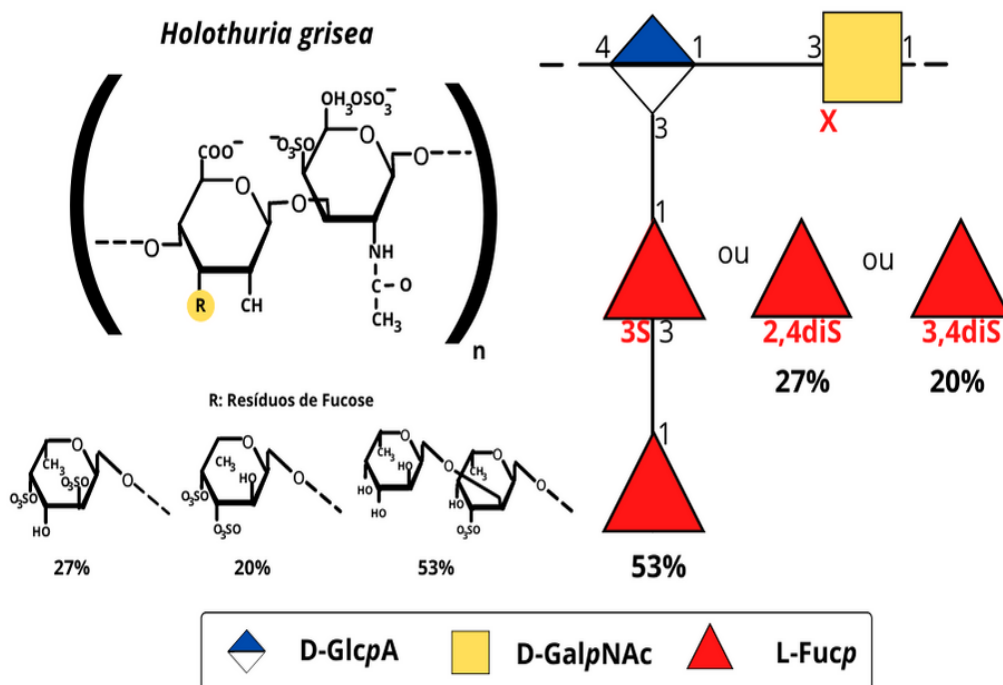
Os pepinos-do-mar possuem uma parede corporal rica em polissacarídeos sulfatados. Proteoglicanos da parede corporal desses animais são constituídos por longas cadeias de fucosil condroitina sulfato (FCS) e fucana sulfatada (FS). O FCS é um GAG de invertebrados marinhos encontrado exclusivamente na parede corporal de espécies de pepinos-do-mar, que apresenta uma cadeia central formada por ácido D-glicurônico e N-acetil-D-galactosamina, semelhante ao CS de vertebrados, porém com ramificações de α -L-fucose ligados na posição 3 do ácido glicurônico da unidade dissacarídica central. O padrão de sulfatação dessas moléculas variam bastante entre as diferentes espécies de pepinos-do-mar (FONSECA; MOURÃO, 2021).

Atualmente 20 espécies de pepinos-do-mar estão com seus FCSs caracterizados, todos apresentando composições distintas de resíduos de α -fucose (2,4- ou 3,4diS e 3- ou 4S). Essas diferenças estão relacionadas à proporção dessas diferentes unidades ao longo do FCS e à presença de ramos compostos de uma (monofucosilada) ou duas unidades de α -fucose (difucosilada). Com base nessas diferenças, são reconhecidos dois padrões estruturais distintos nas ramificações dos FCSs: um composto exclusivamente por ramos monofucosilados (FCS tipo I) e outro composto por ramos mono e difucosilados (FCS tipo II) (SOARES et al., 2018).

A presença de ramificações de α -L-fucose confere ao FCS uma gama de propriedades terapêuticas em vários sistemas biológicos, que não são observadas em CS de vertebrados (FONSECA; MOURÃO, 2021). Embora ainda seja desconhecido o papel biológico do FCS como componente dos tecidos conjuntivos dos pepinos-do-mar (SOARES et al., 2018), estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que FCSs obtido de diferentes espécies de pepinos-do-mar são resistentes à degradação por condroitinase e são capazes de reduzir o recrutamento de células inflamatórias para o sítio de lesão em diferentes modelos animais (BORSIG et al., 2007; MELO-FILHO et al., 2010).

A espécie *Holothuria grisea* é classificada como um FCS tipo II, pois possui uma cadeia de FCS contendo ramos mono e difucosilados: monossacarídeos de α -Fuc-2,4diSO₄ (~27%), α -Fuc-3,4diSO₄ (~20%) e um dissacarídeo compostos por α -Fuc1 $\rightarrow$ 2- α -Fuc-3SO₄ (~53%) (FONSECA; MOURÃO, 2021). A grande maioria dos FCSs (90%) descritos têm apenas ramos monossulfatados e, portanto, pertencem à classe de FCS tipo I (figura 7) (SOARES et al., 2018).

Figura 7. Representação estrutural da unidade de repetição do fucosil condroitina sulfato (FCS) de *H. grisea*



Fonte: Adaptada de SOARES et al., 2018; FONSECA & MOURÃO, 2021.

As fucanas sulfatadas (FS) são outra classe de polímeros encontrados na parede corporal de *H. grisea*, e são constituídos principalmente por resíduos de α -L-fucopirranose, variando entre as diferentes espécies de pepinos-do-mar. Essa grande variabilidade estrutural para o estudo das atividades biológicas é interessante, devido esses polissacarídeos possuírem cadeias lineares simples, compostas de unidades repetitivas de mono ou oligossacarídeos (di, tri, ou tetra unidade), que diferem entre as espécies de pepinos do mar, ainda quanto ao padrão de sulfatação e/ou no tipo de ligação glicosídica (MOURÃO, 2015). A FS isolada da parede do corpo da espécie *H. grisea* é constituída por unidades tetrassacarídicas repetitivas de α -L-fucopirranoses, unidas por ligação do tipo α (1 $\rightarrow$ 3), com sulfatações variando apenas nas posições 2 e 4 (MARQUES et al. 2016).

Assim como o FCS, as FS também apresentam diversas atividades biológicas como anticoagulante e antitrombótica (ZHAO et al., 2016), anti-inflamatória (HEEBA et al., 2015) antiartrítica (PHULL et al., 2017), antimalárica (MARQUES et al., 2016), hepatoprotetora (LIM et al., 2015), anticâncer (RUI et al., 2017), antidelipidêmica (CUONG et al., 2015; YANG et al., 2019) e supressora de sintomas alérgicos (TANINO et al., 2016).

A aplicação de polissacarídeos sulfatados (PS) no tratamento terapêutico de modelos de doenças se constitui como uma linha de pesquisa promissora. O uso de FCS e FS é uma importante ferramenta farmacológica para definir a estrutura *versus* efeitos terapêuticos de polissacarídeos sulfatados ricos em fucose, ainda pouco explorada pelas áreas médicas e biomédicas. Além disso, a constatação de efeitos terapêuticos com esses PS após a administração oral é muito significativa, pois abre a perspectiva da utilização dessas moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos como base para o tratamento de doenças.

3.3 Osteoartrite

3.3.1 Aspectos Gerais

A osteoartrite (OA) é uma desordem reumática musculoesquelética de alta prevalência com implicações substanciais para a saúde individual, sistemas de saúde e custos socioeconômicos em geral (HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019; KLOPPENBURG; BEREBAUM, 2020). A OA continua sendo um problema de saúde

pública de importância global em indivíduos adultos, com comprometimento funcional significativo, acarretando deficiências, redução da qualidade de vida, e até mesmo a morte (NELSON, 2017).

Considerada uma forma comum de artrite, a doença pode afetar qualquer articulação, mas principalmente o joelho, mãos, quadril e coluna vertebral. Os principais sintomas incluem dores articulares, inchaço ocasional nas articulações e rigidez que dura menos de 30 minutos ao acordar e após inatividades. Contudo, frequentemente esses sintomas são acompanhados de inflamação, degeneração da cartilagem articular e limitação funcional (MORA et al., 2018). A OA é uma das 10 doenças mais incapacitantes nos países industrializados (MOBASHERI; BATT, 2016), somente nos EUA em 2013, a OA foi a maior causa de perda de trabalho e afetou mais de 20 milhões de pessoas, custando à economia dos EUA mais de US \$ 100 bilhões anuais (CDC, 2013).

3.3.2 Característica Clínica e Epidemiológicas

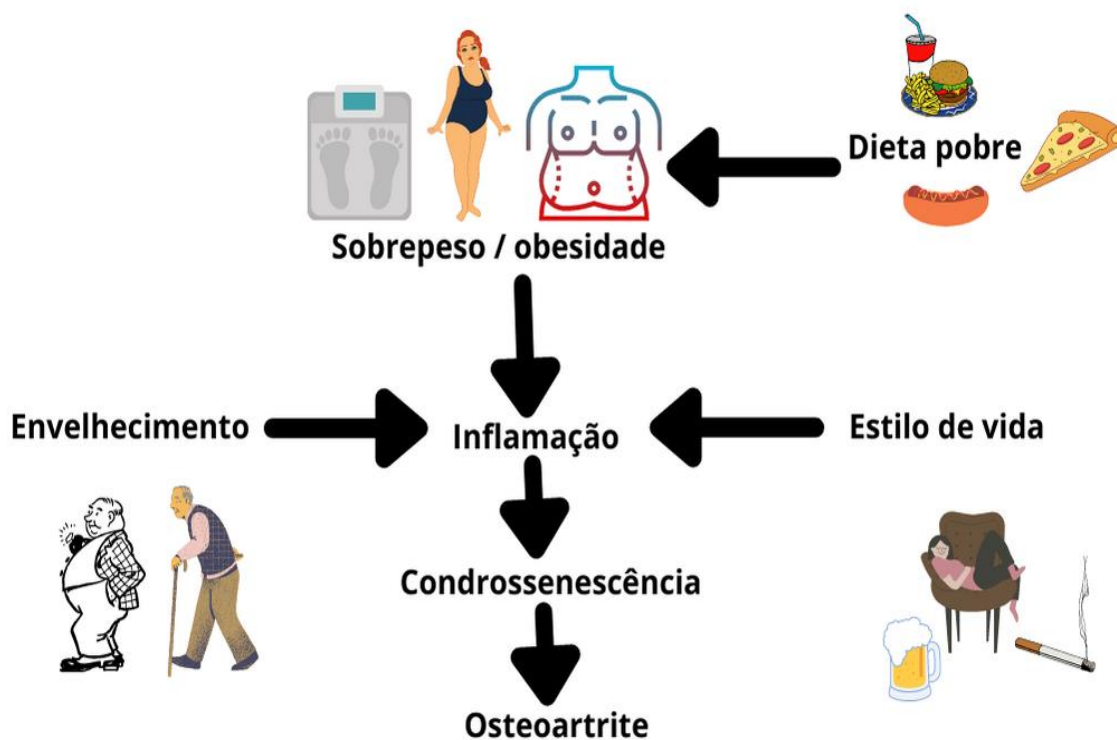
A etiologia de OA é multifatorial, envolvendo fatores de riscos primários e secundários (MORA et al., 2018). Os fatores de risco primários incluem idade, sexo, histórico familiar e obesidade, enquanto os fatores secundários compreendem lesões traumáticas, deformidades mecânicas e flacidez articular (MARTEL-PELLETIER, 2015). Os efeitos combinados do envelhecimento, aumento da obesidade, lesões nas articulações, estilo de vida e hábito alimentares ruins está tornando a OA uma das doenças mais incapacitantes e onerosas do mundo, e estimativas mundiais apontam mais de 250 milhões de pessoas acometidas com a doença (HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019).

A condrossenescência é um termo idealizado por Mobasheri & Batt (2016) para combinar as palavras “condrócito” e “senescência”, indicando a deterioração da função dos condrócitos dependente da idade, que leva à disfunção da cartilagem na OA. Na figura 8, a "condrossenescência" está intimamente ligada à obesidade, escolhas de estilo de vida, envelhecimento e inflamação, contribuindo assim para o desenvolvimento da prevalência da OA.

Alguns autores sugerem que a OA estaria associada a múltiplos traumas da cartilagem articular e formação de fragmentos de fibronectina e de matriz extracelular [como IL-1 β (interleucina-1beta) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa)] e metaloproteases da matriz (MMPs) que contribuiriam para a destruição da cartilagem, característica principal da doença (WANG; HE, 2018). Em virtude desses efeitos, a OA

tem sido reconhecida como uma das principais causas de incapacidade crônica do século XXI (MARCH et al., 2016).

Figura 8. A convergência das escolhas de envelhecimento, obesidade e estilo de vida no desenvolvimento de inflamação e condrossenescência na OA



Fonte: Adaptado de MOBASHERI; BATT, 2016.

Um estudo Global de Doenças de 2010 estimou que 10% a 15% de todos os adultos com mais de 60 anos tinham algum grau de OA sintomática, com prevalência mais alta entre mulheres em relação aos homens (NICOLA, 2020). Os dados do Estudo Longitudinal de Saúde e Aposentadoria da China (uma amostra Nacional aleatória de 2011, idade média de 60 anos), relatou uma prevalência de 8% de OA sintomática do joelho (definida como dor no joelho com autodiagnóstico médico relatado de artrite). Os dados ainda mostraram que OA de joelho era mais comum em mulheres do que em homens, aumentava com a idade até os 70 anos e estava inversamente associada ao nível de escolaridade e outros marcadores de nível socioeconômico (NSE), incluindo diferenças regionais (TANG et al., 2016).

A Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição da Coreia (KNHANES, 2010-12) encontrou diferenças marcantes na frequência de OA sintomática no quadril, joelho e

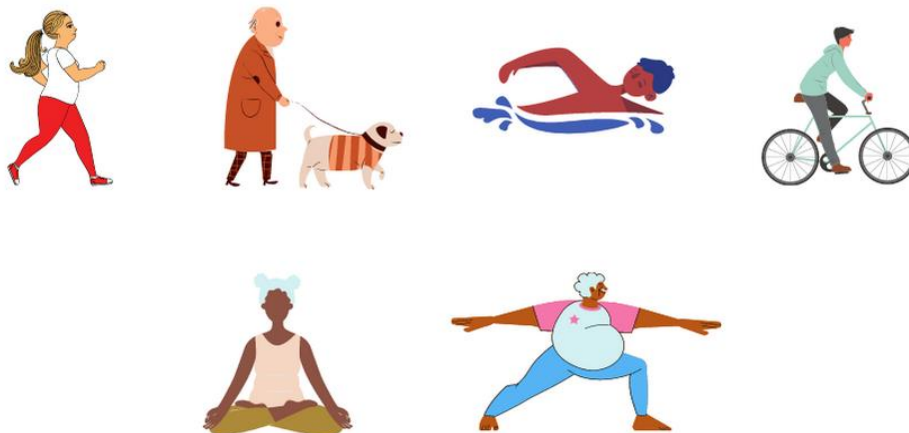
coluna por sexo: 0,1%, 4,5% e 5,6% em homens e 0,2%, 19%, e 16% nas mulheres, respectivamente. Além disso, 9% dos homens e quase 30% das mulheres, tiveram pelo menos uma articulação envolvida; 11% dos homens e 23% das mulheres tiveram pelo menos 2 articulações OA dolorosas. Novamente nesta coorte, idade, baixo nível socioeconômico e localização rural foram associados a OA mais frequente (PARK et al., 2017).

Um estudo realizado com populações dos EUA, usando os dados da Pesquisa Nacional de Entrevista de Saúde entre de 2007–8, estimou que aproximadamente 7% dos adultos com mais de 25 anos (14 milhões de pessoas) tinham OA de joelho sintomática, com cerca de metade destes apresentando doença avançada, sendo a maior carga observada em mulheres brancas não hispânicas (DESHPANDE et al., 2016).

Finalmente, usando os dados da Amazon Mechanical Turk (assistente virtual), um estudo avaliou a percepção do risco individual de desenvolver OA de joelho entre adultos com 25-44 anos sem OA de joelho. Os dados do estudo demonstraram que os participantes que tinham uma alta carga de fatores de risco, superestimaram consideravelmente seu risco, aproximadamente o dobro para o risco ao longo da vida e em 6-7 vezes para o risco de 10 anos, sugerindo que os indivíduos nesta faixa etária podem perceber a OA de joelho como uma doença inevitável da vida (MICHL et al., 2016). Em 2018, os dados da previdencial social, mostraram que as doenças osteomusculares e do tecido conjuntivo representaram 18,5% dos casos totais de concessão do auxílio-doença em 2017. Desses, a OA representou 8,2%, sendo a OA de joelho a mais frequente, totalizando 47% dos casos registrados (BRASIL, 2018).

Atualmente, vivemos em um mundo onde a população está cada vez mais acima do peso, obesa e/ou sedentária. É conhecido que o aumento de atividades físicas e a redução do tempo de sedentarismo contribuiriam para preservar a saúde (física e mental), além de prevenir o aumento da carga de doenças de longo prazo. Além disso, a prática de atividade físicas têm sido utilizadas para o tratamento de diversas doenças crônicas em que o estilo de vida se caracteriza como um fator de risco (MOBASHERI; BATT, 2016). Diante disso, é recomendado dentre outros hábitos, a prática de exercícios de intensidade moderada como caminhada, natação/hidroginástica, yoga, ciclismo e meditação (figura 9).

Figura 9. Exercícios de intensidade moderada recomendados para pacientes com OA



Fonte: Adaptado de MOBASHERI; BATT, 2016.

3.3.3 Fisiopatologia

São observados dois tipos de padrões na inflamação da OA: padrão molecular associado a danos (DAMPs) e padrão molecular associado a patógenos (PAMPs). Os DAMPs estimulam o sistema imunológico através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) ativando uma resposta imune inata no hospedeiro. Após trauma articular ou uso excessivo da articulação, o dano ao tecido resulta na produção de DAMPs, que pode ser produto da MEC (como fibronectina e ácido hialurônico) que sinalizam através de PRRs em macrófagos sinoviais, sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS) e condrócitos para induzir a produção local de mediadores inflamatórios que ainda levam à condrólise e liberação de produtos de degradação da MEC para continuar estimulando a resposta inflamatória (BISHNOI et al., 2016).

Os PRRs foram identificados, principalmente, na superfície das células do sistema imunológico, condrócitos, sinoviócitos e osteoblastos (RAHMATI et al., 2016). A ligação de DAMPs a esses receptores inicia uma cascata de sinalização, que leva à ativação de vários fatores de transcrição, incluindo fator nuclear- κ B (NF- κ B). Essa ativação leva à liberação de vários fatores, como fatores pró-catabólicos [matriz metaloproteinase (MMP) -1, -3, -9 e -13], citocinas pró-inflamatórias [fator de necrose tumoral (TNF) - α , interleucina (IL) -1 β , e IL-6], quimiocinas [quimiocinas ligantes (CCL)

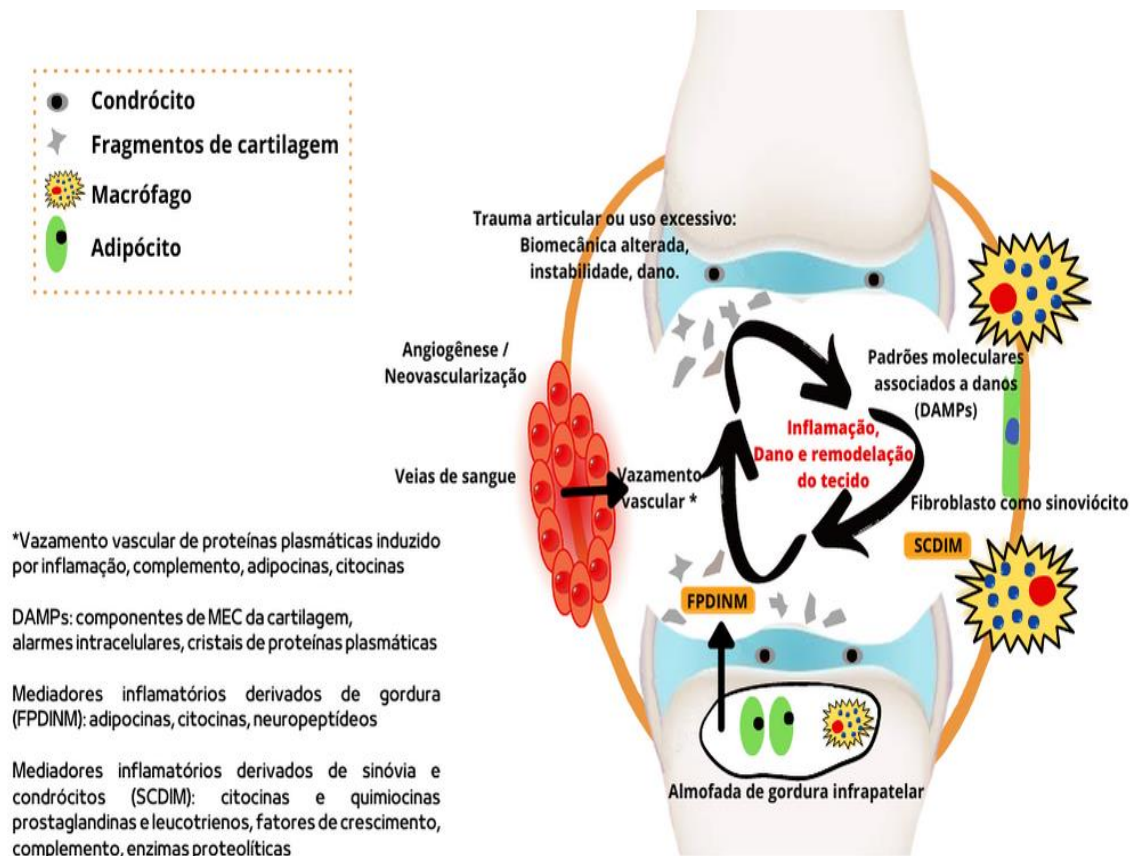
-2, -5, -7, -8], catepsinas (B, K e L) e cascata de complemento (RAHMATI et al., 2016; LAMBERT et al., 2020). Durante a patogênese de OA, a ativação do sistema imunológico, seja inato ou adaptativo, está fortemente associada à inflamação sistêmica de baixo grau (LAMBERT et al., 2020).

A produção aguda e crônica de mediadores inflamatórios promove degradação da cartilagem direta ou indiretamente por meio da indução de enzimas proteolíticas, que terminam por amplificar um ciclo vicioso de ativação imune inata na doença (NICOLA, 2020). Esse processo é iniciado e conduzido na membrana sinovial especialmente por DAMPs liberados na MEC para a cavidade articular durante a degradação da cartilagem. Esses fragmentos liberados na cavidade sinovial estimulam a produção e liberação de mediadores inflamatórios (como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e os próprios DAMPs) pelas células sinoviais (macrófagos e fibroblastos) no líquido sinovial. As ações desses mediadores inflamatórios ativam os condrócitos produtores de metaloproteinase, que resultam em um ciclo vicioso entre a cartilagem e a membrana sinovial (figura 10) (LAMBERT et al., 2020).

Os neutrófilos e monócitos transmitidos pelo sangue migram para o local de inflamação por quimiotaxia, passando através das células endoteliais por extravasamento; os mastócitos e macrófagos aumentam a permeabilidade vascular pela liberação de histamina, leucotrienos e as prostaglandinas. Os neutrófilos infiltrados criam um ambiente citotóxico por um processo denominado degranulação, levando a liberação de substâncias químicas tóxicas como espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), além de várias proteinases, que provocam eventos típicos da inflamação como vermelhidão, inchaço, calor, dor e perda de função (BISHNOI et al., 2016).

Além disso, ocorre regulação negativa do agregamento (proteoglicanos da cartilagem articular) e do colágeno tipo II, bem como a regulação positiva da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) em tecidos articulares inflamados, levando à produção elevada de prostaglandinas, como PGE₂, na articulação (BISHNOI et al., 2016). Em geral, os mediadores inflamatórios, estresse mecânico e oxidativo corroboram para comprometer a função e a viabilidade dos condrócitos, reprogramando-os para sofrer diferenciação hipertrófica e “senescência” precoce, tornando-os ainda mais suscetíveis aos efeitos dos mediadores pró-inflamatórios e pró-catabólicos (MOBASHERI; BATT, 2016).

Figura 10. Mecanismo de inflamação em OA



Fonte: Adaptada de BISHNOI et al., 2016.

3.3.4 Tratamento

O gerenciamento da OA envolve abordagens farmacológicas e não farmacológicas, e quando estes não respondem adequadamente ao alívio dos sintomas, a cirurgia de substituição da articulação é considerada. No entanto, este último é um procedimento invasivo e está associado a eventos adversos graves mais significativos, como trombose venosa profunda e infecção (YUSUF, 2016; GHOURI; CONAGHAN, 2020). Devido à natureza crônica da doença os estudos prospectivos com fármacos que podem modificar a estrutura articular, reduzir a dor e aumentar a função da articulação de forma segura continua sendo medidas desejadas para o manejo da OA, especialmente, nos estágios iniciais da doença, antes de grandes alterações estruturais e funcionais na unidade osteocondral (GOLDRING; GOLDRING, 2016).

Até o momento a farmacoterapia para OA apresentou pouca progressão nas últimas décadas, principalmente para o paracetamol, anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) tópicos e orais, corticosteroides e opioides, que são amplamente usados como medidas

paliativas para alívio dos sintomas da OA. Além disso, nenhum desses medicamentos se mostraram capazes de modificar a progressão da OA e prevenir a incapacidade de longo prazo. Também, o uso prolongado desses agentes aumenta consideravelmente as chances de efeitos adversos graves com o tratamento, como toxicidade gastrointestinal, cardiovascular e renal (STEINMEYER et al., 2018). A Food and Drug Administration (FDA) considerou a OA como uma doença grave com necessidades médicas ainda não atendida (LATOURTE et al., 2020). Dessa forma, o estudo com novos tratamentos se faz necessário para o melhor manejo da doença e como forma de atender às necessidades individuais dos pacientes com OA.

As drogas modificadoras da doença osteoartrite (DMOAD) visam modificar a fisiopatologia subjacente da OA e aliviar o dano estrutural para prevenir incapacidade a longo prazo. São consideradas promissoras no avanço das intervenções farmacológicas na OA. Atualmente, estudos em fase clínica têm demonstrado potenciais modificadores da doença (DMOAD), e diversos alvos estão sendo explorados para melhor controle da OA. Entre os vários agentes farmacológicos estudados no âmbito das DMOADs pode-se citar: tanezumab (2,5 e 5 mg) e fasinumab (1, 3, 6 ou 9 mg) (DAKIN et al., 2019; SCHNITZER et al., 2019); fator de crescimento de fibroblasto humano recombinante-18 (rhFGF18, 100 µg) (ROEMER et al., 2016); inibidor da via Wnt (lorezivint, 0,23 mg) (YAZICI et al., 2019); corticosteróide (TA-ER, 32 mg) (CONAGHAN et al., 2018); e condrócitos humanos halogênicos geneticamente modificado que expressam TGF-β1 (TissueGene-C) (KIM et al., 2018).

Os tratamentos não farmacológicos também são recomendados para controlar os sintomas e prevenir ou retardar a progressão da OA, conforme demonstrado por ECRs (SHARMA et al., 2018; KROON et al., 2018). Todas as diretrizes de manejo apoiam o uso desta modalidade como terapia inicial, mas também durante a progressão da doença, esta incluem dieta e perda de peso, fisioterapia, exercícios físicos, treinamentos de força, exercícios aquáticos (hidroterapia), acupuntura, dispositivos ortopédicos, estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS), abordagens psicológicas (entender a doença), além de métodos cirúrgicos, como desbridamento artroscópico (remoção da cartilagem solta intrarticular, tecido sinovial inflamado e osteófitos da articulação) e substituição total da articulação (VANCE et al., 2014; YUSUF, 2016; SOUZA et al., 2018; CRAMP, 2019).

3.4 Inflamação e Dor

3.4.1 Mediadores da Inflamação

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico a estímulos prejudiciais que protege o corpo de possíveis danos causados por infecções, compostos tóxicos ou irradiação. O processo de atenuação da inflamação envolve a resolução da inflamação aguda, mas quando esta não é controlada de forma adequada, pode se tornar crônica e, eventualmente, resultar em doenças inflamatórias imunomediadas (ex. artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, psoríase, asma, vasculite e etc) (CHEN et al., 2018). Em resposta à lesão provocada, iniciam-se eventos intrinsecamente benéficos para curar os tecidos afetados, envolvendo o recrutamento de células inflamatórias e ativação de proteínas plasmáticas para atuarem no processo de reparação, regeneração e eliminação do agente agressor (SUGIMOTO et al., 2016). Contudo, apesar de extremamente necessário para a proteção do corpo, à medida que o reparo ocorre de maneira exacerbada, o processo inflamatório pode se tornar prejudicial e atacar o próprio organismo, levando a reações contra as próprias células e tecidos. Esses eventos resultam em distúrbios e doenças autoimunes, que são condições pelas quais o próprio sistema imunológico é incapaz de diferenciar entre tecido suadável e antígenos potencialmente prejudiciais, como a artrite reumatoide, fibrose pulmonar, psoríase e lúpus eritematoso sistêmico (ANGUM et al., 2020).

De modo geral, a depender do tempo de exposição ao agente agressor, bem como das características patológicas do local inflamado e os diferentes tipos de mecanismo de resposta, o processo inflamatório pode ser de dois tipos: agudo ou crônico (CHEN et al., 2018). A inflamação aguda (1 a 2 semanas) se caracteriza por uma resposta adaptativa imediata com especificidade limitada causada por vários estímulos como infecções e danos ao tecido, apresentam diversas manifestações clínicas como: dor, eritema, hiperalgesia, edema e perda de função da área lesada (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2020). O principal objetivo dessa resposta é a eliminação imediata do agente causador da inflamação (CHEN et al., 2018). No entanto, caso essa infecção não tenha sido sanada, o processo inflamatório irá persistir, e evoluir para um quadro de inflamação crônica (superior a 3 meses). Nesta fase que o processo inflamatório adquire novas características de acordo com os mediadores celulares envolvidos (PAHWA et al., 2021).

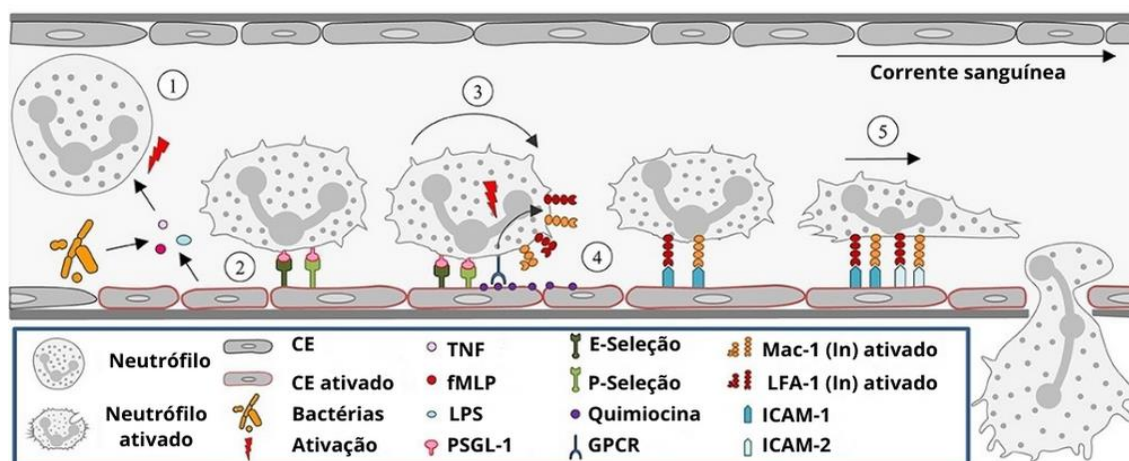
O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro, este sistema é ativado por padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) liberados por micro-organismos invasores. DAMPs e PAMPs estimulam células sentinela (ex. mastócitos, macrófagos e células dendríticas) para a ativação de uma cascata de eventos, incluindo o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, até que o processo inflamatório seja resolvido (MAAS et al., 2018). A inflamação aguda é dividida em duas fases: vascular e celular. As respostas que ocorrem na microvasculatura aparecem em poucos minutos após a lesão do tecido ou infecção microbiana. A estimulação de nociceptores resulta na liberação dos neuropeptídeos [substância P (SP) e neurocinina A (NKA)]. Esses neuropeptídeos, por sua vez, medeiam a vasodilatação local, por meio da retração das células endoteliais, o que resulta no aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e aumento do extravasamento de líquido para os tecidos (MAZARÍO; BASBAUM, 2007; ONAGA, 2014).

Os macrófagos residentes e mastócitos intercedem o reconhecimento inicial no local da lesão, liberam histamina e produzem mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, endotoxinas microbianas contendo grupos N-formil metionil amino-terminais, sistema de cininas 41 (bradicinina), fragmento de complemento C5a, leucotrienos B e fator ativador de plaquetas (PAF), que podem estimular intensa infiltração de leucócitos em poucos minutos (BAJIC et al., 2013; MAAS et al., 2018). Entre os leucócitos, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias recrutadas no local da inflamação aguda (ROSALES et al., 2018). Ademais, há produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo Interleucina (IL) -1 β , IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e IL-12, sendo estas as secreções mais notáveis incluídas nessas reações, que levarão a ativação e produção de células imunes, bem como à liberação de outras citocinas (ABDULKHALEQ et al., 2018). Os eventos de recrutamento dos leucócitos para o local de inflamação ou sítio de lesão é definido em etapas: captura, rolagem, parada, adesão, rastreamento e migração transendotelial (Figura 11) (MAAS et al., 2018).

Os eventos celulares abrangem a captura sucessiva, rolamento e firmamento de uma adesão ao endotélio microvascular, são mediados por meio de moléculas de adesão celular (CAMs), mediadores quimiotáticos e citocinas (TNF- α , IL-1, IL-8, IL-12, IFN- γ (Interferon-gama) (MAAS et al., 2018). A ativação da migração é induzida principalmente por histamina ou citocinas inflamatórias, que se originam de mastócitos e macrófagos teciduais (MOMMERT et al., 2021). As CAMs são moléculas de superfície

celular envolvidas na migração transendotelial para locais inflamatórios. Essas CAMs incluem moléculas de adesão intracelular (ICAM) -1, ICAM-2, integrinas e selectinas (ABDULKHALEQ et al., 2018).

Figura 11. Migração dos leucócitos através do endotélio vascular. Fases: 1 e 2) captura; 3) rolagem, 4) parada, 5) adesão e migração transendotelial.



Fonte: Adaptado de MAAS et al., 2014.

Estas moléculas de adesão podem ser agrupadas em três famílias moleculares: (1) selectinas, sendo E-selectina expressa no endotélio, P-selectina expressa tanto em células endoteliais quanto em plaquetas, e L-selectina expressas constitutivamente na superfície dos leucócitos (MCEVER R. P., 2015); (2) integrinas, uma família de glicoproteínas heterodímeras transmembranares responsável pela adesão dos leucócitos durante a migração e transdução de sinais entre as células, são compostas pela associação não covalente entre as suas subunidades α (120 a 180kDa) e β (90 a 110kDa), podem reconhecer múltiplos ligantes, incluindo integrinas $\beta 2$ (CD11/CD18) e MAC1, também conhecida como integrina- αM e CD11b (HYNES 1992) e; (3) imunoglobulinas, principais ligantes das integrinas, consideradas moléculas de apoio no processo de diapedese dos leucócitos. Compõe esta classe a molécula de adesão intercelular 1-5 (ICAM 1-5), molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão seletiva de células endoteliais (ESAM), moléculas de adesão 43 juncional (JAMs) e molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1) [MULLER, 2015].

A ativação de células endoteliais (CEs) envolve a regulação positiva de P- e E-selectina. Os neutrófilos expressam L-selectina e outros ligantes, como P-selectina glicoproteína ligante 1 (PSGL-1), CD44 e E-selectina ligante-1, que se ligam em alta taxa

a P- e E- selectinas presente nas CEs, permitindo que os neutrófilos sejam capturados. Devido a essa ligação, os neutrófilos podem se mover ao longo do endotélio (rolamento) (HIDALGO et al., 2007). Os quimioatraentes são componentes chaves na cascata de recrutamento de neutrófilos, pois essas moléculas contribuem para a ativação de neutrófilos, e são necessários para uma parada firme e orientação do neutrófilo até o local da inflamação. Os quimioatraentes respondem de maneira hierárquica, preferindo “alvos finais” (por exemplo, N-formil-metionina-leucina-fenilalanina (fMLP), C3a e C5a, respectivamente) ao invés de atrativos “intermediários” [por exemplo, quimiocinas (motivo CXC) ligante 1 (CXCL1), CXCL2 e leucotrieno B4 (LTB4)] (MAAS et al., 2018).

Em geral, os neutrófilos fazem migração transendotelial via junções endoteliais (via paracelular, ~ 90%) em vez de diretamente através da CE (diapedese transcelular, ~ 10%) (MAAS et al., 2018). Depois que os neutrófilos atravessam a barreira endotelial, eles precisam cruzar a lâmina basal subendotelial e o tecido intersticial circundante para chegarem ao local da inflamação. Este processo é geralmente mais demorado do que migração transendotelial (MULLER, 2013). Os neutrófilos se movem entre a superfície abluminal das CEs e a lâmina basal em busca de áreas que são depositadas com baixa densidade de colágeno IV e laminina (BURTON et al., 2011). A inflamação é finalizada quando ocorre a eliminação do agente infeccioso, a homeostasia do tecido inflamado é reestabelecida e os mediadores inflamatórios são inibidos ou reduzidos. Porém, caso a progressão inflamatória seja desfavorável devido a persistência do patógeno, poderá haver uma cronificação e evolução do processo inflamatório (SUGIMOTO et al., 2016).

3.4.2 Dor Inflamatória

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável que está ligada a danos reais ou potenciais aos tecidos, tem o único propósito de notificar o mecanismo de defesa do organismo para reagir a um estímulo, a fim de evitar maiores danos ao tecido (DEUIS et al., 2017). Devido ser uma sensação complexa, a dor é considerada uma sensação subjetiva e pessoal, portanto, impossível encontrar uma definição ou interpretação definitiva e satisfatória (KLAUMANN et al., 2008). A dor é iniciada pela ativação de neurônios somatossensoriais chamados nociceptores, estes inervam a pele, córnea, articulações, ossos, trato geniturinário, trato gastrointestinal, músculos e tecidos viscerais profundos. Estes nociceptores detectam estímulos inflamatórios nocivos através da expressão de sensores moleculares em seus terminais nervosos periféricos, como

canais de potencial de receptor transiente (TRP) e receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (BARAL et al., 2020).

A sensibilização periférica acontece normalmente após lesão de nervo periférico, lesão de tecido e inflamação (WEI et al., 2019). Mediadores inflamatórios liberados do local da lesão ou inflamação do tecido podem ativar e sensibilizar os neurônios sensoriais periféricos, resultando em sensibilização periférica (JI et al., 2019). Um fenômeno de sensibilização semelhante que ocorre no sistema nervoso central é chamado de sensibilização central, que pode ser inicialmente induzida por sensibilização periférica, ambas juntas produzem a dor neuropática e dor inflamatória refletida como alodinia e hiperalgesia (ASHMAWI. et al., 2016).

A sensibilização da dor normalmente leva a condições clínicas como alodinia (percepção de um estímulo não nocivo como doloroso) e hiperalgesia (resposta dolorosa excessiva produzida por um estímulo normalmente nocivo) (SANDKÜHLER, 2009). Contudo, nem todos os estímulos nocivos de alto limiar (químicos, físicos ou mecânicos) detectado por neurônios sensoriais periféricos especializados (nociceptores) levam a uma experiência dolorosa (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). Deste modo, a dor abrange dois componentes: a nocicepção e a percepção. A nocicepção se caracteriza pela percepção dos sinais de dor pelo sistema nervoso central, engloba quaisquer estímulos, sejam eles mecânicos, térmicos, elétricos ou químicos, que tenham o potencial de causar danos ao tecido (ARMSTRONG; HERR, 2021). Já a percepção, se caracteriza pela capacidade de integração do fenômeno doloroso com respostas urgentes para alívio da dor, que são controladas por fatores emocionais, psicológicos, culturais, religiosos, experiência anterior a dor e histórico de vida do indivíduo (DEKKERS, 2017; ELLISON, 2017).

Em geral, a nocicepção e antinocicepção são mais indicadas para avaliar a dor em animais, enquanto a analgesia é mais empregada para humanos (VERRI et al., 2006). A dor pode ser subdividida em dor aguda e crônica (FEIZERFAN et al., 2014). A dor aguda começa em resposta a uma lesão, doença ou inflamação tecidual, por ser uma resposta de curta duração, sua evolução natural é a remissão. Porém, devido à ativação de várias vias neuronais durante um longo período de tempo, o caráter da dor pode mudar e a dor aguda pode se tornar crônica (BARAL et al., 2020). A estimulação nociva sustentada ou recorrente pode ocorrer em doenças como a OA e artrite reumatoide (AR), onde mudanças na articulação podem permitir que a sustentação de peso normal produza forças suficientes para ativar os nociceptores (PRECSOTT; RATTÉ, 2017). A dor crônica representa um problema clínico de grande importância, pois afeta até 20% da

população em geral (REID et al., 2011). Além disso, é um sintoma de uma variedade de diferentes patologias, e uma compreensão dos mecanismos nociceptivos e da neurobiologia da percepção da dor são necessários para tratar melhor as condições de dor crônica (CARR; ZACHARIOU, 2014).

A dor pode ainda ser classificada quanto a sua origem fisiopatológica: nociceptiva, neuropática, inflamatória e psicogênica. A dor nociceptiva atua como um importante sistema de alarme, pode ser oriunda de receptores da pele e dos músculos esqueléticos como na osteoartrite, ou de estruturas mais profundas atingindo as vísceras, como na pancreatite. A dor nociceptiva continua apenas enquanto o estímulo nocivo for mantido (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010). A dor neuropática é conhecida como dor nos nervos, resulta de uma lesão no sistema nervoso somatossensorial. Esta dor pode ser periférica (envolvendo o sistema nervoso periférico, como lesões traumáticas da medula espinhal) ou central (envolvendo o sistema nervoso central, como no acidente vascular cerebral) (CSHMIDT et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2016). Já a dor psicogênica, é a dor física causada por alguma disfunção neuropsíquica emocional, independe de psicopatologia associada (ex. dor nas costas, dor de estômago, ansiedade e depressão). A medicina se refere a dor psicogênica como uma dor crônica, e sua origem pode estar relacionadas ao estresse, conflitos emocionais, problemas psicossociais ou vários transtornos mentais (KATZ et al., 2015).

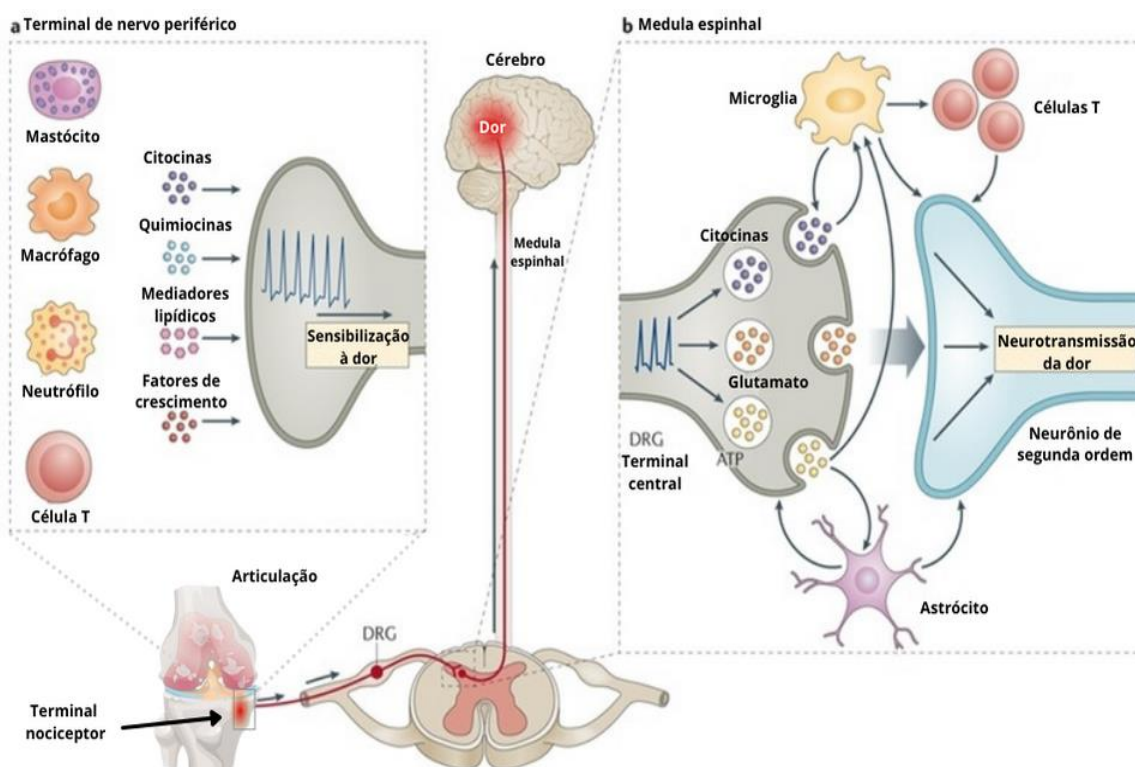
A dor inflamatória ocorre na presença de estímulos nocivos resultante de dano ao tecido, onde o sinal ativa rapidamente neurônios aferentes sensoriais primários (nociceptores) no tecido periférico, e envia uma mensagem ao cérebro para eliciar a sensação de dor (SU et al., 2014). Os locais dos tecidos danificados ou infectados geralmente exibem respostas inflamatórias como vermelhidão, inchaço, calor e dor persistente, bem como mediadores endógenos liberados dos tecidos que aumentam o extravasamento dos vasos e atraem células imunes para o local de inflamação (HANNOODEE; NASURUDDIN, 2020).

A presença de mediadores inflamatórios pode ativar diretamente os nociceptores, provocando dor ou modulando a sensibilidade dos nociceptores primários, levando a uma reação aumentada aos estímulos. Por isso, estímulos como um leve toque são percebidos como dolorosos (alodinia), ou estímulos normalmente sentidos como dolorosos causam dor de maior intensidade (hiperalgesia) (JENSEN; FINNERUP, 2014). A dor inflamatória pode ser modelada em animais usando incisão na ferida ou injeção de estímulos inflamatórios, como adjuvante completo de Freund (CFA), lipopolissacarídeos (LPS) ou

iodoacetato monossódico (MIA) (YÜCEL et al., 2017; NAVARRO-ALVAREZ et al., 2018; BRYK et al., 2021).

Durante a inflamação, as células imunes (mastócitos, macrófagos / monócitos, neutrófilos e células T) liberam mediadores endógenos [Prostaglandina E 2 (PGE 2), bradicinina (BK), serotonina [5-hidroxitriptamina (5-HT)], histamina, ATP, citocinas (TNF- α , IL-1 β , IFN γ e quimiocinas), espécies reativas de oxigênio (EROs)] que atuam nos terminais nervosos periféricos dos neurônios nociceptores. Os potenciais de ação são transduzidos através dos gânglios da raiz dorsal (DRG) para a medula espinal e retransmitidos para o cérebro para serem processados como dor (figura 12a). No corno dorsal da medula espinal, as interações neuroimunes contribuem para os mecanismos centrais da dor. Os aferentes nociceptivos primários DRG (pré-sinápticos) liberam glutamato, ATP e quimiocinas de seus terminais centrais, mediando a neurotransmissão para neurônios pós-sinápticos de segunda ordem que transmite sinais para o cérebro. As células T, microglia e astrócitos também produzem citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento que atuam nos terminais nervosos pré e pós-sinápticos para aumentar a neurotransmissão e mediar a sensibilização da dor central (figura 13b) (BARAL et al., 2020).

Figura 12. Interações neuro-imunes em terminais nervosos periféricos e medula espinal na dor



Fonte: Adaptado de BARAL et al., 2020.

O tratamento farmacológico para dor é complexo e requer uma prescrição individualizada para garantir um melhor resultado clínico. Em geral, as opções de tratamentos farmacológicos para a dor são antigas e ainda pouco satisfatórias. Os principais medicamentos para a dor se enquadram em quatro categorias: (1) analgésicos fracos, (2) medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), (3) opioides e (4) medicamentos adjuvantes (VARRASSI et al., 2019). Dentre essas categorias, os AINES são considerados medicamentos de primeira escolha e eficazes para a dor inflamatória. Seu mecanismo de ação decorre do bloqueio da produção de prostaglandinas (PGs) ao inibir as ciclo-oxigenases (COX1 e COX2), essenciais para a síntese de PGs (GUNAYDIN; SIRRI BILGE, 2018).

Dentre os AINES disponíveis, o ibuprofeno, o diclofenaco e o cetoprofeno são os mais frequentemente utilizados, e suas indicações primárias incluem dor pós-operatória, dor traumática, artrite aguda, AR, OA e outros distúrbios reumáticos (VARRASSI et al., 2019; WOLFF et al., 2021). Contudo, os tratamentos com AINEs apesar de serem eficazes para o alívio da dor, não interrompem a progressão da doença. Além disso, o uso de AINES a longo prazo estão associados a efeitos adversos graves, incluindo distúrbios cardiovasculares e renais (HAYASHI et al., 2021), porém seu uso tópico tem sido cada vez mais recomendado nas diretrizes de tratamento (ZENG et al., 2018). Em virtude disso, a busca por tratamentos mais eficazes, com baixo custo e menos efeitos adversos são necessários para o melhor controle da dor na OA.

3.5 Modelos de Osteoartrite

Os modelos para o estudo da OA podem ser categorizados em modelos *ex-vivo* e *in-vivo*. Os modelos *ex vivo* incluem cultura de monocamada, co-cultivo de células, cultura tridimensional (3D) e cultura baseada em explantes. Esses modelos podem ser úteis para investigações preliminares sobre mecanismo de ação, porém, podem apresentar alto custo e não reproduzir fielmente as condições reais do tecido. Vários modelos *in-vivo* foram desenvolvidos para OA, estes podem ser categorizados em modelos induzidos ou espontâneos. Os modelos induzidos referem-se a modelos em que a OA (ou características semelhantes a OA) foram induzidas quimicamente ou cirurgicamente, enquanto os modelos espontâneos, são subcategorizados em modelos de ocorrência natural e modelos geneticamente modificados que desenvolvem OA (COPE et al., 2019; SAMVELYAN et al., 2020).

Foram desenvolvidos pelo menos 18 modelos animais para estudar as características da fisiopatologia da OA, incluindo desde peixe-zebra, roedores (camundongos e ratos), porquinhos-da-índia e coelhos, usados frequentemente para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas e estudos iniciais para triagem de medicamentos, a grandes organismos modelos, como cães, cabras, ovelhas e cavalos, usados frequentemente para estudar o processo patológico da OA devido à progressão mais lenta da doença e semelhanças anatômicas com os humanos (SAMVELYAN et al., 2020). Com base ainda na etiologia da doença, a OA pode ser classificada em primária ou idiopática e OA secundária. A primeira apresenta ocorrência natural, afeta uma articulação (localizada) ou três ou mais articulações (generalizada), enquanto a segunda está associada a uma variedade de causas e fatores de risco que levam à doença, incluindo trauma, osso metabólico e distúrbios congênitos (COPE et al., 2019). A OA secundária é investigada pela indução de lesões diretas ou indiretas nas articulações, através da utilização de modelos invasivos (induzidos cirurgicamente e quimicamente) e não invasivos (fratura do platô tibial intra-articular, compressão tibial da cartilagem articular cíclica e ruptura do ligamento cruzado anterior (LCA) via sobrecarga de compressão tibial) (SAMVELYAN et al., 2020).

Os modelos invasivos são normalmente utilizados para estudar a patogênese da OA pós-traumática e avaliar a eficácia terapêutica de medicamentos/potenciais agentes terapêuticos para a doença. Estes modelos apresentam rápida progressão, prazos de estudo mais curtos, indução de lesões graves, bem como reprodutibilidade e custo relativamente baixo em comparação com os modelos animais espontâneos, o que o torna um modelo amplamente explorado para o estudo da OA animal (LAMPROPOULOU-ADAMIDOU et al., 2014).

A injeção intra-articular do iodoacetato monossódico (MIA) é um dos modelos animais invasivos (induzido quimicamente) mais bem estabelecido como um substituto para o estudo da OA em humanos. O MIA é um inibidor metabólico que decompõe a via da glicólise aeróbia celular e, conseqüentemente, induz a morte celular ao inibir a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) nos condrócitos (LAZAREV et al., 2020).

A injeção intra-articular de MIA provoca redução no número de condrócitos e alterações histológicas e morfológicas na cartilagem articular, membrana sinovial e cápsulas articulares, eventos semelhantes a algumas características observadas nas fases

da OA humana. Também, são produzidas lesões na cartilagem com perda da matriz de proteoglicanos, inflamação sinovial e alterações ósseas subcondrais e funcionais (MORAIS et al., 2016; SULAIMAN et al., 2021). Após a injeção do MIA, os animais apresentam um comportamento de dor persistente, com suporte de peso alterado nos membros posteriores e desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica (alodínia) (PITCHER et al., 2016). Medições estáticas podem ser empregadas pela análise da marcha em uma esteira ou pela análise da passarela em animais que se movem livremente (DEUIS et al., 2017). Os modelos com MIA são bastante indicados às terapias convencionais de alívio da dor, indicando que eles podem ser úteis para discernir abordagens terapêuticas (PITCHER et al., 2016).

Após a aplicação do MIA, são observadas algumas alterações, no 1º ao 3º dia os condrócitos estão encolhidos e os núcleos fragmentados com algumas áreas de degeneração. Nos estágios iniciais da progressão do modelo ocorrem sinais de inflamação, como expansão da membrana sinovial e infiltração de macrófagos, neutrófilos, mastócitos, linfócitos e células plasmáticas, além de elevação dos níveis de citocinas [(Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) e Interleucina 6 (IL-6)] e espécies reativas de oxigênio (ROS) que diminuem no 7º dia (ORITA et al., 2011; VALENTE et al., 2019). Em estágios mais avançados do modelo (entre o 10º-14º dia), observa-se uma degradação progressiva da cartilagem e remodelamento do osso subcondral; e no 14º dia, áreas totais de lesão de cartilagem são caracterizadas, com presença de células osteoclásticas, evidências de angiogênese osteocondral e neovascularização (VALENTE et al., 2019). Em um estudo Bove et al (2006) relataram a coexistência de um estado de dor inflamatória e dor neuropática iniciada por mediadores inflamatórios e lesão nervosa, respectivamente.

A produção de mediadores inflamatórios contribui ainda mais para a patogênese de OA, aumentando a degradação da cartilagem articular e induzindo hiperalgesia (EITNER et al., 2017). A citocina TNF- α ativa neurônios sensoriais por meio de seus receptores e inicia uma cascata de reações inflamatórias por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 e IL-6 (WANG et al., 2015). Nas células articulares IL-1 β e TNF amplificam e perpetuam o processo inflamatório da doença, induzindo a produção de IL-6 e quimiocinas, como IL-8, proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e ligante 5 de quimiocina (motivo C-C) (também conhecido como RANTES). Além disso, estimulam a produção de genes que codificam óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fosfolipase A2 solúvel, ciclooxigenase 2 (COX₂),

prostaglandina E sintase-1 microssomal (mPGES-1), e estimulam a liberação de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E₂ (PGE₂) (KAPOOR et al., 2011).

Por sua vez, o NO e PGE₂ contribuem para inflamação, destruição articular e aumento da ativação e produção de MMPs, o que leva a inibição da síntese de macromoléculas anabólicas, como colágeno tipo II e proteoglicano, promovendo a apoptose de condrócitos (ANSARI et al., 2020). Ademais, induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente NO e o ânion superóxido, que contribuem ainda mais para os efeitos degradantes da cartilagem (ZAHAN et al., 2020), além de regular negativamente a expressão de enzimas antioxidante que eliminam ROS, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (LEPETSOS; PAPAVALASSIOU, 2016). Esses efeitos são mediados pela ativação de várias vias inflamatórias, incluindo principalmente c-Jun N-terminal cinase (JNK) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) P38 (também conhecida como vias da quinase regulada por sinal extracelular), fator nuclear κ B (NF κ B) e wnt/ β catenina (KAPOOR et al., 2011).

Devido ao potencial terapêutico de polissacarídeos sulfatados, este trabalho visou a aplicação de sulfato de condroitina da traqueia bovina (CS-A) e da cartilagem de tubarão (CS-C) para avaliar seu efeito terapêutico em modelo de OA induzido por MIA em camundongos C57BL/6, assim como o FCS extraído da parede corporal de *H. grisea* para avaliar seu potencial anti-inflamatório e analisar possíveis mecanismos de ação frente ao modelo crônico de OA.

4 ARTIGO 1

Artigo a ser submetido a revista *European Journal of Pharmacology* (F.I. 4.432) de classificação no Qualis da CAPES B1 na área de avaliação CB1 da PPGCB.

Efeito terapêutico de diferentes sulfatos de condroitina em osteoartrite induzida por iodoacetato monossódico

Vitor Alfredo de Santana Silva¹, Kátia Alves Ribeiro¹, Silvania Tavares Paz², Ângela Magalhães Vieira³, Maria Tereza dos Santos Correia¹, Mariana de Sá Pereira⁵, Paulo Antônio de Souza Mourão⁵, Rafael Matos Ximenes⁴, Maria das Graças Carneiro-da-Cunha¹, Paulo Antônio Galindo Soares¹

¹Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

²Laboratório de Histotecnologia – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

³Biotério de Criação – Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/IAM)

⁴Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

⁵Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Resumo

Neste trabalho, três tipos diferentes de sulfato de condroitina (CS), extraídos da traqueia bovina (CS-A), cartilagem de tubarão (CS-C) e da parede corporal do pepino-do-mar *Holothuria grisea* (fucosil condroitina sulfato - FCS), foram avaliados quanto o seu efeito terapêutico em um modelo *in vivo* de osteoartrite (OA) induzida por iodoacetato monossódico na articulação femoropatelar de camundongos C57BL/6. Após indução da OA, os camundongos foram divididos aleatoriamente em grupos (n = 5) de acordo com o tratamento oral diário durante 28 dias: (1) Sham (falso operado, salina 0,9 % v.o.); (2) controle negativo (doente, salina 0,9% v.o); (3) CS-A (doente, 100mg/kg v.o); (4) CS-C (doente, 100mg/kg v.o) e (5) FCS (doente, 100mg/kg v.o). A eficácia dos tratamentos foi avaliada através da mensuração da alodinia, atividade motora, migração de leucócitos, atividade anti-inflamatória, análise morfométrica e escore histopatológico OARSI. Durante 28 dias de experimentação, o CS-A (100 mg/kg), CS-C (100 mg/kg) e FCS (100 mg/kg) conseguiram induzir analgesia, aumentar a atividade motora e reduzir a migração de leucócitos de camundongos osteoartíticos de forma significativa em relação ao controle negativo (salina 0,9 %). Além disso, a morfometria revelou um aumento

significativo da cartilagem sobre a tíbia para os animais tratado com CS-A e FCS, cujos resultados foram confirmados pela análise histopatológica OARSI, mostrando uma redução da gravidade da OA em relação ao controle negativo. Contudo, apenas CS-A (100 mg/kg) aumentou significativamente os níveis de IL-10, sugerindo que esta molécula possui uma atividade protetora contra a degeneração da cartilagem através da regulação da inflamação. Apesar de preliminares, os mecanismos envolvidos no tratamento com FCS precisam ser melhores investigados, visto que seu efeito protetor na OA foi semelhante ao apresentado para o CS-A.

INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma doença com terapias falhas na supressão do desgaste da cartilagem articular, que afeta mais de 250 milhões de pessoas no mundo (HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019). Esta doença pode afetar diferentes articulações, principalmente as dos joelhos, mãos, quadris e coluna (KOHN et al., 2016). Vários fatores de risco como trabalho físico excessivo e movimentos repetitivos têm sido associados com a OA. Contudo, a caracterização dos mecanismos celulares e moleculares que formam a base desse processo destrutivo, assim como seu diagnóstico e tratamento, ainda carece de maiores elucidações (MANCUSO et al., 2019). A etiopatogenia da OA é complexa e, provavelmente, multifatorial, associando-se ao envolvimento de mediadores inflamatórios, fatores genéticos, envelhecimento, obesidade, deformidades articulares ou lesões articulares, atividade ocupacional ou esportiva, densidade mineral óssea, deficiência de estrógeno e desregulação metabólica (MORA et al., 2018).

De acordo com WANG e HE (2018), a obesidade não só aumenta o estresse mecânico na cartilagem tibiofemoral, mas também leva a uma maior prevalência de OA em áreas que não suportam peso, uma vez que existe uma ligação entre obesidade e inflamação. Assim, os tecidos adiposos desempenham um papel crucial neste contexto, pois são a principal fonte de citocinas, quimiocinas e mediadores metabolicamente ativos denominados adipocinas, os quais demonstram regular as respostas imunes inflamatórias na cartilagem. Deste modo, pacientes obesos apresentam elevados níveis séricos de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL)-1 β e IL-6, todos produzidos por macrófagos derivados do tecido adiposo, confirmando seus importantes papéis na patogenia da OA. Além disso, TNF- α , IL-1 e IL-6 podem induzir a produção de outras citocinas, metaloproteinases da matriz (MMPs) e prostaglandinas e inibir a síntese de

proteoglicanos e colágeno tipo II, desempenhando, assim, um papel importante na degradação da matriz da cartilagem e na reabsorção óssea na OA.

Em geral, os mediadores inflamatórios, estresse mecânico e oxidativo corroboram para comprometer a função e a viabilidade dos condrócitos, reprogramando-os para sofrer diferenciação hipertrófica e “senescência ” precoce, tornando-os ainda mais suscetíveis aos efeitos dos mediadores pró-inflamatórios e pró-catabólicos (MOBASHERI; BATT, 2016). A dor induzida pelo movimento é um sintoma precoce característico da OA; no entanto, com a progressão da doença, uma dor contínua ou dor em repouso é a principal apresentação clínica (EITNER et al., 2017). O gerenciamento da OA envolve abordagens farmacológicas (AINES, opioides, corticosteroides e paracetamol) e não farmacológicas (dieta e perda de peso, abordagens psicológicas, fisioterapia, exercícios físicos, treinamentos de força, exercícios aquáticos (hidroterapia), acupuntura, estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) e dispositivos ortopédicos), e quando estes não respondem adequadamente ao alívio dos sintomas, a cirurgia de substituição da articulação (desbridamento artroscópico e substituição total da articulação) é considerada. As abordagens farmacológicas atuais são eficazes para o alívio da dor, contudo são conhecidos por apresentarem efeitos toxicológicos e, no caso da OA, não interrompem a progressão da doença (STEINMEYER et al., 2018).

Estudos sobre a progressão patológica da OA e comportamento da dor em ratos e camundongos têm sido amplamente descritos utilizando o modelo de OA induzida por iodoacetato monossódico (MIA), por serem úteis para discernir abordagens terapêuticas (STEVENSON et al., 2011; PITCHER et al., 2016). Isso porque o MIA injetado na cavidade da articulação do joelho interrompe a glicólise das células locais pela inibição da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Dessa forma, induz a morte de condrócitos pela perda da matriz proteoglicana e formação de lesões na cartilagem, resultando no comprometimento funcional da articulação semelhante as condições observadas na OA humana (VALENTE et al., 2019). Além disso, apresentam um comportamento de dor persistente, com suporte de peso alterado nos membros posteriores e desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica (alodinia) (PITCHER et al., 2016).

Por ser uma doença crônico-progressiva, a OA possui diferentes graus de gravidades, que requer várias opções de tratamento ao longo do curso da doença. Seu tratamento visa reduzir os sintomas e, em última análise, retardar a progressão da doença, o que pode, por sua vez, reduzir seu impacto na mobilidade e qualidade de vida do

paciente. Entre os diferentes agentes terapêuticos, destacam o sulfato de condroitina (CS), que é apoiado por vários graus de eficácia clínica (BRUYÈRE et al., 2019). O CS é um polissacarídeo sulfatado (PS) de peso molecular (Mw) entre 14-26 kDa para CS bovino, suíno e de frango, e 50-70 kDa para CS de tubarão e raia (VOLPI, 2007). São compostos por ácido glicurônico (GlcA) e N-acetilgalactosamina (GalNAc), com grupos sulfato em um ou mais dos grupos –OH em C4 e C6 da GalNAc e C2 e C3 do GlcA (BISHNOI et al., 2016). Nos últimos anos, o CS têm sido fortemente recomendado pela Sociedade Europeia para Aspectos Clínicos e Econômicos da Osteoporose, Osteoartrite e Doenças Musculoesqueléticas para o tratamento de pacientes com OA de joelho (BRUYÈRE et al., 2019). Contudo, devido as variações na composição e/ou pureza de formulações comerciais de CS, alguns estudos são controversos, necessitando maiores elucidações (KHWALDIA, 2019).

O Fucosil condroitina sulfato (FCS) tipo II presente na parede corporal do pepino-do-mar *Holothuria grisea* é um PS com Mw de 46,1 kDa e composto por uma cadeia central de ácido D-glicurônico e N-acetil-D-galactosamina, semelhante ao CS de vertebrados, porém com ramificações de L-fucose ligados na posição 3 do ácido glicurônico da unidade dissacarídica central (SOARES et al., 2018; FONSECA; MOURÃO, 2021). Estudos demonstraram que o FCS tipo II de *H. grisea* reduz o recrutamento de células inflamatórias para o sítio de lesão em diferentes modelos animais e são resistentes à degradação por condroitinase (BORSIG et al., 2007; MELO-FILHO et al., 2010). Contudo, até o presente momento, seu efeito no tratamento da OA ainda não foi estudado. Assim, devido ao potencial terapêutico do sulfato de condroitina na OA, este trabalho teve por objetivo avaliar a aplicação *in vivo* de diferentes tipos de sulfato de condroitina, extraídos da traqueia bovina (CS-A), cartilagem de tubarão (CS-C) e da parede corporal de *H. grisea* (FCS), no tratamento crônico da OA induzida por MIA em camundongos C57BL/6.

MATERIAS E MÉTODOS

Materiais

Os kits para dosagem de TNF- α , IL-6 e IL-10 foram obtidos da Invitrogen (EUA). O FCS foi isolado seguindo o método descrito por Soares et al. (2018). Os CSs (traqueia bovina e cartilagem de tubarão) foram obtidos da empresa farmacêutica Condrosulf®. O

Iodoacetato monossódico (MIA) foi obtido da SIGMA (U.S.A.). Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

Animais

Foram utilizados 48 camundongos C57BL/6 (machos) com 10 semanas de idade, provenientes do biotério da FIOCRUZ - Instituto Aggeu Magalhães (IAM/Recife/Brasil). Os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos em microisoladores, com livre acesso a água e comida, numa temperatura média de 23 ± 2 °C, obedecendo a ciclos de claro-escuro de 12 h, de acordo com a recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os animais foram ambientados durante uma semana antes do início dos experimentos. O protocolo deste estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) processo nº 0087/2019.

Modelo Experimental *in vivo* de Osteoartrite

O modelo *in vivo* de OA foi induzido através de uma única injeção intra-articular (i. art.) de MIA (1 mg/50 µL), na articulação femoropatelar da pata traseira direita, conforme descrito por GUZMAN et al., (2003). Os animais foram previamente anestesiados a 4 % de isoflurano a um fluxo de 0,5 L/min antes da indução da OA. Com o joelho depilado, o MIA foi injetado, e posteriormente a região foi massageada para garantir uma distribuição uniforme da solução. Depois da indução do modelo de OA, no dia 0, os camundongos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos ($n = 5/\text{grupo}$) de acordo com o tratamento diário de 28 dias: (1) grupo Sham (falso operado, 100 µL de salina 0,9 % v.o.); (2) grupo MIA (doente, 100 µL de salina 0,9 % v.o.); (3) grupo CS-A (doente, 100 µL de CS-A 100 mg/kg v.o.); (4) grupo CS-C (doente, 100 µL de CS-C 100 mg/kg v.o.); e (5) grupo FCS (doente, 100 µL de FCS 100 mg/kg v.o.). Nos dias 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 e 28, todos os grupos experimentais foram avaliados quanto a hipersensibilidade mecânica e função motora. Os demais testes, incluindo dosagem de IL-10, preparação histológica e coleta do lavado articular foram realizados ao final de 28 dias de tratamento (tempo de evolução do modelo crônico de OA).

Hipersensibilidade Mecânica (Alodinia)

Antes de cada análise, os animais foram previamente ambientados no aparato por 3 dias durante 1h para evitar comportamento agitado no compartimento de acrílico sobre

um piso de grade de arame, com livre acesso as patas por um investigador treinado (cego para alocação dos grupos). A hipernocicepção mecânica foi avaliada através do comportamento de retirada da pata do animal usando filamentos de *von Frey* (0.008, 0.02, 0.04, 0.07, 0.16, 0.4, 0.6, 1.0 g). Os filamentos de *von Frey* foram aplicados de forma perpendicular sobre a superfície plantar da pata posterior direita do animal, iniciando-se com filamentos de menor espessura e progredindo com pressão crescente até que seja percebido o comportamento nociceptivo do animal (“flinch” ou agitação, ou lambida da pata) segundo o modelo *up-down* descrito por (CHAPLAN et al., 1994). Uma pré-análise foi realizada como linha de base para cada animal antes da indução da OA. Para cada dia de análise, foram realizadas três medidas, com intervalos de três minutos, e a média±desvio padrão dos valores foi descrita como 50 % do limiar nociceptivo mecânico do animal.

Atividade Motora (Rotarod)

A atividade motora foi avaliada por meio de um aparelho Rotarod (EFF 412 para camundongos). Antes da indução da OA, os camundongos foram submetidos a um programa de treinamento durante três dias consecutivos para a obtenção de linha de base estável de desempenho. Durante esse período, os camundongos foram treinados a andar contra o movimento em um tambor giratório a uma velocidade constante de 5 rpm (rotações por minuto) por no máximo 300 segundos. Os camundongos que caíram durante o programa de treinamento foram colocados de volta no tambor rotativo ou excluídos após três quedas consecutivas. Após a indução da OA, nos dias de análise, os animais foram submetidos ao teste de atividade motora sob um programa de rampa de velocidade crescente (5 a 37 rpm) durante 300 segundos. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média±desvio padrão do tempo de permanência (em segundos) dos animais sobre o tambor.

Análise histopatológica e morfométrica

Ao final de 28 dias os animais foram eutanasiados por excesso de xilasina e cetamina para remoção cirúrgica de toda a articulação do joelho. O tecido foi acondicionado em frasco coletor esteril contendo formalina tamponada a 10% por 24h. Depois foram transferidos para uma solução de EDTA 10%, por aproximadamente 30 dias para a desmineralização, em seguida desidratado, deafinizado e emblocado em parafina. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E),

tricromico de gomory (TG) e azul de toluidina (AT). Para digitalização das imagens utilizou-se um microscópio de luz acoplado a uma câmera digital (Nikon H550L). A degeneração da cartilagem da tíbia e fêmur foi avaliada de acordo com o escore de gravidade estabelecido pela Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (OARSI) (PRITZKER et al., 2006) em uma escala de 0 a 24 pontos. Os escores histológicos foram avaliados conforme PRITZKER et al. (2006). Os parâmetros morfométricos foram analisados através da demarcação da área ocupada por condrócitos na cartilagem da tíbia e do fêmur em imagens digitalizadas na objetiva de 10x usando o software ImageJ. Cada medida de área foi realizada em triplicata e os resultados expressos como a média $\pm$ desvio padrão.

Dosagem de citocinas pró- e anti-inflamatórias

Ao final de 28^o dias a articulação femoropatelar do joelho traseiro direito foram removidas e acondicionada em tubos de eppendorf a -80°C. Posteriormente, as articulações foram pesadas e adicionadas em solução com tampão de extração [(50 mM de Tris Base; 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); 1 mM de Ortovanadato; 2 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); 1 % de Nonidet (IDEPAL) e H₂O destilada)]. Em seguida, as articulações foram trituradas e centrifugadas a 13.000 *g* por 10 minutos a 4 °C para separação do sobrenadante com as proteínas. Em seguida, as amostras foram diluídas 4x com tampão de extração e depois o resultado foi normalizado. A leitura da placa de ELISA foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Max 250, Molecular Devices, Minneapolis, MN, USA) a 450 e 570 nm, utilizando a diferença entre as absorbâncias para determinar as concentrações de TNF- α , IL-6 e IL-10 segundo uma curva-padrão. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão em pg/mg.

Coleta do Lavado Articular (Migração de Leucócitos)

A migração de leucócito foi determinada pela análise do líquido sinovial, conforme descrito por (BRESSAN et al., 2006). Ao final de 28 dias, sob anestesia, o lavado articular foi obtido através da injeção e aspiração de um volume final de 100 μ L de tampão PBS contendo 10 mM de EDTA. Alíquotas (20 μ L) foram adicionadas em eppendorfs e usadas para a contagem total de leucócitos. Em seguida, foi adicionado à suspensão 20 μ L de solução de Turck para contagem de células na câmera de Neubauer. A concentração de células/mL foi calculada de acordo com a seguinte equação: [(Número de leucócitos

contabilizados nas 4 camadas laterais da câmara de Neubauer) X (fator de diluição) X 10 (constante da câmara de Neubauer) / 4)]. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão.

Análise Estatística

Todas as análises dos gráficos foram realizadas através do programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc. U.S.A.). A análise estatística foi realizada através de teste *t* não paramétrico e análise de variância (ANOVA) seguida dos testes de Bonferroni e Dunnet para detecção das diferenças entre o grupo controle e os grupos tratados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

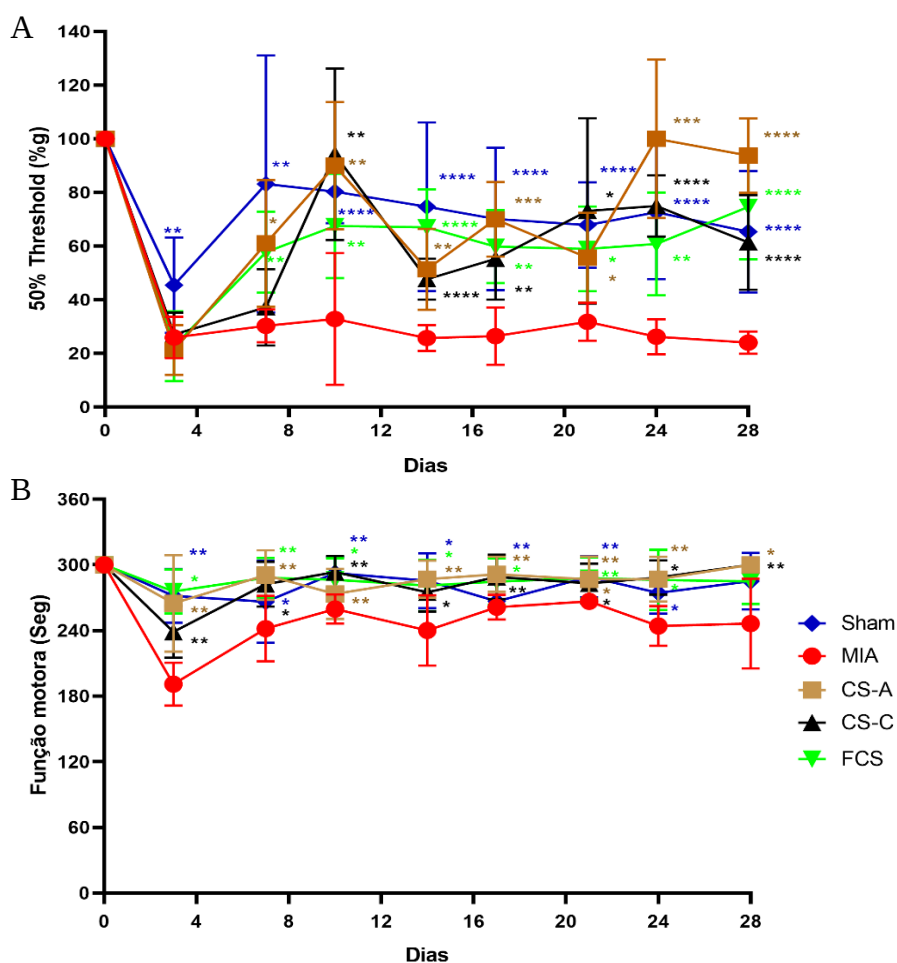
Analgesia e condicionamento motor

O modelo de OA induzido com MIA é um modelo experimental amplamente aceito para o estudo da osteoartrite em roedores, pois reflete um comportamento de dor persistente, com suporte de peso alterado nos membros posteriores e desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica (alodinia), semelhante a OA humana (PITCHER et al., 2016). Em nosso trabalho o grupo MIA reproduziu um comportamento de dor semelhante a OA após injeção intra-articular do MIA na dose de 1 mg. Resultado semelhante do comprometimento funcional ao longo de 28 dias de tratamento também foi reportado por PITCHER et al (2016).

A figura 1A representa o efeito analgésico dos diferentes tratamentos no limiar de hipernocicepção que foi caracterizado pelas mudanças na força mecânica necessária para provocar uma retirada da pata em resposta a um estímulo mecânico. Após a indução da OA, todos os grupos testes (MIA, CS-A, CS-C e FCS) exibiram uma redução no limiar de hipernocicepção de 100 % g para 25,94 $\pm$ 7,68, 21,21 $\pm$ 9,27, 27,08 $\pm$ 8,11 e 22,67 $\pm$ 13,05 % g, respectivamente, a partir do terceiro dia de tratamento. Apesar de o grupo Sham não ter recebido o adjuvante MIA, a injeção intra-articular de salina 0,9 % também foi capaz de reduzir o limiar de hipernocicepção para 45,44 $\pm$ 17,79 % g. Somente a partir do sétimo dia de tratamento que os animais tratados com CS-A e FCS apresentaram analgesia significativa quando comparado ao grupo MIA, uma vez que o limiar de hipernocicepção aumentou para 60,97 $\pm$ 23,67 e 57,71 $\pm$ 15,08 % g, respectivamente. Já o grupo CS-C só veio apresentar diferenças significativas a partir do décimo dia de tratamento, com um aumento no limiar de hipernocicepção para 94,22 $\pm$ 31,94 % g. O efeito anti-

hipernociceptivo significativo dos tratamentos com CS-A, CS-C e FCS perdurou até o final dos 28 dias. Por outro lado, para todos os dias de tratamento, o grupo MIA manteve um baixo limiar de hipernocicepção.

Fig. 1. Efeito do tratamento terapêutico da inflamação osteoartrítica com diferentes condroitins sulfato (CS-A: 100 mg/kg, v.o.; CS-C: 100 mg/kg, v.o.; e FCS: 100 mg/kg, v.o.) no ensaio de hipersensibilidade mecânica (A) e no condicionamento motor dos animais (B). Os valores representam a média dos valores do limiar hipernociceptivo $\pm$ desvio padrão mensurado nos dias 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 e 28 ($n = 5 - 10$ camundongos/grupo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ em comparação com o grupo MIA, teste t não pareado).



As variações observadas entre os diferentes condroitins sulfato está relacionada às suas diferenças estruturais, como padrão de sulfatação e/ou peso molecular. O CS-A é um tipo de CS majoritariamente 4-sulfatado enquanto o CS-C é 6-sulfatado (VESSELLA et al., 2021). ROMEREIM et al. (2019), usando um modelo *in vitro* de gânglios da raiz dorsal crescendo em interfaces de gel com CS-A e CS-C, o biomaterial contendo o CS-A e CS-C foram capazes de inibir o crescimento de neuritos (projeções neuronais), sendo esta inibição mais intensa quando tratado com CS-A, sugerindo como promissores a

utilização desses polissacarídeos para o tratamento futuro da dor discogênica.

Nossos resultados mostram que todos os CSs testados na dose de 100 mg/kg foram capazes de aumentar significativamente o limiar de hipernocicepção no modelo de OA induzido pelo MIA. CAMPO et al. (2008) avaliaram o CS-A nas doses de 30, 60 e 120 mg/kg (ip) em modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) em camundongo por 25 dias. O CS-A atenuou significativamente os sinais clínicos no modelo de CIA em todas as doses, bem como a ativação de NF- κ B, levando a supressão de proteases e espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis por contribuírem com o agravamento do processo inflamatório. OLIVERA-CASTILLO et al. (2020) também demonstraram que o FCS (80 mg/kg, v.o.) foi capaz de atenuar a perda de peso corporal, expressão do gene TNF- α colônico e encurtamento do cólon em um modelo experimental de colite inflamatória, sugerindo que esse efeito protetor possa ter sido causado por uma baixa regulação da via NF- κ B e de genes envolvidos na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α .

O ensaio de atividade motora no rotarod é usado para avaliar o uso do membro afetado pela lesão experimental durante a deambulação forçada no tambor giratório (KALFF et al., 2010; RAUN et al., 2013). Após a indução da OA com MIA, o grupo MIA apresentou intensa redução da atividade motora a partir do terceiro dia de tratamento comparado com o grupo normal (Figura 1B). Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho também foram relatados por OGBONNA et al. (2013). Por outro lado, os grupos tratados com CS-A, CS-C e FCS apresentaram aumento significativo na atividade motora de $88,30 \pm 4412,02$, $79,62 \pm 2368,42$ e $91,91 \pm 2012,75$ %, respectivamente, quando comparados ao grupo MIA. Esta atividade aumentada perdurou até vigésimo quarto dia de tratamento. Contudo, ao final dos 28 dias de tratamento, apenas os grupos CS-A e CS-C apresentaram atividade motora reestabelecida em comparação ao grupo MIA. A melhora observada em todos os grupos a partir do primeiro dia de tratamento corrobora com os dados de hipernocicepção mecânica, correlacionando com uma diminuição da intensidade da dor, mas também podem estar relacionadas a capacidade de aprendizado dos animais que se tornaram hábeis na corrida sobre o tambor giratório após vários testes semanais. HUI et al. (2007), injetaram uma única aplicação de hidrogel contendo CS-C (100 mg/ml) na cápsula sinovial do joelho em coelhos com defeito articular. Após 30 e 50 dias, os animais não apresentam alteração na marcha nem presença de instabilidade. NOSIVETS et al. (2009), usando modelo de OA induzido com MIA, injetou por via intramuscular CS-A (35 mg/kg/dia) durante 28-56 dias. Em 56 dias, o tratamento com

dois produtos comerciais de CS-A melhorou significativamente a atividade motora quando comparado com gupo MIA (12.9 ± 0.6 e 12.7 ± 0.6 , respectivamente).

Segundo BUITRAGO et al. (2004) ratos demonstraram desenvolver uma estratégia motora modificando seus padrões de marcha durante o treinamento em rotarod. De acordo com SERT et al. (2014) a melhora no desempenho motor sobre o rotarod não foi resultado da redução da dor ou aumento da capacidade locomotora geral, mas resultado de estratégias motoras adotadas pelos animais para dominar a tarefa após repetidos treinamentos no aparelho. Dessa forma, apesar de um menor tempo de permanência no tambor giratório refletir uma maior sensação de dor pelos animais, isto poderá futuramente ser compensado pelos mesmos. Por outro lado, TSAI et al. (2018) sugeriram que um tempo maior de permanência no tambor giratório nem sempre significa menor sensação de dor, pois a coordenação motora dos animais envolve o seu equilíbrio, a força de pressão e planejamento motor.

Atividade anti-inflamatória

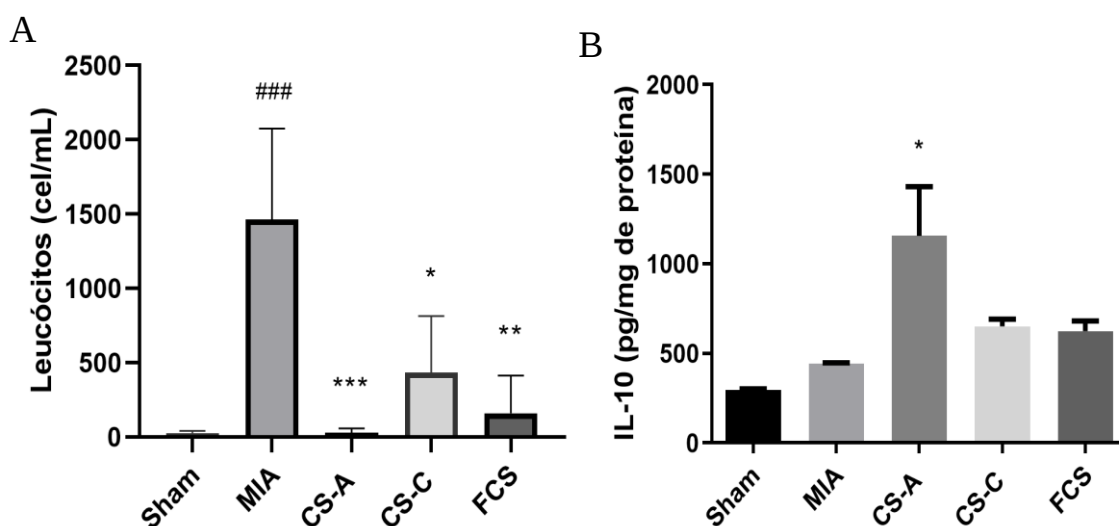
A migração de leucócitos para a articulação doente tem sido relatada em diversos modelos de artrite inflamatória (ASQUITH et al., 2009; MANNING et al., 2021). A busca por novas terapias que limitem o tráfico de leucócitos tem sido amplamente necessária no campo de investigação de novos alvos farmacológicos para o tratamento da artrite (MANNING et al., 2021).

A contagem total de leucócitos realizada a partir do lavado articular demonstrou que o tratamento dos animais com CS-A, CS-C e FCS foram capazes de reduzir significativamente ($1,93 \pm 2959$, $29,6 \pm 38100$ e $10,92 \pm 25370$ %, respectivamente) o infiltrado inflamatório de células na sinóvia quando comparado ao controle negativo (Figura 2A), que ao final dos 28 dias de tratamento, ainda apresentava um número expressivo de leucócitos no lavado articular. Contudo, dentre os diferentes tipos de condroitins, o CS-A foi o que apresentou maior efeito inibidor na migração de leucócitos, seguido do FCS e CS-C. Esses resultados podem demonstrar que a 4-sulfatação dos resíduos de galactosamina do CS-A como um fator limitante na atividade anti-inflamatória.

Nascimento et al. (2021) identificaram uma migração significativa de leucócitos (95 % de células mononucleares) na cavidade articular de animais com OA induzido por MIA, 21 dias após o início dos experimentos. A presença de leucócitos mononucleares permaneceu aumentada até o dia 56. Esses resultados foram diferentes dos obtidos neste

trabalho, uma vez que com 28 dias após indução da OA, foi observado além da presença majoritária de células mononucleares, a infiltração de células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Segundo SAKURAI et al. (2019) as células mononucleares expressam IL-1 β , fator de crescimento nervoso (NGF), óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2, que contribuem para danos adicionais à cartilagem.

Fig. 2. Efeito do tratamento terapêutico da inflamação osteoartrítica com diferentes condroitins sulfato (CS-A: 100 mg/kg, v.o.; CS-C: 100 mg/kg, v.o.; e FCS: 100 mg/kg, v.o.) na contagem de leucócitos totais presentes no lavado articular (A) e na expressão de IL-10 na cartilagem articular de camundongos osteoartríticos. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3-7 animais/grupo, ###P <0,001 vs. grupo Sham, *p value < 0,05, **p value <0,01 e ***p value < 0,001 vs. grupo MIA, One-way ANOVA não paramétrico seguido do teste de Bonferroni).



MORADI et al. (2015) e KLEIN-WIERINGA et al. (2016), relataram a presença de macrófagos CD14⁺ e linfócitos T CD4⁺ no coxim adiposo infrapatelar de animais com OA, e correlacionaram a dor inflamatória com os níveis elevados dessas células no líquido sinovial da cavidade articular. Corroborando com nossos achados, BORSIG et al (2007) demonstraram que o FCS de *H. grisea* foi capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos em modelos de inflamação aguda como a peritonite induzida por tioglicolato e a inflamação pulmonar induzida por lipopolissacarídeos. Esta propriedade anti-inflamatória do FCS foi posteriormente atribuída a sua atividade anti-selectinas, confirmada em ensaios anti-metástase de células LS180 (adenocarcinoma de cólon) dependentes de P e L selectinas.

Ao final de 28 dias de tratamento, também foi observado que a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 esteve aumentada significativamente no grupo CS-A

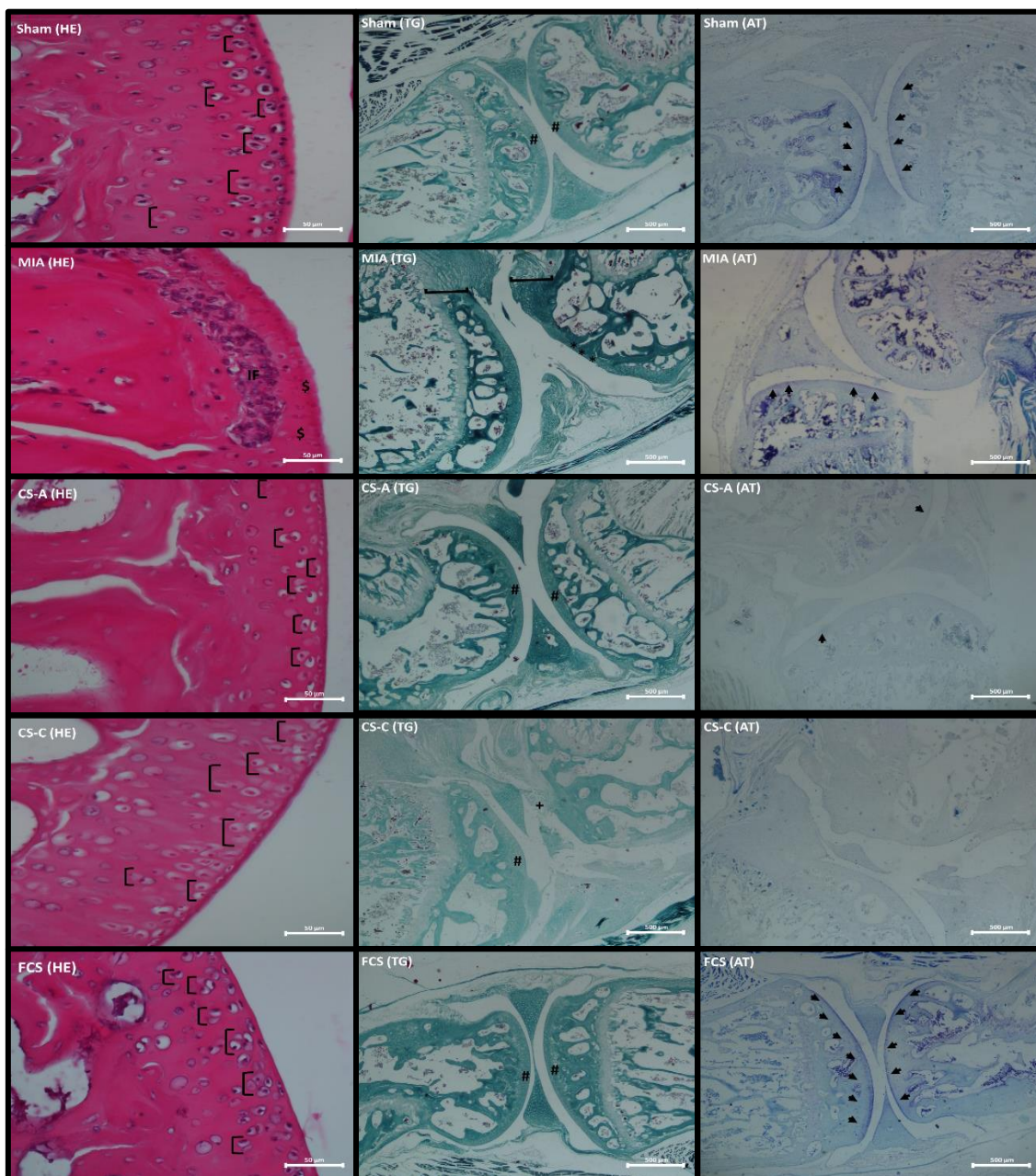
(261,19 %), quando comparado ao grupo MIA. Por outro lado, os grupos CS-C ($147,3 \pm 6973$) e FCS ($141,2 \pm 14770$) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo (Figura 2B). Contudo, a expressão de TNF- α e IL-6 ficaram abaixo do limite de detecção (resultados não mostrados). O aumento da expressão de IL-10 está relacionado a efeitos anti-inflamatórios condroprotetores na OA (WALY et al., 2017). A citocina IL-10 reduz a expressão de MMPs, COX e citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (SIKKA et al., 2013; WOJDASIEWICZ et al., 2014). Além disso, a IL-10 é capaz de inibir a osteoclastogênese (EVANS; FOX, 2007; AMARASEKARA et al., 2018) pela regulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 (HOURI-HADDAD et al., 2007). KWON et al. (2018), relatam que camundongos IL-10-*knock-out* com OA induzida por MIA tiveram latência de retirada da pata diminuída e maior gravidade da dor inflamatória que camundongos normais. Esses resultados corroboram com os dados obtidos neste trabalho para o grupo tratado com CS-A, sugerindo que seu efeito analgésico anti-inflamatório possa estar relacionado a sua capacidade de aumentar a expressão de IL-10.

LIU et al. (2006) reportaram que a IL-10 aumenta também a expressão de osteoprotegerina (OPG) e diminui a expressão do ativador do receptor do ligante NF-Kb (RANKL) e receptor do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-FCS), proteínas relacionadas à patogênese da OA (LIU et al., 2006). Como a patogênese da OA envolve a diminuição da expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), citocinas pró-inflamatória e a atividade de células osteoclásticas (CHOW & CHIN, 2020), os níveis aumentados de IL-10 no grupo tratado com CS-A (100 mg/kg), podem sugerir um efeito condroprotetor contra a degeneração da cartilagem articular através da regulação negativa da inflamação.

Análise histopatológica e histomorfométrica

Segundo MORAIS et al. (2016) e SULAIMAN et al. (2021), a injeção intra-articular de MIA provoca redução no número de condrócitos, alterações histológicas e morfológicas na cartilagem articular, bem como lesões na cartilagem com perda da matriz de proteoglicanos, inflamação sinovial e alterações ósseas subcondrais e funcionais. Na figura 3 estão ilustradas imagens da articulação sinovial femoropatelar corada com hematoxilina-eosina (HE), tricômio de gomori (TG) e azul de toluidina (AT) após 28 dias de tratamento com CS-A, CS-C e FCS.

Fig. 3. Micrografias da cartilagem sinovial dos animais osteoartríticos após 28 dias de tratamento com diferentes condroitins sulfato (CS-A: 100 mg/kg, v.o.; CS-C: 100 mg/kg, v.o.; e FCS: 100 mg/kg, v.o.). As lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina (HE), Tricômio de gomori (TG) e Azul de toluidina (AZ). Colchetes: grupos de condrócitos funcionais; \$: hipocelularidade e morte celular; *: neoformações ósseas; IF: infiltrado inflamatório; #: cartilagem preservada; +: erosão da cartilagem; Barra: deformação da cartilagem; Setas: proteoglicanos na superfície da cartilagem articular. Escala: 50 e 500 μ m.



Na análise histológica (HE) do grupo Sham, foi possível observar um processo de divisão dos condrócitos com preservação da matriz intra- e inter-territorial, bem como formação de grupos isogênicos contendo dois a três condrócitos. No grupo MIA foi observado uma redução da divisão de condrócitos e da área de matriz interterritorial com consequente redução da multiplicação de condrócitos, ocasionando uma hipocelularidade

e morte celular, aumento do processo inflamatório com presença de infiltrado leucocitário, redução da matriz intercelular e da área cartilaginosa com infiltrado leucocitário entre a cartilagem hialina e o osso subcondral.

A análise histológica dos grupos tratados com CS-A, CS-C e FCS, revelaram uma multiplicação de condrócitos com formação de grupos isogênicos e preservação da matriz intra- e inter-territorial sem diferenças significativas na área de distribuição dos condrócitos na cartilagem articular, porém essa área foi um pouco menor quando comparado ao grupo normal. Foi possível observar também a ausência de infiltrado leucocitário na cartilagem articular para todos os grupos tratados diariamente com os diferentes tipos de sulfato de condroitina. Por outro lado, 28 dias após a indução da OA, áreas contendo a presença de intenso infiltrado leucocitário foram observadas para o grupo MIA.

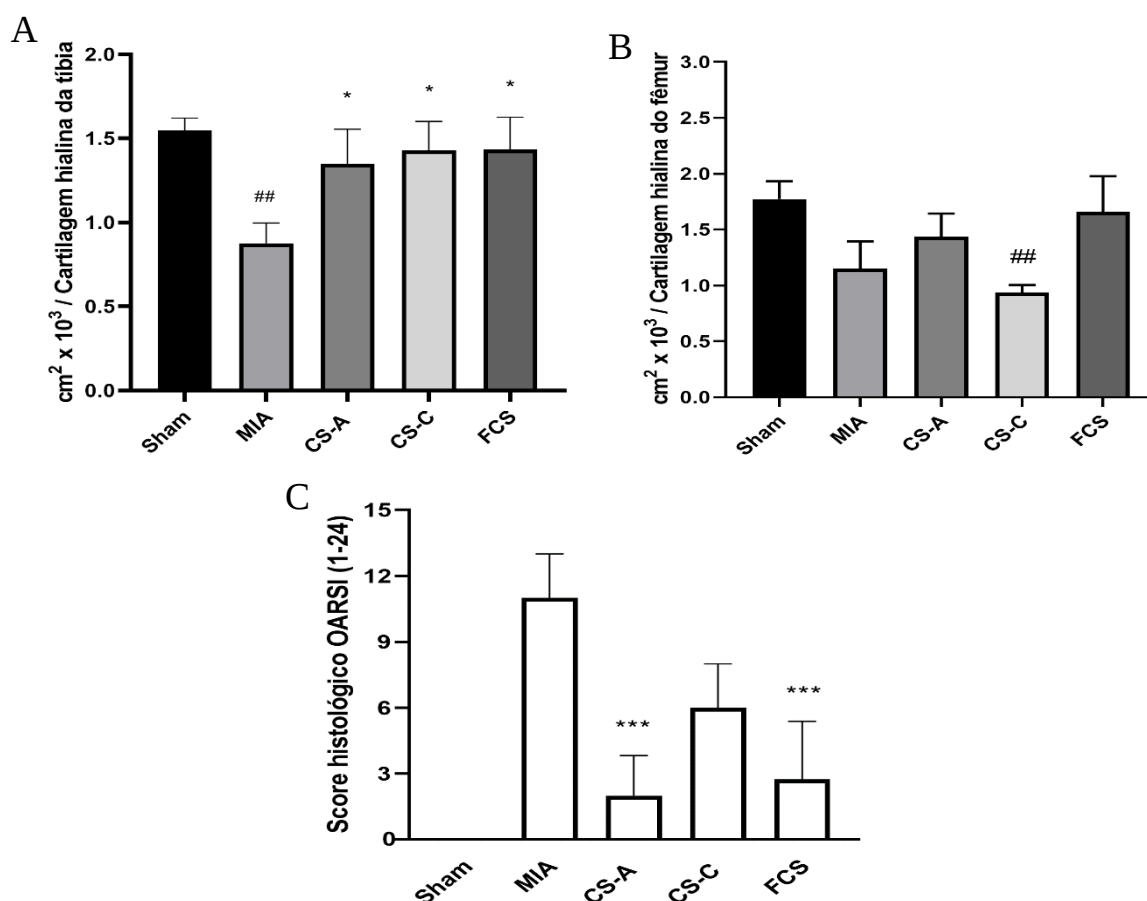
Na análise histológica dos grupos corados com TG (figura 3), nota-se no grupo MIA a presença de remodelação óssea e deformação do contorno da superfície articular (mais do que apenas formação de osteófitos). Além disso, é possível observar neoformações ósseas ocupando a zona média e profunda da cartilagem articular. Os grupos CS-A, CS-C e FCS apresentam os condrócitos com a cartilagem articular normal e organizados em zonas superficial, média e profunda. No entanto, o grupo CS-C exhibe erosão da cartilagem com escavação relacionada à perda de matriz em um volume circunscrito de cartilagem.

Nas lâminas coradas com AT (Figura 3), pode ser observado a presença de proteoglicanos na superfície da cartilagem articular (setas pretas), sendo essa marcação mais intensa nos grupos Sham e FCS. Já o grupo MIA, CS-A e CS-C, apresentaram esta marcação diferencial com AT bem reduzida, provavelmente em decorrência da intensa produção de proteinases que provocam a morte de condrócitos e a degradação de preoglicanos e colágeno tipo II na cartilagem articular dos camundongos osteoartíticos (TCHETINA et al., 2005).

A área de cartilagem hialina sobre a tíbia e o fêmur foi avaliada morfometricamente e, como pode ser notado na Figura 4, o grupo MIA apresentou redução na área de cartilagem articular sobre a tíbia (57%) e fêmur (65%) em comparação ao grupo Sham, sendo essa diferença significativa apenas para a cartilagem sobre a tíbia. Por outro lado, ao final dos 28 dias de tratamento, os animais do grupo CS-A, CS-C e FCS apresentaram aumento significativo ($87,14 \pm 20,63$, $92,31 \pm 17,13$ e $92,63 \pm 19,26$ %, respectivamente) da área ocupada por condrócitos na cartilagem que recobre a tíbia

(Figura 4A), porém o mesmo não foi observado para a área da cartilagem sobre o fêmur, cujos resultados não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo MIA (Figura 4B). Esse aumento da área ocupada por condrócitos na cartilagem que recobre a tíbia pode estar associado ao aumento da proliferação celular, evidenciando uma possível atividade condroprotetora pelos tratamentos diários com o CS-A, CS-C e FCS (JEROCSH, 2011; LÓPEZ-SENRA et al. 2020).

Fig. 4. Área de tecido cartilaginoso hialino sobre tíbia (A) e fêmur (B); e escore histológico OARSI do dano articular (C) nos animais osteoartíticos após 28 dias de tratamento com diferentes condroitins sulfato (CS-A: 100 mg/kg, v.o.; CS-C: 100 mg/kg, v.o.; e FCS: 100 mg/kg, v.o.). Os valores expressos em média±desvio padrão (n = 3-5 animais/grupo, ^{##}P <0,01 vs. grupo Sham, *p value < 0,05 e ***p value < 0,001 vs. grupo MIA, One-way ANOVA não paramétrico seguido do teste de Bonferroni).



Estudos em animais e humanos mostram que a administração de sulfato de condroitina inibe a destruição da cartilagem e estimula o processo anabólico do metabolismo da cartilagem, levando ao aumento na síntese de colágeno tipo II e proteoglicanos na cartilagem articular (MARTEL-PELLETIER et al., 2015; SUKHIKH et al., 2020; HASEGAWA et al., 2020). SUSANTE et al. (2000), isolaram condrócitos

bovinos para serem cultivados durante 14 dias em matrizes porosas de colágeno tipo I na presença e ausência de CS-C. O CS-C demonstrou influenciar positivamente a bioatividade dos condrócitos *in vitro*, estimulando a proliferação celular e a quantidade total de proteoglicanos retidos na matriz extracelular. USTYUZHANINA et al. (2021), também relataram que o CS isolado do peixe *Salmo salar* (4- ou 6-sulfatado em GalNAc) e o FCS isolado do pepino-do-mar *Apostichopus japonicus* (Fuc p 2S 4S, Fuc p 3S 4S e Fuc p 4S em ramos de α -L-fucosil e 4- e/ou 6-sulfatado em GalNAc) foram capazes de estimular atividade proliferativa de células hematopoiéticas CD34(+) CD45(+) em camundongos imunossuprimidos.

O grau da lesão da cartilagem osteoartrítica após 28 dias de tratamento com os diferentes condroitins sulfato (Figura 4C), foi determinado segundo os critérios da OARSI (Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite). Este sistema emprega a análise de uma avaliação padrão de bloco/seção por grau e estágio da lesão com cálculo subsequente, cujo resultado é expresso como uma pontuação de artrite (PRITZKER et al., 2006). O grau representa o índice da gravidade ou progressão biológica do processo osteoartrítico, estimando, assim, o nível de profundidade da OA na cartilagem articular. Em contrapartida, o estágio é definido como a extensão horizontal de envolvimento da cartilagem dentro de um lado de um compartimento articular, independentemente do grau subjacente (PRITZKER et al., 2003).

Após 28 dias de tratamento, o grupo MIA se encontrava em grau 6 da OA, considerado o mais avançado. Tanto nas lâminas coradas com HE e TG (Figura 3), foram observadas áreas de deformação, exposição óssea subcondral e mudança no contorno da superfície articular, bem como presença de fibrocartilagem reparadora focalmente acima do nível da superfície articular, previamente erodida e desnudada com envolvimento articular entre 10-25% da superfície, área, volume. Essas alterações histopatológicas também foram observadas por VALENTE (2019), que relatou afinamento acentuado de toda a superfície articular, perda de coloração de proteoglicanos e reestruturação do osso subcondral em camundongos 28 dias após indução da OA com 1 mg de MIA. HAYASHI et al. (2017) também demonstraram que a injeção de 1 mg de MIA na cápsula articular do joelho de ratos induziu a exposição parcial do osso subcondral e irregularidades na superfície da cartilagem articular.

Os animais tratados com CS-A e FCS apresentaram uma redução significativa do score histopatológico (de 11 para $2,00 \pm 1,58$ e $2,75 \pm 2,27$, respectivamente) em relação ao grupo MIA (Figura 4C). Essas baixas pontuações para os grupos CS-A e FCS refletem

um menor índice de gravidade e uma menor extensão horizontal do envolvimento da cartilagem na progressão biológica do processo osteoartrítico (HE e TG, figura 3). UDO et al. (2016), verificaram o score OARSI aumenta significativamente e de maneira dose dependente a medida que concentrações crescentes de MIA (0,1-1 mg) foram injetados na cápsula articula do joelho de ratos Wistar machos, atingindo um valor de 24 com a dose de 1 mg de MIA, cerca de 2,4 vezes maior que o obtido neste trabalho. Por outro lado, YONGYAUN et al. (2018) verificaram que a dose 1 mg de MIA foi capaz de desenvolver exposição óssea subcondral após 28 dias, com score de $16,21 \pm 4,73$ aproximado do obtido neste trabalho após 28 dias.

5. ARTIGO 2

Artigo a ser submetido a revista Biochemical Pharmacology (F.I. 5.858) de classificação no Qualis da CAPES A1 na área de avaliação CB1 da PPGCB.

Evidências de segurança, eficácia e mecanismo de ação de SYSADOAs e novas perspectivas terapêuticas em osteoartrite

Vitor Alfredo de Santana Silva¹, Kátia Alves Ribeiro¹, Paulo Antônio Galindo Soares¹,
Maria das Graças Carneiro-da-Cunha¹

¹Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Resumo

A osteoartrite (OA) é considerada uma das doenças mais incapacitantes e onerosas do mundo. Estimativas mundiais sugerem mais de 250 milhões de indivíduos acometidos com a doença. No entanto, a falta de tratamentos que retardem a progressão da doença é uma necessidade não atendida. A glicosamina (G), sulfato de condroitina (CS) e ácido hialurônico (HA) pertencem ao grupo Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis (SYSADOAs). Durante o processo fisiopatológico da OA, o tratamento com esses polissacarídeos se manifestam na OA mediando vários processos homeostáticos, incluindo a promoção de efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antiapoptótico, anticatabólico e anabólico. Contudo, apesar de serem mais seguros e comparáveis em eficácia sintomática com os anti-inflamatório não esteroides (AINEs), ainda existem controvérsia sobre a eficácia e segurança desses compostos, razão pela qual as principais instituições de pesquisas não fornecerem igualmente recomendações para o tratamento farmacológico da OA. Em virtude disso, estudos têm sido desenvolvidos e resultados recentes têm demonstrado potenciais medicamentos modificadores da doença para OA e diversas abordagens estão sendo exploradas para melhor controle da doença. Nesta revisão relatamos as evidências de segurança, eficácia e mecanismos de ação de SYSADOAs, e novas perspectivas terapêuticas no tratamento da OA.

Introdução

A osteoartrite (OA) é uma desordem reumática musculoesquelética de alta prevalência com implicações substanciais para a saúde individual, sistemas de saúde e custos socioeconômicos em geral (HUNTER; BIERMA-ZEINSTRA, 2019;

KLOPPENBURG; BEREBAUM, 2020). Considerada uma forma comum de artrite, a OA pode afetar qualquer articulação, mas preferencialmente o joelho, mãos, quadril e coluna. Os sintomas comuns incluem dores articulares, inchaço nas articulações e rigidez ao acordar e após inatividade, os quais são acompanhados de inflamação, degeneração da cartilagem articular e limitação funcional. A etiologia de OA é multifatorial e envolve fatores de riscos primários e secundários: os fatores de risco primários incluem idade, sexo, histórico familiar e obesidade, enquanto os fatores secundários, compreendem lesões traumáticas, deformidades mecânicas e flacidez articular (MARTEL-PELLETIER, 2015). Os efeitos combinados do envelhecimento, aumento da obesidade e lesões nas articulações está tornando a OA uma das doenças mais incapacitantes e onerosas do mundo, e estimativas mundiais sugerem mais de 250 milhões de pessoas acometidas com a doença (HUNTER; BIERMA-ZEINSTR, 2019). No tocante aos tratamentos farmacológicos são utilizados anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), corticoides intra-articulares e opioides. No entanto, apesar de serem moderadamente eficazes para o alívio da dor, não retardam ou interrompem a progressão da doença. Além disso, o uso prolongado desses agentes aumenta consideravelmente as chances de eventos adversos graves (EAG), como toxicidade gastrointestinal, cardiovascular e renal (STEINMEYER et al., 2018).

Em virtude da necessidade terapêutica, os Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis (SYSADOAs) tem sido proposto como substâncias condroprotetoras capazes de retardar, estabilizar ou reverter as alterações patológicas nas articulações osteoartíticas, como forma de limitar a progressão da doença. O ácido hialurônico (HA) é um polissacarídeo não sulfatado, formado por unidades repetitivas distintas de ácido β -1,4-D-glicurônico (ácido urônico) e β -1,3- N- acetilácido glicurônico. Comumente, é sintetizado por célula sinoviais do tipo B, condrócitos e fibroblastos (GOCMEN et al., 2015; RICHARSD et al., 2016). O sulfato de condroitina (CS) é um polissacarídeo sulfatado (PS) presente em vários tecidos conjuntivos, incluindo cartilagem, ligamentos ossos, tendões e pele. Estruturalmente, o CS é composto por ácido glicurônico (GlcA) e N-acetilgalactosamina (GalNAc), apresentam em animais terrestres principalmente dissacarídeo monossulfatados 4-O- ou 6-O-GalNAc (CS-A e CS-C, respectivamente) e uma baixa porcentagem de dissacarídeos não sulfatados (CS-0); e em espécies marinhas, dissacarídeo dissulfatados (CS-B, CS-D, CS-E, CS-K e CS-L) e até mesmo trissulfatados (CS-M, CS-S e CS-T) (VESSELLA et al., 2021). A glicosamina (G) de fórmula molecular $C_6H_{13}NO_5$, é um monossacarídeo, aminossacarídeo, constituinte natural dos

glicosaminoglicanos (GAGs), que participa como substrato para formação de moléculas como proteoglicano, hialurônico e condroitina na cartilagem articular.

Esses SYSADOAs quando comparado aos AINEs, demonstram maior segurança no tocante a eficácia sintomática e melhor eficácia modificadora da estrutura na OA (KUCCHARZ et al., 2016; BRUYÈRE et al., 2019; REGINSTER et al., 2020). A suplementação com essas biomoléculas se manifesta na OA mediando vários processos homeostáticos, incluindo a promoção de efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antiapoptótico, anticatabólico e anabólico (AL-SAADY et al., 2019; CHOI et al., 2019; GUPTA et al., 2019a). No entanto, ainda existem controvérsias sobre a eficácia e segurança desses SYSADOAs, razão pela qual as principais instituições de pesquisas não fornecerem forte recomendação para o tratamento farmacológico da OA (BRUYÈRE et al., 2019; KOLASINSKI et al., 2020). Atualmente, estudos avançados em fase II e III têm demonstrado potenciais modificadores da doença (DMOAD) e diversos alvos estão sendo explorados para melhor controle da OA.

Eficácia e segurança de ácido hialurônico na oosteoartrite

Em seres humanos, o HA está presente em todos os tecidos e órgãos conectivos, sendo mais abundantemente na cartilagem articular e líquido sinovial. Seu papel é contribuir para a proliferação celular, migração e morfogênese, lubrificação e viscoelasticidade do líquido sinovial, bem como atuar como retensor de umidade, estabilizador da junta e regulador do equilíbrio de água (GUPTA et al., 2019b).

Diversos estudos corroboram para a eficácia do HA por meio de ensaios clínicos randomizados (ECRs) por placebo e metanálises (MAHEU et al., 2016; COOPER et al., 2017). Altman et al. (2018) numa revisão sistemática incluindo um total de 17 artigos (7 ECRs e 10 estudos de coorte) sugerem que injeções repetidas de ácido hialurônico intra-articular (HA-IA) de diferentes preparações comerciais reduzem os escores de dor do índice de artrite das universidades de Western Ontario e McMaster (WOMAC, sigla do inglês) e são seguras para o tratamento da OA de joelho. Pashuck et al. (2016), em um modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (ACLT), usando uma preparação comercial de ácido hialurônico de alto peso molecular (HA-HWM) [(SYNVICS® 1)], demonstrou ser capaz de promover melhorias clinicamente significativas nos escores de dor do WOMAC, função e amplitude de movimento confortável do joelho em cães durante 4 a 6 meses quando comparado aos valores de pré-tratamento e controles com solução salina. Além disso, o benefício máximo com o tratamento foi observado entre 4-

8 semanas, o que sugere a utilização do HA-IA como uma opção de tratamento sintomático para pacientes com OA de joelho. Lucia et al. (2020) investigaram a eficácia e segurança de 1–3 injeções semanais ou injeção única de hialano GF 20 na OA de joelho em um estudo de revisão sistemática e meta-análise durante 1 ano de acompanhamento. Tais resultados mostraram melhora na dor do WOMAC e escala visual analógica (EVA), função física e rigidez do WOMAC, bem como resumo do componente mental e físico da pesquisa de formulário curto de 36 itens (SF-36). Além disso, não houve diferença significativa em termos de eficácia com base no esquema de injeção, nem entre ECRs e estudos não randomizados.

Xing et al. (2016), em uma revisão sistemática concluíram que HA é uma intervenção eficaz no tratamento da OA do joelho sem aumento do risco de eventos adversos em relação ao placebo. Concoff et al. (2017) investigando a eficácia do HA-IA na dor do joelho, através de uma revisão sistemática e meta-análise, demonstrou que o esquema de administração de 2-4 e ≥ 5 injeções semanais proporcionaram diminuição da dor em relação ao placebo durante todo período de acompanhamento (± 6 meses). No entanto, o regime de tratamento de 2-4 injeções de HA-IA comparado com ao placebo produziram maior benefício na dor do joelho e foi geralmente mais seguro em 3 meses e 6 meses. Hermans et al. (2019), em um ECR aberto incluindo 156 indivíduos em idade produtiva (média de 54 anos), demonstraram que o regime de administração de 3 injeções de HA-HMW semanais leva a melhora clinicamente significativa na dor, função e avaliação global do paciente, bem como demonstram ser mais custo-benefício para alívio da dor em pacientes com OA. Clementi et al. (2017), compararam em um ECR a eficácia de injeções de HA de peso molecular ultra alto (HA-UHMW, Fermathron S) com HA de peso molecular médio (HA-MMW, Hyalubrix 60) em 50 pacientes com OA de quadril, sendo 27 pacientes no grupo que receberam HA-MMW e 23 no que receberam HA-UHMW. Os resultados demonstraram que uma única dose de HA-UHMW foi tão eficaz quanto duas doses de de HA-MMW, resultando em reduções semelhantes de dor e incapacidade.

O grupo de trabalho da Sociedade Europeia para Aspectos Clínicos e Econômicos da Osteoporose, Osteoartrite e Doenças Musculoesqueléticas oferece uma recomendação fraca para o uso de HA-IA em pacientes que apresentam contraindicações para AINEs, ou se o paciente ainda é sintomático, apesar do uso de AINEs. No entanto, sugere que o tratamento com HA-IA pode ser considerado com um bom perfil de segurança e eficácia, especialmente para pacientes mais velhos ou naqueles com maior risco de efeitos

adversos (EA) induzidos por AINEs (BRUYÈRE et al., 2019). A sociedade internacional de pesquisa em osteoartrite (OARSI) recomenda condicionalmente o HA-IA para o tratamento de longo prazo na OA de joelho. O HA-IA foi associado à melhora dos sintomas após 12 semanas e demonstrou um bom perfil de segurança comparado a administrações repetidas de corticosteroides intra-articular, embora este último seja mais efetivo para fornecer alívio da dor a curto prazo (BANNURU et al., 2019).

Farmacocinética e formulações de ácido hialurônico

Atualmente existem dois processos de produção para obtenção de polímeros de HA em quantidade comerciais: extração de tecidos animais, tipicamente por cristas de galo e por sistema de expressão bacteriana em *Streptococcus* (fermentação microbiana) (LIU et al., 2011). O HA pode estar disponível como medicação intra-articular (IA) ou por via oral para OA de joelho. Como a OA afeta um número limitado de articulações (ombro, cotovelo, joelho, quadril, mãos e pés), o tratamento local tem sido relatado como mais eficaz em relação as administrações orais, uma vez que evita exposições sistêmica e potenciais efeitos colaterais (MAUDENS et al., 2018; GUPTA et al., 2019b). Atualmente, diferentes formulações injetáveis de HA estão disponíveis: preparações com peso molecular baixo (500–730 kDa), intermediário (800–2.000 kDa) e alto (~ 6.000 kDa) (BERENBAUM et al., 2012). A injeção de HA para o tratamento da OA do joelho é regulamentada pela Food and Drug Administration (FDA) nos EUA como um dispositivo médico, incluindo diversas preparações como SynviCS-One® (Genzyme), Gel-One® (Zimmer), Hyalgan® (Fidia), Supartz FX™ (Bioventus) e OrthoviCS® (Anika). A eficácia terapêutica das preparações de HA pode diferir quanto a fonte do HA, peso molecular, métodos de produção, posologia, propriedades reológicas, concentração, meia-vida na articulação, farmacocinética e farmacodinâmica (ASARI; KANEMITSU; KURIHARA, 2010; GUPTA et al., 2019b).

Balogh et al. (2008) investigaram pela primeira vez a absorção, distribuição e excreção de HA de alto peso molecular em rato Wistar (150–200 g cada) e cães Beagle (10–15 kg cada) após ingestão oral de HA marcado radioativamente com tecnécio 99m ($^{99m}\text{Tc-HA}$). A excreção urinária e fecal após a ingestão de $^{99m}\text{Tc-HA}$ em ratos mostrou 86,7– 95,6% da radioatividade recuperada, quase toda nas fezes. Todos os tecidos examinados mostraram incorporação da radioatividade de $^{99m}\text{Tc-HA}$ começando aos 15 min e persistindo por 48 h. As cintilografias do corpo inteiro e planos da região ventral do tórax mostraram radioatividade não alimentar do $^{99m}\text{Tc-HA}$ acumulado nas

articulações, vértebras e glândulas salivares 4 h após a administração. A autorradiografia de amostras de pele, osso e tecido articular após 24 h mostrou incorporação do ^{99m}Tc -HA. O aparecimento da radioatividade nos tecidos precedeu o aparecimento no sangue, sugerindo que o HA foi entregue aos tecidos possivelmente através do transporte linfático.

Com o objetivo de determinar a distribuição e a eliminação de amostras de HA de diferentes pesos moleculares (10 kDa, 100 kDa e 450 kDa) radiomarcado com Índio – 111 (^{111}In) em ratos, o HA foi conjugado com ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e rotulado como ^{111}In -DTPA-HA. Os resultados indicaram que 50–54% para 10 e 100 kDa e 80% para 450 kDa da dose administrada de HA radiomarcado estava presente no fígado após 5 min. A radioatividade permaneceu no fígado durante todo período experimental de 72 h. A eliminação do radiomarcador de baixo peso molecular foi principalmente renal e quantidades maiores de radiomarcção eram absorvidas pelo fígado quando usada a molécula de 450 kDa. Esta investigação sugere que as moléculas de maior peso molecular (> 400 kDa) são mais rápida e quantitativamente absorvidos pelo fígado (SVANOVSKY et al., 2008).

Em animais como rato e cão, a biodisponibilidade do HA oral está em torno 5%, absorção mediada pelo transporte linfático ou via paracelular (REED et al., 1992; BALOGH et al., 2008; HISADA et al., 2008). Após a administração oral, o HA se distribui no corpo, e 0,5% da dose chega à articulação do joelho (BALOGH et al., 2008). A cinética de eliminação plasmática de HA é muito eficiente, com meia-vida de 2–6 min e um turnover normal total de 10–100 mg/dia no ser humano adulto. A principal captação do sangue ocorre nas células endoteliais do fígado, porém existem evidências de um papel importante do rim na eliminação do HA. A remoção do HA da circulação sistêmica pode ser influenciada por vários fatores como saturação da eliminação causada por um aumento da entrada linfática de HA na circulação, alteração do fluxo sanguíneo sobre o órgão de eliminação e competição com outras substâncias, como proteoglicanos ou CS (NECAS et al., 2008).

Mecanismo de ação do ácido hialurônico na osteoartrite

O HA é uma molécula presente em abundância na MEC, principalmente na sinóvia e cartilagem. Evidências sugerem que o HA se complexa com a glicoproteína lubricina conferindo uma rede com função de lubrificação para diminuir a força de atrito e reduzir os danos por desgaste em superfícies de atrito/cisalhamento na articulação. No entanto,

estudos mostram que características alteradas do HA na sinóvia, incluindo diminuição da síntese, aumento da degradação de HA e aumento do estresse oxidativo levam a uma diminuição da concentração e do peso molecular médio do HA associado a produção de citocinas pró-inflamatórias em condrócitos, fibroblastos e macrófagos. Em contrapartida, a administração do HA-HMW parece ter efeito oposto nas vias de sinalização molecular em vários tipos de células encontradas nas articulações sinoviais (NICHOLLS et al., 2017).

O HA pode executar funções biológicas através de dois mecanismos básicos: como uma molécula estrutural passiva e como uma molécula sinalizadora. O mecanismo passivo está relacionado às propriedades físico-química do HA-HMW (equilíbrio osmótico, viscoelasticidade e propriedades físicas da MEC), enquanto o mecanismo de molécula sinalizadora relaciona-se às atividades pró- e anti-inflamatórias (promoção e inibição da migração celular, ativação e bloqueio da divisão e diferenciação celular). A função de molécula de sinalização depende do peso molecular do HA, da localização e dos fatores específicos da célula (expressão do receptor, vias de sinalização e ciclo celular). Além disso, dependendo do peso molecular do HA pode haver influência na captação de HA pelas células, mudanças na afinidade de receptores e formação de agrupamento de complexo de receptores nas células (FALLACARA et al., 2018).

Durante algumas condições ambientais e patológicas como na artrite reumatoide, o HA-HMW é clivado em ácido hialurônico de baixo peso molecular (HA-LMW), apresentando atividade pró-inflamatória e pró-angiogênica (FALLACARA et al., 2018; HELDIN, P. et al., 2018). O HA pode se ligar a receptores de membrana celular e mediar diferentes respostas biológicas (Tabela 3) (ALTMAN; BEDI, 2019; GUPTA et al., 2019b). O principal receptor do ligante HA é o receptor CD44, uma glicoproteína transmembrana do tipo 1, multi-domínio e com várias isoformas. O CD44 é responsável pela manutenção da homeostase da cartilagem e sua função principal é ligar e internalizar HA exógenos. Dessa forma, a interação de HA-CD44 está envolvida em várias vias de sinalização intracelular que controlam processos celulares como internalização/degradação de HA, inflamação, angiogênese, migração celular, proliferação, agregação e adesão aos componentes da MEC (KNOPF-MARQUES et al., 2016; FALLACARA et al., 2018).

Tabela 1. Receptores de Ácido Hialurônico

Receptores	Localização/Mecanismo	Referência
------------	-----------------------	------------

CD44	Membrana celular / controla internalização e degradação de HA, inflamação, angiogênese, migração celular, proliferação, agregação e adesão a componentes da MEC.	Knopf-Marques, et al., 2016
TLR-2 e TRL-4	Membrana celular / envolvida no reconhecimento de PAMPs.	Litwiniuk et al., 2016
LAYN	Membrana celular / regula aderências focais e controle de interações células-célula e na modulação do comportamento e função de células.	Bono et al., 2005
ICAM-1	Membrana celular / induzida durante respostas inflamatórias.	Law et al., 2020
RHAMM	Membrana celular, citoplasma e no núcleo / envolvido na motilidade celular, transformação celular, formação de metástases e regulação da adipogênese e da atividade da quinase regulada extracelular (ERK).	Abatangelo et al., 2020
LYVE-1	Membrana celular e vesículas próximas às membranas extranucleares / auxiliar na regulação do nível de hidratação do tecido regulação da linfangiogênese e adesão intercelular.	Lawrance et al, 2016
HARE	Membrana celular e citoplasma / atua na depuração sistêmica de HA e outros GAGs, receptor de fosfatidilserina que aumenta o envolvimento de células apoptóticas.	Xue et al., 2020

O aumento da interação de HA-CD44 está correlacionado com o aumento do tamanho da cadeia polissacarídica, pois HA maiores são capazes de diminuir a dissociação através da ligação divalente. O receptor CD-44 interage com vários outros ligantes, incluindo proteína da matriz extracelular, osteopontina, colágenos, MMPs, fatores de crescimento, citocinas e fibronectina. Vários estudos corroboram que fragmento de HA produz uma resposta pró-inflamatória, enquanto HA-HMW produz uma resposta anti-inflamatória na OA. Além disso, fragmentos de HA aumentam significativamente a expressão de receptores TLR-4 e CD44, juntamente com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (FALLACARA et al., 2018; ALTMAN; BEDI, 2019).

A hipótese atual que explica o efeito do HA-HWM é a formação de grupos de receptores na superfície da membrana celular para modular a atividade do receptor. Desse

modo, a ligação do HA ao receptor CD44 proporciona efeito de revestimento da membrana, e essa camada protetora de HA na superfície celular é capaz de mascarar receptores de morte celular e impedir que a célula entre em apoptose (LITWINIUK et al., 2016). Os receptores Toll-like (TLRs) são um grupo de proteínas altamente conservadas que coordenam a defesa inicial contra bactérias e vírus comuns dentro do sistema imunológico. A família TLR humana consiste em 10 receptores que podem ser ativados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (LITWINIUK et al., 2016; ALTMAN et al., 2019). Dois mecanismos são propostos para explicar como o HA pode influenciar os TLRs. Na primeira teoria o HA-LWM atua como agonista para TLR-2 e TLR-4 mediando uma reação inflamatória. Em contrapartida, na segunda teoria, o HA não se liga aos TLRs, mas é capaz de regular as interações dos TLRs com seus ligantes através de uma barreira gelatinosa pericelular (FALLACARA et al., 2018).

Campo et al. (2011), investigou a influência do HA-HWM em diferentes concentrações na modulação de TLR-4 e TLR-2 em artrite induzida por colágeno (CIA) em camundongos. O HA-HWM limitou significativamente a incidência de CIA e diminuiu os níveis de TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-17 (IL-17), metaloprotease-13 (MMP-13) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Além disso, a melhoria dos parâmetros bioquímicos correspondeu com a análise histológica, plasma e níveis de HA no líquido sinovial, sugerindo que TLR-4 e TLR-2 desempenha um papel importante no mecanismo da artrite e a interação / bloqueio do HA-HWM pode reduzir a inflamação e a lesão da cartilagem. Campos et al. (2012) investigaram os efeitos da degradação do HA na resposta inflamatória em fibroblastos sinoviais de camundongos submetidos a artrite induzida por colágeno (CIA). Os resultados mostraram que a inibição da degradação de HA via RNA interferente pequeno (siRNAs) direcionado para as enzimas hialuronidase HYAL1, HYAL2 e HYAL3 reduziu a ativação de TLR-4, CD44 e CIA por fragmentos de HA.

Layilin (LAYN) é uma proteína transmembrana do tipo I de 55 KDa com domínio de lectina tipo C que serve como um receptor para ácido hialurônico (HA). LAYN é expresso em diferentes tipos de células e tem potencial de mediar sinais da matriz extracelular (MEC) para o citoesqueleto celular de maneira análoga às selectinas na mediação de interações transitórias com a MEC. Além disso, está envolvida na organização de aderências focais controlando interações entre células-célula e na modulação do comportamento e função de células durante o remodelamento,

desenvolvimento, homeostase e doença (BONO et al., 2005; MURATA et al., 2013). Murata et al. (2013) examinaram a expressão e função de LAYN em condrócitos articulares e sinoviócitos no metabolismo da cartilagem. LAYN foi expressa constitutivamente em condrócitos articulares humanos e sinoviócitos, porém IL-1 β suprimiu significativamente a expressão de LAYN nestas células. Além disso, HA-HMW reprimiu a produção de MMP-1 e MMP-13 induzida por IL-1 β em condrócitos, mas foi significativamente inibido em condrócitos transfectados com siRNA contra LAYN, sugerindo que LAYN pode contribuir para a regulação das funções do HA na condição artrítica.

A molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) é outro receptor conhecido da superfície celular para HA. A ICAM-1 é induzida durante respostas inflamatórias e demonstra ser um modulador crítico do recrutamento de monócitos no tecido sinovial. Também, apresenta um papel importante no tráfego de leucócitos e aderência célula-célula em respostas imunológicas. Por essa razão, altos níveis de ICAM-1 foram encontrados na sinóvia de pacientes com OA e sua supressão no líquido sinovial é sugerida como um método eficaz para inibir a inflamação e melhorar os sintomas em OA (LAW et al., 2020). Hiramitsu et al. (2006) investigaram o papel da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e as vias de sinalização intracelular nas ações do HA. Os resultados demonstram que HA suprimiu a síntese de MMP-1 e MMP-3 intensificada por IL-1 β em fibroblastos sinoviais reumatoides (RSF) via ICAM-1 através da regulação negativa de NF- κ B e p38.

O receptor para motilidade celular mediada por HA (RHAMM), conhecido como CD168, está presente em várias isoformas, tanto na membrana celular como no citoplasma e no núcleo. O complexo HA-RHAMM de superfície desempenha um papel fundamental na ativação das vias de sinalização que envolve Src e outros complexos de proteína quinase de aderências focais. RHAMM foi encontrado intracelularmente, associado a proteínas do citoesqueleto, no núcleo, e extracelularmente associado ao receptor CD-44 (FALLACARA et al., 2018; ABATANGELO et al., 2020). Wu et al. (2018) investigaram os mecanismos de RHAMM em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS) de pacientes com AR e controle com OA, e em modelo de artrite induzida por anticorpos de colágeno (AI-AC). Os FLS-AR apresentaram expressão significativamente maior de RHAMM em comparação a FLS-OA. Além disso, a expressão de RHAMM no tecido sinovial das articulações esteve aumentada em camundongos AI-AC em relação aos controles. O silenciamento de RHAMM usando

SiRNA reduziu a produção de IL-6 e IL-8 e inibiu a migração e invasão de FLS-RA, sugerindo que RHAMM tem um papel relevante na modulação da inflamação e destruição das articulações induzidas por lipopolissacarídeo (LPS) na AR.

O receptor 1 de ácido hialurônico endotelial do vaso linfático (LYVE-1) é uma glicoproteína transmembrana de ligação a HA que compartilha semelhanças com o CD-44. LYVE-1 apresenta ampla distribuição, incluindo endotélio vascular da linfa e macrófagos (LIM et al., 2018; JACKSON et al., 2019). Sua função biológica é absorver HA do tecido para a linfa, via células endoteliais linfáticas e auxiliar na regulação do nível de hidratação do tecido. Além disso, LYVE-1 forma complexos com fatores de crescimento, prostaglandinas e outros mediadores de tecido que estão envolvidos na regulação da linfangiogênese e adesão intercelular (FALLACARA et al., 2018). LYVE-1 pode facilitar o trânsito de leucócitos e células tumorais através de vasos linfáticos com base em estudos *in vitro* com receptor recombinante em fibroblastos transfectados (LAWRANCE et al., 2016).

O receptor de ácido hialurônico para endocitose (HARE), conhecido como estabilina 2, apresenta expressão ampla incluindo células endoteliais no fígado, nódulo linfático, baço, medula óssea, olho, coração e rim. Estabilina 2 é altamente expressa nas células sinusoidais do fígado, cuja função é atuar na depuração sistêmica de HA e outros GAGs, incluindo heparina natural e infundida, e componentes da matriz extracelular (sulfato de condroitina, pró-peptídeos de colágeno, produtos finais de glicação avançada e pequenas partículas à base de fosfatidilserina). No entanto, tecidos com maior expressão de estabilina-2 (sinusóides do fígado, nódulo linfático) são considerados alvos primários de cânceres metastáticos (XUE et al., 2020).

Efeitos contraditórios do ácido hialurônico na osteoartrite

Estudos de meta-análises recentes mostraram pequeno efeito do HA-IA no alívio da dor em pacientes com OA (KNAPIK et al., 2019; ROJAS-BRIONES et al., 2017) e chances significativas de relatar eventos adversos graves (EAG) no grupo HA-IA comparado ao placebo (HONVO et al., 2019a). Uma meta-análise projetada para avaliar a segurança do HA-IA, incluiu estudos que permitiram o uso de AINEs concomitante à HA-IA. Houve um aumento significativo da probabilidade de relatar EAG com HA-IA em comparação ao placebo, tanto no geral (odds ratio [OR] = 1,78, intervalo de confiança [IC] de 95% 1,21–2,63; I² = 0%) quanto em estudos com medicação anti-OA concomitante (OR = 1,78, 95 %, IC 1,10–2,89), mas não em estudos sem medicação anti-OA concomitante (OR = 1,78, 95% CI 0,92–3,47). É provável que o AINE tenha

contribuído para a significância estatística de EAG no grupo com medicação anti-AO concomitante, porém investigações mais específicas são necessárias (HONVO et al., 2019a). He et al. (2017) compararam a eficácia e segurança de HA-IA e corticosteroide IA em pacientes com OA de joelho. Ambas as terapias foram benéficas e relativamente seguras na melhora da função do joelho, porém HA-IA causou mais EA tópicos em comparação com corticosteroides IA. Em uma recente publicação da American College of Rheumatology (ACR) e Arthritis Foundation, o HA-IA recebeu recomendação condicionalmente contra a utilização em pacientes com OA de joelho e/ou primeira articulação carpometacarpal (CMC) e fortemente contra utilização em pacientes com OA de quadril, sugerindo que a recomendação é consistente com a limitação de benefício deste tratamento na OA (KOLASINSKI et al., 2020).

Eficácia e segurança do sulfato de condroitina na osteoartrite

As evidências sobre eficácia e segurança são fornecidas geralmente para formulações de grau farmacêutico do sulfato de condroitina (pCS) (BRUYÈRE et al., 2016). Martel-Pelletier et al. (2015), em uma meta-análise de ECRs por placebo demonstrou que CS oral foi eficaz no alívio da dor e na melhora da função em pacientes com OA de joelho, porém com grande controversa entre os estudos. Ao estratificar as análises para ensaios com pCS e/ou com o fabricante do composto de origem IBSA (Condrosulf[®], Chondrosulf[®]), houve melhora na redução da dor e da função e maior consistência das evidências nos ensaios clínicos (HONVO et al., 2019b). Essas variações obtidas em ensaios clínicos podem ser decorrentes do grau de qualidade do CS que resulta em diferenças na atividade terapêutica do composto.

Reginster et al. (2017), comparou a eficácia das formulações de pCS (800 mg/dia) com colecoxibe (200 mg/dia) em um ECR. Os resultados demonstraram uma redução significativa da dor em ambos os fármacos comparado ao placebo, porém não houve diferença de eficácia entre essas prescrições na OA sintomática do joelho. Zhu et al. (2018), demonstrou em uma meta-análise de ECR que o CS foi seguro e mais eficaz em relação ao placebo no alívio da dor (WOMAC e EVA) e na melhora da função global em pacientes com OA. Gregori et al. (2018), em uma revisão sistemática e meta-análise usando fármacos para controle da dor em longo prazo para o tratamento da OA de joelho, demonstrou que a prescrição de CS teve um efeito significativo na melhora do estreitamento da estrutura articular. Estudos que avaliaram pCS na OA, relataram bom

perfil de segurança na dose de até 1200 mg/dia, sem aumento significativo de EA comparado ao placebo (BRUYÈRE et al., 2019; HONVO et al., 2019b).

A Sociedade Europeia para Aspectos Clínicos e Econômicos de Osteoporose e Osteoartrite (ESCEO, sigla em inglês) recomenda pCS como terapia de base de longo prazo na Etapa 1 como uma alternativa ao sulfato de glicosamina cristalino (pSGC) para OA de joelho. Dentre os SYSADOA recomendado, o CS é o de maior evidência (forte recomendação) em termos de eficácia terapêutica, porém essa forma prescrita deve ser diferenciada de produtos de venda livre (medicamento sem receita). A ESCEO fornece recomendação fraca para o uso combinado de CS e G. As evidências sobre eficácia dessa combinação são controversas e estudos mostram que o CS parece inibir a absorção da G quando ambos são administrados juntos (BRUYÈRE et al., 2019). A Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR, sigla em inglês) retirou CS de suas recomendações farmacológicas para o tratamento da OA, apenas sugerindo sua utilização como alternativa terapêutica, uma vez que os ECR ainda apresentam grande inconsistência sobre os benefícios terapêuticos do CS (KLOPPENBURG et al., 2019). O Colégio Americano de Reumatologia (ACR, sigla em inglês) e Fundação de Artrite em uma recente publicação apenas recomenda condicionalmente o uso de CS em pacientes com OA de mão (KOLASINSKI et al., 2020).

Farmacocinética e formulações do sulfato de condroitina

O CS é um heteropolissacarídeo linear com características semelhantes às de gel (lubrificação, retenção de água, resistência de carga), representa um percentual de 80% de todos os glicosaminoglicanos da cartilagem articular (LIN et al., 2019) e possuiu alto peso molecular variando entre 50.000 e 100.000 Da (BISHNOI et al., 2016). A produção comercial de CS é obtida através da matéria-prima terrestre de bovinos, suínos e frangos, ou fontes marinhas, como peixes cartilaginosos (tubarões e raias) (VOLPI et al., 2009; MACCARI et al., 2010). As preparações de origem animal podem causar potenciais problemas de segurança associado a presença de agentes infecciosos transmissíveis como vírus, bactérias e príons (MIRAGLIA et al., 2016), além de contaminações com outros GAGs devido a falhas durante o processo de purificação (RESTAINO et al., 2017). O CS está disponível comercialmente como produto de grau farmacêutico (pCS) e grau nutracêutico, sendo a última preparação com grandes variações na composição e/ou pureza (CHEVALIER et al., 2017; HONVO et al., 2019b). Além disso, pode ser encontrado na forma de pílula, comprimido, cápsula, pó, líquido e na forma de injeção.

Também, pode ser usado em cremes, colírios, cosméticos e em aplicações médicas com G. Não há interações conhecidas de preparações de CS com alimentos, ervas e suplementos. As recomendações diárias de CS com um bom perfil de segurança são doses de até 1200 mg por dia (BRUYÈRE et al., 2019).

CS de diferentes fontes animais podem apresentar diferenças significativas em seu peso molecular e variações na posição e porcentagem dos grupos sulfato. Em humanos, a administração oral de CS bovino aumenta principalmente as concentrações plasmáticas de Δ Di-4S e Δ Di-6S (VOLPI, 2002). No entanto, o CS de tubarão gera concentrações menores de Δ Di-4S e Δ Di-6S comparado ao CS bovino (VOLPI, 2003). Os CS podem ser absorvidos parcialmente como polissacarídeo de alto peso molecular no intestino delgado e/ou como oligossacarídeos (a maioria do CS) por catabolismo enzimático no trato distal, ceco e cólon (VOLPI et al., 2007). Os oligossacarídeos formados por despolimerização parcial e dessulfatação são gerados por enzimas hidrolítica no trato inferior do aparelho digestivo (MACCARI et al., 2016). A absorção oral de CS é relativamente rápida, apresentando biodisponibilidade oral moderada (10% - 20%) (LAUDER, 2009). A porcentagem de CS absorvido vai depender do peso molecular e sua absorção depende do grau de despolimerização pela mucosa intestinal (VOLPI, 2006). Então, assim que o CS oral atinge a articulação, ele se distribui na cartilagem e camadas subcondrais, porém a penetração no condrócito é limitada (SOUICH, 2014). Um estudo usando CS não animal (Mythocondro®, comprimidos de 800 mg, Gnosis SpA, Itália) de baixo peso molecular apresentou disponibilidade geral no plasma após 48 h de 45% em relação ao CS animal. Além disso, neste estudo o CS não animal apresentou maior absorção e aumento da 6-O- sulfatação específica da GalNAc no plasma humano em relação ao CS bovino e CS endógeno (VOLPI, 2018).

Mecanismo de ação do sulfato de condroitina na osteoartrite

O CS exerce atividades benéficas *in vitro* no metabolismo de diferentes linhagens celulares, como condrócitos, sinoviócitos, macrófagos e células do osso subcondral (BISHNOI et al., 2016). A administração exógena de CS tem sido proposta para atuar na OA por meio de vários mecanismos na sinalização celular, incluindo a promoção de efeitos anti-inflamatório, antioxidante, antiapoptótico, anticatabólico e anabólico (AJISAKA et al., 2016; CHEVALIER; CONROZIER; 2017; MOREIRA et al., 2019). O CS pode interagir com diferentes receptores para mediar efeitos biológicos nas células (Tabela 2).

Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos humanos de pacientes com OA estimulados com interleucina 13 (IL-13) e desafiado com CS, demonstrou suprimir a produção de óxido nítrico (NO) através da inibição da ativação de STAT6 e expressão de mRNA de iNOS (OKUMO et al., 2017). CS isolados da traqueia bovina, traqueia suína, esterno de frango, cartilagem de raia e preparações comerciais de CS 4- e 6-sulfato (CS-4S e CS-6S) apresentaram atividades anti-inflamatórias com eficiências diferentes sobre condrócitos (cultura primária) e macrófagos (ambos imortalizados semelhantes a macrófagos da linhagem celular RAW 264.7 e células derivadas da medula óssea). Os resultados mostraram que os CS reduziram a liberação NO e PGE 2 em condrócitos de humano e cavalo induzida por IL-1 β . Contudo, na linhagem RAW 264.7, o CS-4S e CS-6S, CS de esterno de frango e cartilagem de raia, diminuíram a liberação de TNF- α , mas não afetou IL-6 quando induzida por LPS. Porém, após a linhagem de macrófago derivada da medula óssea ser induzida por LPS, o CS-4S, CS-6S, CS da traqueia bovina e traqueia suína, reduziram a liberação de TNF- α , IL-6, IL-1 β e NO, indicando que a resposta de RAW ao CS foi diferente da obtida em macrófagos primários (CUNHA et al., 2017).

Tabela 2. Receptores de Sulfato de Condroitina

Receptores	Localização/Mecanismo	Referência
Receptores de lectina, HARE (receptor de ácido hialurônico para endocitose)	Superfície celular / As lectinas reconhecem glicoconjugado ligado a membrana e são subsequentes endocitado, degradado e envolvidos em funções celulares.	Harris E. N.; Weigel P. H., 2008
Receptor 2 e 4 semelhantes a Toll (TLR-2/4), Receptor de ácido hialurônico motilidade mediada (RHAMM) e molécula intercelular de adesão 1 (ICAM1), CD 44	Superfície celular / expressado em sinoviócitos, osteoblastos e osteócitos, media respostas, CS é internalizado na célula por meio desses receptores para induzir a resposta anti-inflamatória.	Bishnoi M. et al., 2016
Receptores Nogo, família NgR (NgR1 e NgR3)	Altamente expresso no cérebro e no fígado, implicada na inibição neuronal, ligam-se com alta afinidade para a porção glicosaminoglicana de proteoglicanos e participa na inibição de CSPG em neurônios em cultura.	Dickendesh T. L. et al., 2012

Annexin 6	No citoplasma, também existe na superfície celular/ implicado em muitos processos biológicos, incluindo proliferação celular, sobrevivência, diferenciação, inflamação e infecção viral.	Grewal T. et al., 2017
Proteína tirosina fosfatase sigma do tipo receptor (RPTP σ)	Proteína da superfície celular/ tem atividade de tirosina fosfatase intracelular e domínios extracelulares e, é essencial para regular a ativação de células imunes, produção de citocinas e inflamação.	Ohtake Y.; Saito A.; Li S., 2018

Um modelo de inflamação de OA estimulado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) para induzir apoptose em cultura primária de condrócitos foi desafiada com CS do osso do esturjão. Os resultados demonstraram que o CS aumentou a viabilidade celular, diminuiu a taxa de fragmentos de DNA e apoptose, bem como protegeu a mitocôndria e reduziu a expressão da caspase-3 e caspase-9. Esses resultados sugerem que CS do osso do esturjão melhora o dano à matriz da cartilagem via inibição de apoptose em condrócitos (LIU et al., 2019). Durante a progressão da OA, a apoptose de condrócitos está implicada com vários eventos, incluindo diminuição do número de condrócitos, redução da síntese de MEC, expressão gênica alterada com produção de citocinas pró-inflamatórias (ex. interleucina (IL) -1 β , IL-6, fator de necrose tumoral (TNF) - α) e aumento de fosfatase alcalina que resulta em calcificação anormal no osso subcondral (KUNWAR et al., 2017; LIU et al., 2019).

O CS do osso do esturjão foi investigado em um modelo animal de OA induzido por injeção IA de iodoacetato monossódico (MIA). O CS reduziu significativamente o edema articular e a lesão patológica das articulações, bem como os níveis de IL-1, TNF- α e PGE₂ no líquido sinovial. Também, foi capaz de diminuir a reversão do suporte da pata traseira e o limiar mecânico de retirada da pata causado pelo MIA. Além disso, o CS regulou negativamente o conteúdo de MMP-1 e MMP-13 e positivamente TIMP-1 em relação ao grupo controle com MIA (SUN et al., 2018).

Os macrófagos são considerados atores-chaves na patogênese da OA, uma vez que eles podem ser ativados em um fenótipo pró-inflamatório (M1) ou em um fenótipo anti-inflamatório (M2). Um estudo investigou um scaffold de colágeno funcionalizado com sulfato de condroitina em macrófagos derivados da medula óssea em condições fisiológicas e inflamadas por LPS. O scaffold foi capaz de modular o fenótipo de macrófagos inibindo a cascata LPS / CD44 / NF- κ B. Como consequência, uma regulação positiva de marcadores anti-inflamatórios (TGF- β , Arg, MRC1 e IL-10) foi encontrado

concomitante a uma diminuição na expressão de marcadores pró-inflamatórios (iNOS, TNF- α , IL-1 β , IL-12 β). Quando o scaffold foi avaliado *in vivo*, os dados confirmaram os achados *in vitro*, demonstrando uma redução significativa no número de células infiltrantes ao redor e dentro dos implantes associado a uma regulação negativa da expressão de genes pró-inflamatórios, sugerindo uma modulação imune de macrófagos para reparo tecidual (TARABALLI et al., 2016).

Em um modelo de inflamação patogênico usando linhagem de macrófagos THP-1 ativadas, o pCS inibiu significativamente a atividade de IL-1 β e fatores de transcrição NF- κ B canônico, p65, p50, c-Rel e RelB, sugerindo que a inibição da inflamação induzida por LPS e fragmentos de HA, estava ocorrendo possivelmente no nível de ativação da via NF- κ B, consistente com uma diminuição geral na atividade dos fatores de transcrição no citoplasma (STABLER et al., 2017).

Um modelo de osteoporose diabética induzida por estreptozotocina, o CS (500 mg kg⁻¹ d⁻¹) administrado por via oral melhorou os sintomas do diabetes, aumentou o peso corporal, diminuiu a ingestão de água e comida, reduziu a glicose no sangue, aumentou a densidade mineral óssea, corrigiu a morfologia óssea e diminuiu o número de osteoclastos femorais e adipócitos da tíbia. O CS também regulou os parâmetros histomorfométricos ósseos e reduziu os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e aumentou as atividades séricas de SOD, GPX, CAT e MDA. Além disso, houve redução dos níveis séricos de ALP, CTX-1, TRACP 5b, osteocalcina e RANKL, e aumentou os níveis séricos de RUNX2 e OPG, sugerindo que o CS pode prevenir a osteoporose diabética induzida por estreptozotocina pela redução da glicose no sangue, redução do estresse antioxidante, indução da atividade anti-inflamatória e regulação da expressão de OPG / RANKL (ZHENG et al., 2020).

Em outro modelo de OA induzido por ACLT, o CS de *Scophthalmus maximus* apresentou efeito protetor na cartilagem articular, reduzindo a taxa de apoptose dos condrócitos e o conteúdo de IL-1B, TNF-a, e PGE2 no líquido sinovial. O estudo mostrou que o CS regulou negativamente a expressão de MMP-1 e positivamente a expressão do inibidor tecidual da MMP-1, sugerindo atividade anti-inflamatória promissora no tratamento de OA (REN et al., 2017). Usando um modelo de ratas ovariectomizadas, Terêncio et al. (2016) demonstraram que a administração combinada de CS + glicosamina diariamente protegeu a degradação da cartilagem e reduziu os níveis de mediadores inflamatórios incluindo IL-1 β e TNF- α . Além disso, houve redução significativa de outros

biomarcadores de inflamação e degradação como MMP-3, C-telopeptídeo de colágeno tipo II e ativador do receptor do ligante κ B/osteoprotegerina.

Efeitos contraditórios do sulfato de condroitina na osteoartrite

As informações atuais baseadas em evidências demonstram que o pCS tem um bom perfil de segurança, porém relatam EAG semelhante ao colecoxibe, comumente associado a EAG quando usado em longo prazo pelos pacientes com OA (PELLETIER et al., 2016; HOCHBERG et al., 2016). Estudos de meta-análises recentes são controversos em relação a eficácia do CS no alívio da dor em pacientes com OA (VASILIADIS; TSIKOPOULOS, 2017. ROJAS-BRIONES et al., 2017; MANTOVANI et al., 2018; KNAPIK et al., 2019). Em virtude disso, a ACR e Arthritis Foundation recomenda fortemente contra o uso de CS em pacientes com OA de joelho e/ou quadril, assim como produtos de combinação que incluem CS e G (KOLASINSKI et al., 2020).

Eficácia e segurança da glicosamina na osteoartrite

A glicosamina (G) é um amino açúcar com peso molecular de 197,2 Da, utilizado na biossíntese de proteoglicanos, responsável por manter a integridade e a função da cartilagem articular (HENROTIN et al., 2014). Veronese et al. (2020), em um estudo de revisão da literatura, o GS modificou positivamente a estrutura da cartilagem, melhorou a função física e reduziu a dor do WOMAC e EVA, demonstrando segurança na dose de 1500 mg / diária. Contudo, esses efeitos clínicos do GS foram observados principalmente em indivíduos com OA de joelho (OGATA et al., 2018; VERONESE et al., 2020). Gregori et al. (2018), em uma meta-análise de rede usando medicamentos para o controle da dor a longo prazo na OA de joelho, verificou que a formulação patenteada de sulfato de glicosamina cristalino (pCGS) foi a única que teve um efeito significativo concomitante na melhora da estrutura articular e da dor em 12 meses.

Sobre o potencial do GS superativar a via da hexosamina, responsável pela resistência à insulina, um estudo em 2017 incluindo 407 mulheres com sobrepeso e obesas não mostrou efeito significativo do nível médio da hemoglobina glicosilada, durante o período de 2,5 anos com uso de GS (GOMMANS et al., 2017). Esses resultados corroboram com um grande estudo que analisou 404.508 participantes do UK Biobank, mostrando que o uso do GS em OA está associado a uma menor incidência de DM2 ao longo de 8 anos de acompanhamento (MA et al., 2020). Usando essa mesma base de dados, o GS reduziu a incidência de doenças cardiovasculares (MA et al., 2019) e

diminuiu a mortalidade geral e específicas por doenças cardiovasculares, câncer, doenças respiratórias e digestivas através de um grande estudo de coorte prospectivo durante um acompanhamento médio de 8,9 anos (LI et al., 2020). Esses efeitos protetores estão associados às propriedades anti-inflamatórias da G, embora a base molecular não esteja totalmente esclarecida (HERRERO-BEUAMONT; LARGO, 2020).

Evidências de ensaios clínicos de longo prazo mostram que pCGS pode atrasar mudanças estruturais articulares e reduzir a necessidade de analgesia adicional com AINEs. Além disso, pCGS pode reduzir significativamente mais de 50% dos custos associados a medicamentos, consultas e exames de saúde ao longo de 12 meses (BRUYÈRE et al., 2016). O grupo de trabalho da ECSEO apoiada por diferentes graus de certeza de evidência, recomenda fortemente o uso de pCGS de grau farmacêutico como Etapa 1 da terapia de base para OA de joelho, e desencoraja o uso de outras formulações de G (BRUYÈRE et al., 2019). A ARC e Arthritis Foundation também recomenda fortemente o uso de G em pacientes com OA de joelho, quadril e / ou mão (KOLASINSKI et al., 2020).

Farmacocinética e formulações da glicosamina

As preparações de glicosamina são extraídas da quitina (casca de crustáceos) por hidrólise ácida ou sintetizada quimicamente em laboratório. Devido ser uma base orgânica fraca que deve ser inicialmente estabilizada como um sal. Existem três formas comuns de G no mercado: cloridrato de glicosamina (da casca de carangueijo), sulfato de glicosamina (da casca de camarão) e N-acetil glicosamina (sintetizado quimicamente) (NAGAOKA et al., 2012). As dosagens de G diária recomendada geralmente variam de 1250 mg a 1500 mg. A farmacocinética do sulfato de glicosamina (GS) em voluntários saudáveis foi linear no intervalo de dose de 750-1500 mg, mas não na dose de 3.000 mg, devido não haver aumento da concentração plasmática com bases no aumento proporcional da dose. A absorção ocorre rapidamente com um t_{max} de cerca de 3h, e a meia-vida de eliminação foi estimada em 15h após a dosagem oral (PERSIANI et al., 2005).

Em voluntários saudáveis uma dosagem oral única de 1500 mg de pCGS produz aproximadamente uma concentração plasmática de 10 μ M (KUCHARZ et al., 2016), enquanto hidróxido de G na dose de 1500 mg produz 2,7 μ M, e tomando-se 3 doses de 500 mg/dia produz uma concentração plasmática de 1,2 μ M (SAENGNIPIANTHAKUL et al., 2017). A farmacocinética clínica da administração de dose oral de cloridrato de G

demonstrou ser biodisponível na sinóvia e no soro de beagles e cavalos (ADEBOWALE et al., 2002; LAVERTY et al., 2005). O GS radiomarcado em humano foi estimado em 88,7% (v. o.) de absorção, encontrando 11,3% da radioatividade nas fezes. Especulou-se que o efeito de primeira passagem causaria a perda pré-sistêmica do composto, resultando em uma biodisponibilidade do produto em 26-44% (SETNIKAR et al., 1993). No entanto, estudos posteriores demonstram que o intestino é responsável pela perda pré-sistêmica da G, apresentando apenas 19% de biodisponibilidade após administração usando rato como modelo de estudo (IBRAHIM et al., 2012).

Dentro das células epiteliais intestinais, a glicosamina é fosforilada para formar glicosamina-6-fosfato, que posteriormente entra na via biosintética da hexosamina para formar proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídios (ANDERSON et al., 2005). Os estudos *in vitro* sobre a absorção intestinal do ácido glicurônico revelaram que os transportadores envolvidos são aqueles que facilitam a absorção de glicose (GLUT1, 2 e 4), sendo a absorção com GLUT2 com afinidade 20 vezes maior para G do que para glicose (ULDRY et al., 2002; JUNG et al., 2016), embora apresente capacidade de transporte limitada do composto em altas concentrações (PERSIANI et al., 2005).

Mecanismo de ação da glicosamina na osteoartrite

A G é um constituinte natural dos GAGs da cartilagem e líquido sinovial e quando administrado exogenamente pode exercer efeitos anti-inflamatórios na cartilagem articular (BRUYÈRE et al., 2016). O principal efeito da G ocorre pela redução da translocação nuclear de NF κ B e pela inibição da transcrição de genes proteolíticos e alvo pró-inflamatórios. São relatados vários mecanismos que contribuem para o declínio induzido por G em NF- κ B (SOUICH, 2014; AL-SAADI et al., 2019). A diminuição da ativação de NF- κ B aumenta a metilação do promotor de genes pró-inflamatórios levando a redução da sua transcrição (GIRIDHARAN; SRINIVASAN, 2018). A G também induz a síntese de HA e C4S e C6S, o que contribui indiretamente para as propriedades anti-inflamatórias da G na OA. Devido a presença de transportadores GLUT na membrana celular, a G pode ser capaz de penetrar em sinoviócitos, osteoblastos e osteoclastos para mediar seus efeitos anti-inflamatórios (SOUICH, 2014).

Estudos relatam que a G é capaz de reduzir a expressão de metaloproteinases (MMPs) em linhagens celulares de condrócitos e osteossarcoma (IGARASHI et al., 2016; POHLIG et al., 2016), aumentar a expressão de colágeno tipo II (COL2A1) e a proteína SIRT1, um gene regulador de COL2A1 (IGARASHI et al., 2016). O COL2A1 é o

principal componente da matriz da cartilagem e sua degradação e diminuição pode resultar na progressão da OA, acelerando a hipertrofia de condrócitos no processo fisiopatológico da OA (IGARASHI et al., 2016). Evidências apontam que o cloridrato de G oral suprimiu o inflamassoma NLRP3 e o precursor IL-1 β , contribuindo para a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação de NF- κ B em macrófagos de camundongos e humanos ativados por polissacarídeos (LPS). Além disso, a G interferiu na ligação da proteína quinase (PKR) ativada por RNA de fita dupla, proteína quinase 7 (NEK7) envolvida na ativação de NLRP3 e na formação do complexo NLRP3/ACS. O efeito anti-inflamatório da G também foi constatado pela redução do influxo de neutrófilos peritoneais e redução das concentrações de IL-1 β , IL-6 MCP-1 e TNF- α em modelo de camundongo de peritonite mediada por cristal de ácido úrico (CHIU et al., 2019).

A G é capaz de promover autofagia de condrócitos como mecanismo reparador natural durante o dano celular para remover células defeituosas da cartilagem. Embora as evidências da G sobre a autofagia de condrócitos sejam escassas, estudos mostram que a G induz autofagia em condrócitos primários da cartilagem humana normal (LUO et al., 2019) e em osteoblastos da linhagem hFOB1.19 (CHEN et al., 2018a). Em condrócitos humanos quando a G é exposta por curto prazo (2h), ativa autofagia; porém, quando exposta por um longo prazo (24h), altera a resposta autofágica e induz apoptose (KANG et al 2015). Por sua vez, em linhagem celular de osteoblasto (hFOB1.19) foi demonstrado que a G em baixas concentrações (<0,6 mM) induziu a proliferação celular, enquanto em concentrações mais altas (>0,8 mM) induziu apoptose. Esse mesmo estudo sugeriu que a G induziu a autofagia da linhagem hFOB1.19 em paralelo com a fosforilação de m-TOR e pela ativação da proteína quinase ativada por 5 'adenosina monofosfato (AMPK) e inibição pela via mTOR em células epiteliais de pigmento retinal humano (CHEN et al., 2018b).

A sinalização da resposta proteica não dobrada (UPR) apresenta um papel fisiológico implicando na maturação normal de condrócitos, osteoblastos e na patogênese da OA. Estudos relatam que a indução de estresse no RE pode ser citoprotetora ou citotóxica pela ativação de apoptose em doenças renais. Dessa forma, a apoptose pode interagir de maneira coordenada com a autofagia para aliviar o dobramento incorreto de proteínas (CYBULSKY et al., 2017). Até o momento nenhum estudo demonstrou o papel do estresse do RE induzido pela G ou da sinalização de UPR na OA. Contudo, estudos têm mostrado que induzir o estresse do RE pode ser benéfico para atrasar o início da OA.

No entanto, quando a doença está estabelecida, o estresse do RE não desempenha papel importante no prognóstico da OA (KUNG et al., 2019). Um estudo relatou que níveis elevados de G (5 mM) induz o estresse no RE por interferirem com a biossíntese de oligossacarídeos ligados a lipídios e N-ligados de glicosilação. Contudo, essa via pode estar relacionada com complicações diabéticas, incluindo aterosclerose e esteatose hepática (BERIAULT et al., 2017). Diante disso, são necessários mais estudos investigando o efeito da G no eixo UPR/ estresse do ER/ autofagia, uma vez que eles podem ser futuros alvos terapêuticos para os pacientes com OA.

A G e seus derivados podem inibir a diferenciação osteoclástica (TAKEUCHI et al., 2017; LAMBERTINI et al., 2021), aumentar a diferenciação condrogênica (YAO et al., 2017; KASHIUCHI et al., 2019) e a proliferação de células-tronco (AGRAWAL et al., 2018). Uma modificação do grupo amino da G para produzir N-acrilóil-ácido glicurônico (AGA) demonstrou superar a toxicidade da G em altas concentrações (2 e 5 mM) e aumentar os efeitos positivos na diferenciação condrogênica em linhagem celular ATDC5. Um hidrogel à base de polietileno glicol enxertado com N-acrilóil-glicosamina desempenhou um papel importante na diferenciação condrogênica de células-tronco mesenquimais de osso humano (hBMSCS) e aumentou significativamente marcadores de COL II e agrecano (proteína central de proteoglicano específico da cartilagem) (YAO et al., 2017).

Um produto de hidrólise composto principalmente por G (80,00%) e quitooligossacarídeos (9,80%) denominado “GC”, foi investigado nas concentrações de 40, 80 e 160 mg/kg por 15 dias em um modelo animal de OA. Os resultados mostraram uma redução significativa da expressão sérica de citocinas pró-inflamatória IL-1 β , IL-6, TNF- α , e aumento significativo da citocina anti-inflamatória IL-2 em comparação com o grupo controle. Também, houve redução dos níveis de proteína C reativa (PCR), diminuição do inchaço das articulações e melhora dos sintomas típicos da doença no grupo tratado com o produto de hidrólise, sugerindo forte efeito anti-inflamatório e potencial como agente terapêutico contra OA (LI et al., 2018). O pCGS foi investigado em um sistema de cocultura 2D/3D com osteoclastos primários humanos (hOCS) e osteoblastos (hOBs) de pacientes com OA e indivíduos saudáveis. Os resultados mostraram que o tratamento com pCGS exibiu um efeito positivo na atividade de osteoblastos. Os hOCS isolados de pacientes com OA foram mais sensíveis em comparação com aqueles de doadores saudáveis. Além disso, G exibiu efeitos anabólicos em hOCS tanto em cultura de células

convencionais 2D quanto em co-cultura dinâmica hOC / hOB 3D (LAMBERTIN et al., 2021).

Alguns estudos usando modelos animais (WALY et al., 2017; SANCHES et al., 2018) e humanos (CEN et al., 2018) reportaram efeitos anti-inflamatórios da G na osteoartrite. A G administrada em diferentes concentrações reduziu significativamente a expressão sérica de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF β -1, proteína C reativa (PCR) e aumentou níveis de citocinas anti-inflamatória IL-2 e IL-10 em modelos animais de OA (WALY et al., 2017; LI et al., 2018). Em um ECR por placebo, pacientes com OA de joelho foram randomizados em um grupo controle tratado com colecoxibe (200 mg / kg / dia) e um grupo de estudo tratado com GS (500 mg / kg) durante 8 semanas. O grupo de estudo teve níveis séricos de TNF- α , IL-1 e PGE2 significativamente reduzidos comparado com o grupo controle. Além disso, a atividade de SOD foi significativamente maior em pacientes que receberam GS e os escores de EVA e WOMAC estiveram baixos, sugerindo benefícios do GS na redução do dano oxidativo na cartilagem e melhora da dor (GANG et al., 2019).

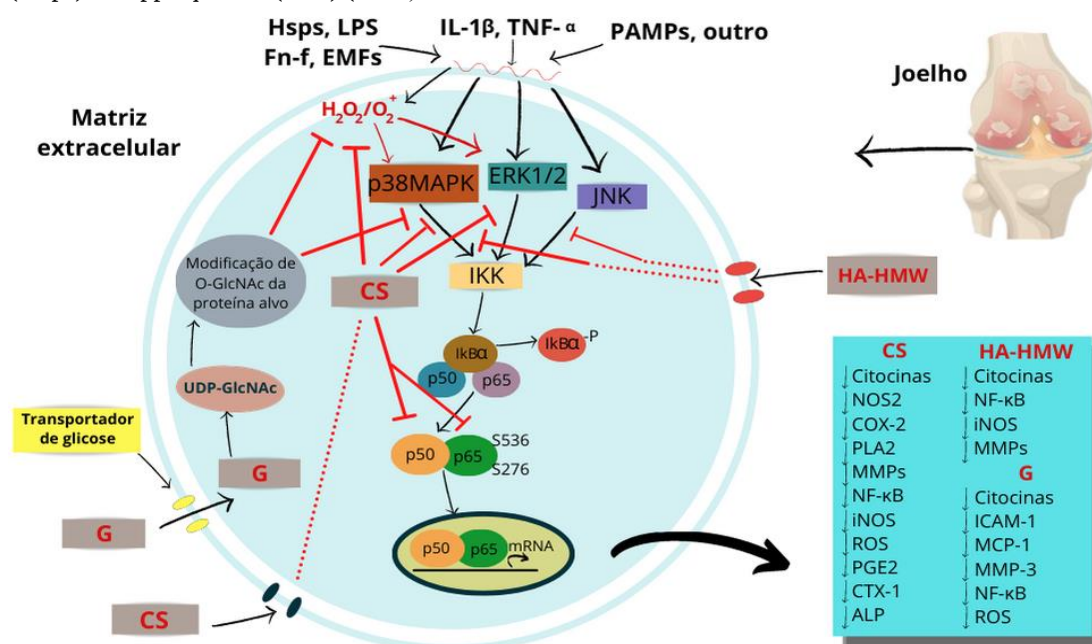
Efeitos contraditórios da glicosamina na osteoartrite

Estudos de meta-análise mostram que a G promove efeito insignificante na OA (HARRISON-MUÑOZ et al., 2017; RUNHAAR et al., 2017) ou pequeno efeito da G no alívio da dor em pacientes com OA (GREGORI et al., 2018; LIU et al., 2018). Em um ECR a terapia combinada (CS 1200 mg/dia + GS 1500 mg/dia) ou (CS 1200 mg/dia + cloridrato de G 1500 mg/dia) não previnem o dano estrutural nem reduzem a expressão de mediadores pró-inflamatórios e degradativos da matriz em tecidos articulares, assim como a densidade mineral óssea subcondral em coelhos com OA (ROMAN-BLAS et al., 2017). Simental-Mendía et al. (2018) em um ECR mostrou que a terapia combinada CS/GS não foi superior ao placebo no controle da dor e limitação funcional em pacientes com OA de joelho por mais de 6 meses de tratamento. Além disso, nenhuma das terapias ou sua combinação tiveram efeitos positivos significativos no WOMAC total e seus subescores comparado ao placebo. Apesar da suplementação oral com G e/ou CS demonstrar redução da dor na OA do joelho, ainda não existe comprovação de efeito adicional usando ambos os agentes terapêuticos no tratamento da OA sintomática do joelho. Em virtude disso, a ACR e a Fundação de Artrite recomendam fortemente contra o uso da combinação CS e G (KOLASINSKI et al., 2020).

Efeito de SYSADOAs em vias inflamatórias da OA

A ativação de interleucina 1 beta (IL-1 β) em condrócitos, por exemplo, leva a fosforilação e ativação da quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (ERK1/2), proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38MAPK) e c-Jun N-quinases terminais (JNK) (ZHOU et al., 2020). Estas proteínas quinases fosforilam a I κ B quinase (IKK) que irá fosforilar e inativar o inibidor κ B α (I κ B α) que está formando um complexo com o heterodímero p65/p50 ou fator nuclear- κ B (NF- κ B) no citosol. Como consequência da inativação de I κ B α , o NF- κ B é liberado e inicia a translocação para o núcleo. O dímero NF- κ B liga-se aos sítios κ B dentro dos promotores/potenciadores de genes alvos, regulando a transcrição de uma variedade de genes envolvidos na inflamação, imunidade, apoptose, proliferação e diferenciação celular (SOUICH; VALLIÈRES, 2010). Os SYSADOAs atuam principalmente por meio da redução da translocação nuclear de NF- κ B. Em virtude dessa redução, as expressões de muitas proteínas são reduzidas, como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), tumor fator de necrose- α (TNF- α) e enzimas, como fosfolipase A2 (PLA2), óxido nítrico sintetase-2 (NOS2), ciclooxigenase 2 (COX-2), e metaloproteases de matriz (MMPs) (Figura 1).

Fig. 1. Mecanismo de atividade anti-inflamatória de SYSADOAs com vias inflamatórias da OA. [Espécie reativa de oxigénio (ROS), prostaglandina E2 (PGE2), C-telopeptídeo (CTX-1), fosfatase alcalina (ALP), molécula de adesão intercelular 1(ICAM1), proteína quimiotática de monócitos – 1 (MCP-1), metaloproteinasas de matriz-3 (MMP-3), proteína C-reativa (PCR), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fragmentos de matriz extracelular (EMFs), fragmentos de fibronectina (Fn-f), proteínas de choque térmico (SHps), I-kappa quinase (IKK) (I κ B α)]



Fonte: Adaptada de Vallières; Souich, 2010

Novas Perspectivas de tratamento

Devido à natureza crônica da OA os estudos prospectivos com fármacos capazes de modificar a estrutura articular, reduzir a dor e aumentar a função da articulação de forma segura, continua sendo medidas desejadas para o manejo da OA, especialmente, nos estágios iniciais da doença, antes de grandes alterações estruturais e funcionais na unidade osteocondral (GOLDRING; GOLDRING, 2016). Até o momento a farmacoterapia para OA apresentou pouca progressão, principalmente para o paracetamol, AINEs (tópicos e orais) e opioides, que são amplamente usados para alívio dos sintomas da OA. Além disso, nenhum desses medicamentos se mostraram capazes de modificar a progressão da OA e prevenir a incapacidade de longo prazo. Por essa razão, a Food and Drug Administration (FDA) considerou a OA como uma doença grave com necessidades médicas ainda não atendida (LATOURTE et al., 2020). Dentre as novas abordagens para a OA, destacam-se as terapias apresentadas na tabela 1.

O fator de crescimento nervoso (NGF) estimula o crescimento de fibras nervosas nociceptivas e a expressão de receptores nociceptivos de superfície celular, promovendo múltiplas vias de sinalização da dor que leva à dor nociceptiva (SHANG et al., 2017). Tanezumab é um anticorpo monoclonal IgG tipo 2 humanizado produzido pela Pfizer e Eli Lilly com alta especificidade de ligação para NGF (CHEN et al., 2017). Já o Fasinumab é um anticorpo monoclonal recombinante, totalmente humano, IgG4 anti-NGF, desenvolvido para o tratamento da dor na OA.

A capsaicina é um alcaloide pungente da pimenta (*Capsicum annuum*) usada como terapia tópica para tratamento de dor que se origina da atividade anormal da fibra nociceptiva (fibra da dor) ao nível da pele (CAMPBELL et al., 2021). CNTX-4975 é uma trans-capsaicina sintética altamente purificada que demonstrou melhorar a dor, a rigidez do joelho e a função física em indivíduos com dor moderada a grave OA no joelho. Os testes de fase III da capsaicina estão em andamento (STEVENS, 2018a e b).

Sprifermina ou fator de crescimento de fibroblasto humano recombinante-18 (rhFGF18) tem como alvo os receptores FGFR3 na cartilagem articular, demonstrando aumentar a espessura da cartilagem em algumas sub-regiões específicas da cartilagem femorotibial e melhorar as lesões da medula óssea (ROEMER et al., 2016). Investigações tem relatado Sprifermina como potencial medicamento modificador da doença para a osteoartrite (REKER et al., 2016; GHOURI; CONAGHAN, 2020). Atualmente, estudos em fase III são aguardados.

A via de sinalização Wnt na cartilagem foi associada a progressão da patogênese da OA em estudos pré-clínicos, demonstrando modular tanto a diferenciação de osteoblastos e condrócitos quanto a produção de proteases catabólicas. Um novo inibidor da via Wnt, Lorecivivint (anteriormente conhecido como SM04690) induziu a condrogênese e demonstrou inibir a destruição da articulação em um modelo de OA (DESHMUKH et al., 2018). Testes de fase III ainda estão em andamento para avaliação de resultados clínicos e radiográficos de lorecivivint.

FX006 é uma formulação de triancinolona de acetona de liberação estendida a base de microesferas (TA-ER) proposta para manter analgesia prolongada na OA de joelho. TA-ER proporcionou melhora significativa em 12 semanas na intensidade média de dor diária, com um perfil de segurança comparado a placebo (CONAGHAN et al., 2018). As injeções de corticosteroides intra-articular apresentam eficácia, contudo os benefícios são de curta duração. Recentemente o TA-ER foi licenciado pela FDA (GHOURI A.; CONAGHAN, 2020).

A interleucina-1 (IL-1) é um indutor altamente potente da degradação da cartilagem, mediando a biodisponibilidade de proteases como ADAMTS5 e MMP13. Além disso, pode estimular a sinovite e induzir genes relevantes no processo fisiopatológico da OA (VINCENT, 2019). O lutikizumabe (anteriormente, ABT-981) é uma imunoglobulina humana de domínio variável duplo direcionado à interleucina-1 β e IL-1 (KLOPPENBURG et al., 2017). Porém, ainda há incerteza quanto à eficácia clínica do lutikizumab na OA de joelho.

O aumento da idade configura um dos fatores de risco mais proeminente para o desenvolvimento da OA (LOESER et al., 2016). No estudo da UNITY biotechnology em 2020, UBX0101 apesar de segura, em estudo de fase II, não apresentou nenhuma alteração da linha de base nos escores de função, que é uma medida estabelecida de dor na OA. A terapia genética é proposta como um método alternativo para a entrega direcionada e sustentada de agentes terapêuticos, genes e componentes reguladores como microRNAs em células na sinóvia e/ou cartilagem (GROL; LEE, 2018). Condrócitos humanos halogênicos geneticamente modificados que expressam TGF- β 1 (TissueGene-C ou TG-C) foi associado a uma melhora significativa comparado ao placebo na pontuação total do Comitê Internacional de Documentação do Joelho (IKDC) e categorias individuais, e na pontuação da Escala Visual Analógica (EVA) em 26, 39 e 52 semanas. Além disso, os escores WOMAC e a Pontuação de Resultado de Lesões no Joelho e Osteoartrite também melhoraram com TG-C em relação ao placebo (KIM et al., 2018).

Tabela 3. Novas Perspectivas Terapêuticas para Osteoartrite

Alvos	Terapias	Fase clínica	Eficácia	Segurança
Direcionadas a dor	Tanezumab (2,5 e 5 mg) Fasinumab (1, 3, 6 ou 9 mg)	Fase III	Eficazes no alívio da dor	Altas doses desenvolvem OA rapidamente progressiva (Dakin et al., 2019; Berenbaum et al., 2020)
	Capsaicina (CNTX-4975, 1,0 mg)	Fase II	Eficaz no alívio da dor	Eventos adversos leves a moderados (Stevens et al., 2017)
	Sprifermina (rhFGF18, 100 µg)	Fase II	Aumenta a espessura da cartilagem femorotibial	Bom perfil de segurança (Hochberg et al., 2018)
Direcionadas ao osso e cartilagem	Inibidor da via Wnt (Iorecivint, 0,23 mg)	Fase IIb	Melhorias em scores funcionais, dor e avaliação global do paciente	Bom perfil de segurança (Ghouri A.; Conaghan, 2020)
	Corticosteróide (TA-ER, 32 mg)	Fase IIb	Melhorias em scores funcionais, dor, rigidez e pontuação da lesão no joelho	Bom perfil de segurança (Licenciado pela FDA) (Yazici et al., 2019)
Terapias Imunomoduladoras				
Terapias visando a senescência e o envelhecimento	UBX0101 (0,5 mg, 2,0 mg ou 4,0 mg)	Fase II	Não teve eficácia nessas doses	Bom perfil de segurança (Kloppenburg et al., 2017)
Terapias Genéticas	Condrócitos humanos halogênicos geneticamente modificado que expressam TGF-β1 (TissueGene-C)	Fase III	Melhorias na escala visual analógica, scores internacionais e funcionais	Eventos adversos leves a moderados (Kim et al., 2018)

6. CONCLUSÕES FINAIS

Em conclusão, o CS-A (100 mg/kg), CS-C (100 mg/kg) e FCS (100 mg/kg) conseguiram induzir analgesia, aumentaram a atividade motora e reduziram a migração de leucócitos de camundongos osteoartríticos de forma significativa em relação ao grupo controle. Além disso, a análise histopatológica e morfométrica revelaram um aumento significativo da cartilagem sobre a tíbia, mas não sobre o fêmur. Com base no Score OARSI, o CS-A e FCS foram capazes de reduzir a gravidade da OA, e o CS-A ainda foi capaz de aumentar significativamente a expressão de IL-10 na cartilagem articular. Assim, o FCS de *H. grisea* provou ser um excelente candidato ao tratamento da OA. De acordo com os resultados obtidos foi verificado que o padrão de sulfatação dos diferentes condroitins sulfato influenciam na sua atividade anti-inflamatória, analgésica e condroprotetora na osteoartrite. Contudo mais estudos devem ser realizados para melhor elucidar os mecanismos de ação dessas moléculas na patogenia da osteoartrite.

As evidências sobre eficácia e segurança desses SYSADOAs na OA são satisfatórias, especialmente para preparações altamente purificadas de pCS, pCGS e HA. As variações na composição e/ou pureza de formulações comerciais podem justificar a falta de eficácia de algumas preparações. Dessa forma, é recomendado o uso de preparações altamente purificadas em testes pré-clínicos e clínicos. Contudo, estudos com qualidade de evidência continuam sendo fatores limitantes para recomendação desses SYSADOAs no tratamento da OA. Atualmente, novos medicamentos promissores incluindo abordagens direcionadas a dor, ao osso e cartilagem, imunomoduladoras, visando a senescência e o envelhecimento, e terapia genética, estão no rol de novas perspectivas terapêuticas contra OA, porém, faz-se necessário estudos clínicos posteriores para comprovação da eficácia e segurança desses medicamentos no tratamento farmacológico da OA.

Agradecimentos

Os autores VASS e MTSC, RMX, PASM e MGCC agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas de mestrado (processo 132489/2020-1) e de pesquisa, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ABATANGELO, G.; VINDIGNI, V.; AVRUCSIO, G.; PANDIS, L.; BRUN, P. Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. **Cells**, v.9, 2020.
- ABDULKHALEQ, L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; HEZMEE, M. N. ZM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Vet. World**. v. 11, p. 627–635, 2018.
- AGRAWAL, P.; PRAMANIK, K.; BISWAS, A. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells on silk fibroin: chitosan–glucosamine CSaffold in dynamic culture. **Regenerative medicine**, v. 13, 2018.
- AJISAKA, K.; BIOCHEM, B. B. Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, p.1179–1185, 2016.
- AJISAKA, K.; OYANAGI, Y.; MIYAZAKI, T.; SUZUKI, Y. Effect of the chelation of metal cation on the antioxidant activity of chondroitin sulfates. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 80, p.1179–1185, 2016.
- AL-SAAD, H. M.; PANG, K.; IMA-NIRWANA, S.; CHIN, K. Multifaceted Protective Role of Glucosamine against Osteoarthritis: Review of Its Molecular Mechanisms. **CSi. Pharm.**, v. 87, 2019.
- ALTMAN R.; BEDI A.; MANJOO, A.; NIAZI, F.; SHAW, P.; MEASE, P. Anti-Inflammatory Effects of Intra-Articular Hyaluronic Acid: A Systematic Review. **Cartilage**. v.10, p.43–52, Jan, 2019.
- ALTMAN, R.; HACKEL, J.; NIAZI, F.; SHAW, P.; NICHOLLS, M. Efficacy and safety of repeated courses of hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis: A systematic review. **Eminars in Arthritis and Rheumatism**. v.48, p.168–175, 2018.
- AMARASEKARA, D. S.; YUN, H.; KIM, S.; LEE, N.; KIM, H. H.; RHO J. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks, **Immune Network**, v.18, 2018.
- ANSARIA, M. Y.; AHMADA, N.; HAQQI, T. M. Oxidative Stress and Inflammation in Osteoarthritis Pathogenesis: Role of Polyphenols. **Biomed Pharmacother**. v. 129, p. 110452. 2020.
- ARMSTRONG, S. A.; HERR M. J. Physiology, Nociception. **StatPearls [Internet]**, 2021.
- ASHMAWI, H. A.; FREIRE G. M. G. Peripheral and central sensitization. **Rev. Dor**, v.17, S31-4, 2016.
- ASQUITH, D. L.; MILLER, A. M.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y. Animal models of rheumatoid arthritis. **European J. of Immunology**, v. 39, p. 2040-2044, 2009.

- BAJIC, G.; YATIME, L.; KLOS, A.; ANDERSEN G. R. As anafilatoxinas humanas C3a e C3a desArg têm estruturas conservadas, em contraste com C5a e C5a desArg. **Protein Science**, v. 22, p. 204-212, 2013.
- BALBINOT-ALFARO, E.; ROCHA, M.; ALFARO, A. T.; MARTINS, V. G. Properties, bioactive potential and extraction processes of glycosaminoglycans: an overview. *Rural CSience*, v.51, 2021.
- BALBINOT-ALFARO, E.; Rocha, M.; Alfaro, A. T.; Martins, V. G. Properties, bioactive potential and extraction processes of glycosaminoglycans: an overview. **BIOLOGY, Cienc. Rural**, v. 51, n. 7, 2021.
- BALOGH, L.; POLYAK, A.; MATHE, D.; KIRALY, R.; THUROCZY, J.; TEREZ, M.; JANOKI, G.; TING, Y.; BUCCI, L. R.; CSHAUSS, A. G. Absorption, Uptake and Tissue Affinity of High-Molecular-Weight Hyaluronan after Oral Administration in Rats and Dogs. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, p.10582–10593, 2008.
- BANNURU R. R.; OSANI, M. C.; VAYSBROT, E. E.; ARDEN, N. K.; BENNELL, K.; BIERMA-ZEINSTRA, S. M. A.; KRAUS, V. B.; LOHMANDER, L. S.; ABBOTT, J. H.; BHANDARI, M.; BLANCO, F. J.; ESPINOSA, R.; HAUGEN, L. K.; LIN, J.; MANDL, L. A.; MOILANEN, E.; NAKAMURA, N.; SNYDER-MACKLER, L.; TROJIAN, T.; UNDERWOOD, M.; MCALINDON, T. E. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**. v.27, p.1578-1589, 2019.
- BANNURU R. R.; OSANI, M.; VAYSBROT, E. E.; MCALINDON, T. E. Comparative safety profile of hyaluronic acid products for knee osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, I. 12, p.2022-2041, 2016.
- BASSLEER, C. T.; COMBAL, J. P.; BOUGARET, S.; MAL-ESTAR, M. Effects of chondroitin sulfate and interleukin-1 beta on human articular chondrocytes cultivated in clusters. **Osteoarthritis Cartilage**. v.6, p.196–204, 1998a.
- BEDINI, E.; LAEZZA, A.; IADONISI, A. Chemical Derivatization of Sulfated Glycosaminoglycans. **Eur. J. Org. Chem.**, v.18, p.3018–3043, 2016.
- BERENBAUM, F.; BLANCO, F. J.; GUERMAZI, A.; MIKI, K.; YAMABE, T.; VIKTRUP, L.; JUNOR, R.; CAREY, W.; BROWN, M. T.; OESTE, C. R.; VERBURG, K. M. Subcutaneous tanezumab for osteoarthritis of the hip or knee: efficacy and safety results from a 24-week randomised phase III study with a 24-week follow-up period. **Ann Rheum Dis.**, v.79, p.800–810, 2020.
- BERENBAUM, F.; GRIFKA, J.; CAZZANIGA, S.; D'AMATO, M.; GIACOVELLI, G.; CHEVALIER, X.; RANNOU, F.; ROVATI, L. C.; MAHEU, E. A randomised, double-blind, controlled trial comparing two intra-articular hyaluronic acid preparations differing by their molecular weight in symptomatic knee osteoarthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 71, p.1454–1460, Set, 2012.
- BERIAULT R. D.; DANG, V. T.; ZHONG, L. H.; PETLURA, C. I.; MCALPINE, C. S.; SHI, Y.; WERSTUCK, G. H. Glucosamine induces ER stress by disrupting lipid-

linked oligosaccharide biosynthesis and N-linked protein glycosylation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 312, p. 48–57, 2017.

- BIRDWHISTELL, K. E.; KARUMBIAIAH, L.; FRANKLIN, S. P. Sustained Release of Transforming Growth Factor- β 1 from Platelet-Rich Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan Gels. **J. Knee Surg.**, v.31, p.410–415, 2018.
- BISHNOI M.; JAIN, A.; HURKAT, P.; JAIN, S. K. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis. **Glycoconjugate Journal**, v. 33, p. 693–705, 2016.
- BISHNOI, M.; JAIN, A.; HURKAT, P.; JAIN S. K. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis. **Glycoconj J.**, v. 33, p. 693-705, 2016.
- BLANCO, A.; BLANCO, G. Chapter 4-Carbohydrates. In: Blanco A., Blanco G., editors. Medical Biochemistry. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2017. pp. 73–97.
- BONO, P.; CORDERO, E.; JOHNSON, K.; BOROWSKY, M.; RAMESH, V.; JACKS, T.; HYNES, R. O. Layilin, a Cell Surface Hyaluronan Receptor, Interacts With Merlin and Radixin. **Exp Cell Res.**, v. 308, p.177–87, 2005.
- BOROWSKY, ML.; HYNES, RO. Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type lectins, is localized in membrane ruffles. **J. Cell Biol.**, v.143, p.429–42, 1998.
- BORSIG, L.; WANG, L.; CAVALCANTE, M. C. M.; CARDILO-REIS, L.; FERREIRA, P. L.; MOURÃO, P. A. S.; ESKO, J. D.; PAVÃO, M. S. G. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 14984-14991, 2007.
- BOVE, S. E.; CALCATERRA, S. L.; BROOKER, R. M.; HUBER, C. M.; GUZMAN, R. E.; JUNEUA, P. L.; CSHRIER, D. J.; KILGORE, K. S. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compound SD in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. **Osteoarthr Cartil.**, v. 11, p. 821–830, 2003.
- Brasil. Ministério da Fazenda. Secretaria de Previdência. Acompanhamento Mensal dos Benefícios Auxílios-Doença Previdenciários Concedidos segundo os Códigos da CID-10 - janeiro a dezembro de 2017 [acesso em 03 abril 2018]. Disponível em: http://www.previdencia.gov.br/wpcontent/uploads/2018/03/Auxilio-Doen%C3%A7a-Previdenciario_2017_completo_CID.pdf
- BRESSAN, E.; CUNHA, F. Q.; TONUSSIA, C. R. Contribution of TNF α , IL-1 β and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. **Cytokine**, v. 36, p. 83-89, 2006.
- BRUYERE, O.; COOPER, C.; PELLETIER, J. P.; BRANCO, J.; BRANDI, M. L.; GUILLEMIN, F.; HOCHBERG, M. C.; KANIS, J. A.; KVIEN, T. K.; MARTEL-PELLETIER, J.; RIZZOLI, R.; SILVERMAN, S.; REGISTRE, J. An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: a report from a task force of the European Society for Clinical and

Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ECSEO). **Semin Arthritis Rheum**, v.44, p.253–63, 2014.

- BRUYÈRE, O.; HONVO, G.; VERONESE, N.; ARDEN, N. K.; BRANCO, J.; CURTIS, E. M.; AL-DAGHRI, N. M.; HERRERO-BEUAMONT, G.; MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P.; RANNOU, F.; RIZZOLI, R.; ROTH, R.; UEBELHART, D.; COOPER, C.; REGISTRE, J. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. v. 45, p. S12-S17, 2016.
- BRUYÈRE, O.; HONVO, G.; VERONESE, N.; ARDEN, N. K.; BRANCO, J.; CURTIS, E. M.; AL-DAGHRI, N. M.; HERRERO-BEUAMONT, G.; MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J.; RANNOU, F.; RIZZOLI, R.; ROTH, R.; UEBELHART, D.; COOPER, C.; REGINSTER J. An updated algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ECSEO). **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 49, p. 337-350, 2019.
- BRYK, M.; CHWASTEK, J.; MŁOST, J.; KOSTRZEWA, M.; STAROWICZ, K. Sodium Monoiodoacetate Dose-Dependent Changes in Matrix Metalloproteinases and Inflammatory Components as Prognostic Factors for the Progression of Osteoarthritis. **Front. Pharmacol**, 2021.
- BUITRAGO, M. M.; CSHULZ, J. B.; DICHGANS, J.; LUFT, A. R. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 81, p.211–216, 2004.
- BURTON, V. J.; BUTLER, L. M.; MCGETTRICK, H. M.; STONE, P. C.; JEFFERY, H. C.; SAVAGE, C. O.; RAINGER, G. E.; NASH, G. B. Delay of migrating leukocytes by the basement membrane deposited by endothelial cells in long-term culture. **Exp Cell Res.**, v. 317, p. 276–292, 2011.
- CAI, G.; AITKEN, D.; LASLETT, L. L.; PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; HILL, C.; MARCH, L.; WLUKA, A. E.; WANG, Y.; ANTONY, B.; BLIZZARD, L.; WINZENBERG, T.; CICUTTINI, F.; JONES, G. Effect of Intravenous Zoledronic Acid on Tibiofemoral Cartilage Volume Among Patients With Knee Osteoarthritis With Bone Marrow Lesions. **JAMA**, v.21, p.1456–1466, 2020.
- CAMPBELL, J. N.; STEVENS, R.; HANSON, P.; CONNOLLY, J.; MESKE, D. S.; CHUNG, M. K.; LACSELLES, B. D. X. Injectable Capsaicin for the Management of Pain Due to Osteoarthritis. **Molecules**. v.26, Feb, 2021.
- CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, A.; TREINA, P.; D'ACSOLA, A.; CALATRONI, A. Glycosaminoglycans reduced inflammatory response by modulating toll-like receptor-4 in LPS-stimulated chondrocytes. *Arch Biochem Biophys*, v. 491, p.7–15, 2009b.
- CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; D'ACSOLA, A.; TRAINA, P.; CALATRONI, A. Chondroitin-4-sulphate inhibits NF- κ B translocation and

caspase activation in collagen-induced arthritis in mice. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, p. 1474-1483, 2008.

CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; D'ACSOLA, A.; TREINA, P.; SAMÁ, D.; CALATRONI, A. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. **J Cell Biochem**. v.106, p.83–92, 2009a.

CAMPO, G. M.; CAMPO, S.; AVENOSO, A.; NASTASI, G.; MICALI, A.; PRESTIPINO, V.; VACCARO, M.; D'ACSOLA, A.; CALATRONI, A. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**. v. 1812, p.1170-1181, 2011.

CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; D'ACSOLA, A.; PRESTIPINO, V.; CSURUCHI, M.; NASTASI, G.; CALATRONI, A.; CAMPO, S..Inhibition of hyaluronan synthesis reduced inflammatory response in mouse synovial fibroblasts subjected to collagen-induced arthritis. **Arch Biochem Biophys**, v.1, p.42-52, Feb, 2012.

CARR, F. B.; ZACHARIOU, V. Neural circuits underlying emotion and motivation: Insights from optogenetics and pharmacogenetics. **Front. Behav. Neurosci**. 2014.
CEN, X.; LIU, Y.; WANG, S.; YANG, X.; SHI, Z.; LIANG, X. Glucosamine oral administration as an adjunct to hyaluronic acid injection in treating temporomandibular joint osteoarthritis. **Oral Dis.**, v.24, p.404–411, 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) Prevalence of Doctor-Diagnosed Arthritis and Arthritis-Attributable Activity Limitation — United States, 2010–2012 -**MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**, v.62 , p. 869 – 873, 2013.

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. QAUntitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci. Methods**, v.53, p.55-63, 1994.

CHEN L. V.; WANG, LU; ZHU, X.; LIN, W.; CHEN, X.; HAUNG, Z.; HAUNG, L.; YANG, S. Glucosamine promotes osteoblast proliferation by modulating autophagy via the mammalian target of rapamycin pathway. **Biomed. Pharmacother**, v. 99, p. 271–277, 2018a.

CHEN, C. L.; CHEN, Y.; LIANG, C. M.; TAI, M.; LU, D. W.; CHEN, J. Glucosamine-Induced Autophagy through AMPK–mTOR Pathway AttenAUtes LipofuCSin-Like AutofluoreCSence in Human Retinal Pigment Epithelial Cells In Vitro. **Int. J. Mol. Sci**. v. 19, 1416, 2018b.

CHEN, J.; LI, J.; LI, R.; WANG, H.; YANG, J.; XU, J.; ZHA, Z. Efficacy and Safety of Tanezumab on Osteoarthritis Knee and Hip Pains: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Pain Med**. v. 18, p. 374-385, 2017.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, 2018.

- CHEVALIER, X.; CONROZIER T. Access to Highly Purified Chondroitin Sulfate for Appropriate Treatment of Osteoarthritis: A Review. **Med Access @ Point Care**, v.1, p. 134- 144, 2017.
- CHEVALIER, X.; CONROZIER, T. et al. Access to Highly Purified Chondroitin Sulfate for Appropriate Treatment of Osteoarthritis: A Review. **Med Access @ Point Care**, v. 1, p. 134-144, 2017.
- CHIU, H. W.; LI, L. H.; SHIEH, C.; RAO, Y. k.; CHEN, F.; CHEN, A.; KA, S.; HAU, K. F. Glucosamine inhibits IL-1 β expression by preserving mitochondrial integrity and disrupting assembly of the NLRP3 inflammasome. **Sci. Rep.**, v. 9, 2019.
- CHOW; CHIN. The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**, 2020.
- CIANCIA, M.; FERNÁNDEZ, P. V.; LELIAERTET, F. Diversity of sulfated polysaccharides from cell walls of coenocytic green algae and their structural relationships in view of green algal evolution. **Frontiers in plant Science**. v. 11, 2020.
- CLEMENTI, D.; D'AMBROSI, R.; BERTOCCO, P.; BUCCI, M. S.; CARDILE, C.; RAGNI, P.; GIAFFREDA, G.; RAGONE, V. Efficacy of a single intra-articular injection of ultra-high molecular weight hyaluronic acid for hip osteoarthritis: a randomized controlled study. **European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology**, v.28, p.915-922, 2018.
- COLLINO, M.; CASTIGLIA, S.; MANONI, M.; SALSINI, L.; CHINI, J.; MASINI, E.; FANTOZZI, R. Effects of a semi-synthetic N-, O-sulfated glycosaminoglycan K5 polysaccharide derivative in a rat model of cerebral ischaemia/ reperfusion injury. **Thromb Haemost**, v. 102, p. 837–845, 2009.
- CONAGHAN, P. G.; COHEN, S. B.; BERENBAUM, F.; LUFKIN, J.; JOHNSON, J. R.; BODICK, N. Brief Report: A Phase IIb Trial of a Novel Extended-Release Microsphere Formulation of Triamcinolone Acetonide for Intraarticular Injection in Knee Osteoarthritis. **Arthritis Rheumatol**, v.70, p.204–211, 2018.
- CONAGHAN, P. G.; COHEN, S. B.; BERENBAUM, F.; LUFKIN, J.; JOHNSON, J. R.; BODICK, N. Brief Report: A Phase IIb Trial of a Novel Extended-Release Microsphere Formulation of Triamcinolone Acetonide for Intraarticular Injection in Knee Osteoarthritis. **Arthritis Rheumatol**. v.70, p.204–211, 2018.
- CONCOFF, A.; SANCHETI, P.; NIAZI, F.; SHAW, P.; ROSEN, J. The efficacy of multiple versus single hyaluronic acid injections: a systematic review and meta-analysis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.18, n.542, 2017.
- COOPER, C.; CHAPURLAT, R.; AL-DAGHRI, N.; HERRERO-BEUMONT, G.; BRUYÈRE, O.; RANNOU, F.; ROTH, R.; UEBELHART, D.; REGINSTER, J. Safety of oral non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis: What does the literature say? **Drugs Aging**, v.36, p.15–24, 2019.

- COOPER, C.; RANNOU, F.; RICHETTE, P.; BRUYÈRE, O.; DAGHRI, N. A.; ALTMAN, R. D.; BRANDI, M. L.; BASSET, S. C.; HERRERO-BEUAMONT, G.; MIGLIORE, A.; PAVELKA, K.; UEBELHART, D.; REGISTRE, J. Use of intraarticular hyaluronic acid in the management of knee osteoarthritis in clinical practice. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 69, p. 1287-1296, 2017.
- COPE, P. J.; OURRADI, K.; LI, Y.; SHARIF, M. Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 27, p. 230–239, 2019.
- CÓRDOVA, M. M.; MARTINS, D. F.; SILVA, M. D.; BAGGIO, C. H.; CARBONERO, E. R.; RUTHES, A. C.; IACOMINID, M.; SANTOS, A. R. S. Polysaccharide glucomannan isolated from *Heterodermia obscurata* attenuates acute and chronic pain in mice. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 2058-2064, 2013.
- CORRADETTI, B.; TARABALLI, F.; MINARDI, S.; EPS, J. V.; CABRERA, F.; FRANCIS, L. W.; GAZZE, S. A.; FERRARI, M.; WEINER, B. K.; TASCIOTTI, E. Chondroitin Sulfate Immobilized on a Biomimetic CSaffold Modulates Inflammation While Driving Chondrogenesis. **Stem Cells Transl Med**. v.5, p. 670–682, 2016.
- COSTA, D. S.; REIS, R. L.; PASHKULEVA, I. Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 19, p. 1-26, 2017.
- CRAMP, F. The role of non-pharmacological interventions in the management of rheumatoid-arthritis-related fatigue, **Rheumatology**, v. 58, p. v22–v28, 2019.
- 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. **Ann Rheum Dis**, v. 73, p. 1323-1330, 2014.
- CSHIEKER, M.; CONAGHAN, P. G.; MINDEHOLM, L.; PRAESTGAARD, J.; SOLOMON, D. H.; CSOTTI, C.; GRAM, HERMAN; THUREN, T.; ROUBENOFF, E.; RIDKER, P. M. Effects of Interleukin-1 β Inhibition on Incident Hip and Knee Replacement: Exploratory Analyses From a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Ann Intern Med**, v.6, p.509-515, 2020.
- CSHIEKER, M.; Mindeholm, L.; PRAESTGAARD, J.; CSOTTI, C.; SOLOMON, D.; THUREN, T.; DREYER, K.; ROUBENOFF, R.; RIDKER, P. M. Interleukin-1 β Inhibition with Canakinumab Associates with Reduced Rates of Total Hip and Knee Replacement (THR/TKR) and Osteoarthritis (OA) Symptoms: Exploratory Results from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). **2018 ACR/ARHP Annual Meeting**, 2018.
- CSHMIDT, B. L.; HAMAMOTO, D. T.; SIMONE, D. A.; WILCOX, G. L. Mechanism of cancer pain. **Molecular interventions**, v. 10, n. 164, 2010.

- CUCCHIARINI, M.; GIROLAMO, L.; FILARDO, G.; OLIVEIRA, J. M.; ORTH, P.; PAPE, D.; REBOUL, P. Basic CSience of osteoarthritis. **J. Exp. Orthop.** v.3, n.22, 2016.
- CUNHA, A. L.; AGUIAR, J. A. K.; SILVA, F. S. C.; MICHELACCI, Y. M. Do Chondroitin Sulfates With Different Structures Have Different Activities on Chondrocytes and Macrophages? **Int. J. Biol Macromol**, v.103: p.1019-1031, 2017.
- CUONG, H. D.; THUY, T. T. T.; HUONG, T. T.; LY, B. M.; VAN, T. T. T. Structure and Hypolipidaemic Activity of Fucoidan Extracted from Brown Seaweed *Sargassum Henslowianum*. **Nat. Prod. Res.**, v.29, p.411–415, 2015.
- CYBULSKY, A. V. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. **Nat. Ver. Nephrol**, p.681-696, 2017.
- D'ADAMO, S.; CETRULLO, S.; PANICHI, V.; MARIANI, E.; FLAMIGNI, F.; BORZI, R. M. Nutraceutical Activity in Osteoarthritis Biology: A Focus on the Nutrigenomic Role. **Cells**, v. 9, 2020.
- DAI, W.; QI, C.; WANG, S. Synergistic effect of glucosamine and vitamin E against experimental rheumatoid arthritis in neonatal rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 835-840, 2018.
- DAKIN, P.; MARTINO, S. J. D.; GAO, H.; MALONEY, J.; KIVITZ, A. J.; SCHNITZER, T. J.; STAHL, N.; YANCOPOULOS, G. D.; GEBA, G. P. The Efficacy, Tolerability, and Joint Safety of Fasinumab in Osteoarthritis Pain: A Phase IIb/III Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. **Arthritis Rheumatol.** v.71, p.1824–1834, 2019.
- DAKIN, P.; MARTINO, S. J. D.; GAO, H.; MALONEY, J.; KIVITZ, A. J.; SCHNITZER, T. J.; STAHL, N.; YANCOPOULOS, G. D.; GEBA, G. P. The Efficacy, Tolerability, and Joint Safety of Fasinumab in Osteoarthritis Pain: A Phase IIb/III Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Clinical Trial. **Arthritis Rheumatol.** v.71, p.1824–1834, 2019.
- DEKKERS, W. Pain as a Subjective and Objective Phenomenon. **Handbook of the Philosophy of Medicine**, p. 169-187, 2017.
- DESHMUKH, V. HU, H.; BARROGA, C.; BOSSARD, C.; KC. S.; DELLAMARY, L.; STEWART, J.; CHIU, K.; IBANEZ, M.; PEDRAZA, M.; SEO, T.; DO, L.; CHO, S.; CAHIWAT, J.; TAM, B.; TAMBIAH, J.; J, C.; NE, P.; YAZICI, Y. A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee. **Osteoarthritis Cartilage**, v.26, p.18-27, 2018.
- DESHMUKH, V.; O'GREEN, A.; BOSSARD, C.; SEO, T.; LAMANGAN, L.; IBANEZ, M.; GHIAS, A.; LAI, C.; L, D.; CHO, S.; CAHIWAT, J.; CHIU, K.; PEDRAZA, M.; ANDERSON, S.; HARRIS, R.; DELLAMARY, L.; KC, S.; BARROGA, C.; MELCHIOR, B.; TAM, B.; KENNEDY, S.; JAMBIAH, J.; J, C.; YAZICI, Y. Modulation of the Wnt pathway through inhibition of CLK2 and DYRK1A by

lorecivivint as a novel, potentially disease-modifying approach for knee osteoarthritis treatment. **Osteoarthritis Cartilage**, v.27, p.1347-1360, 2019.

DESHPANDE, B. R.; KATZ, J. N.; SOLOMON, D. H.; YELIN, E. H.; HUNTER, D. J.; MESSIER, S. P.; SUTER, L. G.; LOSINA, E. Number of Persons With Symptomatic Knee Osteoarthritis in the US: Impact of Race and Ethnicity, Age, Sex, and Obesity. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 68, p. 1743–1750, 2016.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Front. Mol. Neurosci.**, 2017.

DICKENDESHER, T. L.; BALDWIN, K. T.; MIRONOVA, Y. A.; KORIYAMA, Y.; RAIKER, S. J.; ASKEW, K. L.; MADEIRA, A.; GEOFFROY, C. G.; ZHENG, B.; LIEPMANN, C. D.; KATAGIRI, Y.; BENOWITZ, L. I.; GELLER, H. M.; GIGER, R. J. NgR1 and NgR3 are receptors for chondroitin sulfate proteoglycans. **Nat. Neurosci**, v.15, p.703–712, 2012.

DONNELLY, P. E.; CHEN, T.; FINCH, A.; BRIAL, C.; MAHER, S. A.; TORZILLI, P. A. Photocrosslinked tyramine-substituted hyaluronate hydrogels with tunable mechanical properties improve immediate tissue-hydrogel interfacial strength in articular cartilage. **J. Biomater. Sci. Polym.** v. 28, p. 582–600, 2017.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J. Clin. Invest**, v. 120, p. 3760–3772, 2010.

DUTTARROY, A. K. Evidence-Based Nutrition and Clinical Evidence of Bioactive Foods in Human Health and Disease. Chapter 10 - Polysaccharides and their bioactivity and biomedical applications. p. 139-154, 2021.

DZOBO, K.; THOMFORD, N. E.; SENTHEBANE, D. A.; SHIPANGA, H.; ROWE, A.; DANDARA, C.; PILLAY, M.; MOTAUNG, K. S. C. M. Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. **Stem Cells Int.**, v.30, 2018.

EBRAHIMI-HOSSEINZADEH, B.; PEDRAM, M.; HATAMIAN-ZARMI, A.; SALASHHOUR-KORDESTANI, S.; RASTI, M.; MOKHTARI-HOSSEINI, Z. B.; MIR-DERIKVAND, M. In vivo evaluation of gelatin/hyaluronic acid nanofiber as burn wound healing and its comparison with ChitoHeal gel. **Fibers Polym**, v.17, p. 820-826, 2016.

EITNER, A.; HOFMANN, G. O.; SCHAIBLE, H. Mechanisms of Osteoarthritic Pain. Studies in Humans and Experimental Models. **Front. Mol. Neurosci.**, 2017.

ELLISON, D. L. Physiology of Pain. Critical care nursing cliniCS of North America, 2017.

EMERY, J. G.; MCDONNELL, P.; BURKE, M. B.; DEEN, K. C.; LYN, C.; SILVERMAN, C.; DUL, E.; APPELBAUM, E. R.; EICHMAN, C.; DIPRINZIO, R.; DODSD, R. A.; JAMES, I. E.; ROSENBERG, M.; LEE, J. C.; YOUNG, P. R. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p.14363–14367, 1998.

- EVANS, C. H.; GHIVIZZANI, S. C.; ROBBINS, P. D. Gene delivery to joints by intra-articular injection. *Hum. Gene Ther.*, v.29, p.2–14, 2018.
- EVANS, K. E.; FOX S. W. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biol.*, v. 19, 2007.
- EWALD, C. Y. Drug CSreening Implicates Chondroitin Sulfate as a Potential Longevity Pill. *Frontiers in Aging*, v.2, 2021.
- FALLACARA, A.; BALDINI, E.; MANFREDINI, S.; VERTAUNI, S. Hyaluronic acid in the Third Millennium. *Polymers*, v.10, 2018.
- FEIZERFAN, A.; SHEH, G. Transition from acute to chronic pain. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, v. 15, 2015.
- FLEICSHMANN, R.; BLIDDAL, H.; BRANCO, F.; SCHNITZER, T.; PETERFY, C.; CHEN, S.; WANG, L.; CONAGHAN, P.; BERENBAUM, F.; PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; VAETERLEIN, O.; LIU, W.; COBRANÇA, G.; ZHANG, L.; MEDE, J.; LEVESQUE, M. SAT0575 Safety and efficacy of lutikizumab (ABT-981), an anti-interleukin-1 alpha/beta dAUI variable domain (DVD) immunoglobulin, in subjects with knee osteoarthritis: results from the randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group phase 2 trial. *Osteoarthritis*, 2018.
- FONSECA, R. J.C.; MOURÃO, P. A. S. Pharmacological Activities of Sulfated Fucose-Rich Polysaccharides after Oral Administration: Perspectives for the Development of New Carbohydrate-Based Drugs. *Mar. Drugs*, v. 19, n. 425, 2021.
- FONSECA, R. J.C.; SUCUPIRA, I. D.; OLIVEIRA, S. N. M.C.G.; SANTOS, G. R.C.; MOURÃO, P. A.S. Improved anticoagulant effect of fucosylated chondroitin sulfate orally administered as gastro-resistant tablets. *Thromb Haemost.*, v.117, p.662–670, 2017.
- GANG, D.; XIAGAUNG, C.; KANGHAU, Y.; AIPING, W.; GAUNGXAUN, Z. Combined effect of celecoxib and glucosamine sulfate on inflammatory factors and oxidative stress indicators in patients with knee osteoarthritis. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. v.18, p.397-402, 2019.
- GAO, X.; MA, Y.; ZHANG, G.; TANG, F.; ZHANG, J.; CAO, J.; LIU, C. Targeted elimination of intracellular reactive oxygen species using nanoparticle-like chitosan- superoxide dismutase conjugate for treatment of monoiodoacetate-induced osteoarthritis. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 590, 2020.
- GAO, Y.; SUN, Y.; YANG, H.; QIU, P.; CONG, Z.; ZOU, Y.; SONG, L.; GUO, J.; ANASTASSIADES, T. P. Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Derivative Accelerates Excisional Wound Healing by Modulating Pro-Inflammation, Promoting Epithelialization and Neovascularization, and Remodeling Collagen. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 20, n.3722, 2019.

- GHOURI, A.; CONAGHAN, P. G. Prospects for Therapies in Osteoarthritis. **Calcified Tissue International**, v. 109, p.339-350. 2020.
- GIRIDHARAN, S.; SRINIVASAN, M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. **J. Inflamm Res.**, v.11, p. 407–419, 2018.
- GIRISH, KS; KEMPARAJU, K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. **Life Sci.** v.80, p.1921–1943, 2007.
- GLYN-JONES, S.; PALMER, A. J. Osteoarthritis. **Lancet**, v.386, p.76–87, 2015.
- GNYLORYBOV, A. M.; TER-VARTANIAN, S. K.; GOLOVACH, I. Y.; VYRVA, O. E.; BURIANOV, O. A.; YESIRKEPOVA, G. S.; IRISMETOV, M. E.; RIZAMUHAMEDOVA, M. Z.; VARDANYAN, V. S.; GINOSYAN, K. V. Expert Opinion on the Extensive Use of PreCSription Crystalline Glucosamine Sulfate in the Multimodal Treatment of Osteoarthritis in Ukraine, KazakSHtan, Uzbekistan, and Armenia. **Clinical Medicine Insights: Arthritis and Musculoskeletal Disorders**, v. 13, p.1–9, 2020.
- GOCMEN, G.; GONUL, O.; OKTAY, N. S.; YARAT, A.; GOKER, K. The antioxidant and anti-inflammatory efficiency of hyaluronic acid after third molar extraction. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.43, p.1033-1037, 2015.
- GOLDRING S. R.; GOLDRING M. B. Prospects for Therapies in Osteoarthritis. **Calcified Tissue International**, 2020.
- GOLDRING, S. R.; GOLDRING, M.B. Changes in the Osteochondral Unit During Osteoarthritis: Structure, Function and Cartilage-Bone Crosstalk. **Nat. Rev. Rheumatol.** v.12 p.632–44, 2016.
- GOMMANS, Y. M.; RUNHAAR, J.; JACOBS, M. L.; BIERMA-ZEINSTRA, S. M. The Effect of Prolonged Glucosamine Usage on HbA1c Levels and New-Onset Diabetes Mellitus in Overweight and Obese Middle-Aged Women. **Am J. Med.**, v.130, p. 731-737, 2017.
- GREGORI, D.; GIACOVELLI, G.; MINTO, C.; BARBETTA, B.; GAULTIERI, F.; AZZOLINA, D.; VAGHI, P.; ROVATI, L. C. Association of Pharmacological Treatments With Long-term Pain Control in Patients With Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. **Br. J. Sports Med.** v.52, p.167-175, 2018.
- GREGORI, D.; GIACOVELLI, G.; MINTO, C.; BARBETTA, B.; GAULTIERI, F.; AZZOLINA, D.; VAGHI, P.; ROVATI, L. C. Association of Pharmacological Treatments With Long-term Pain Control in Patients With Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. **JAMA**, v.320, p.2564–2579. 2018.
- GREWAL, T.; HOQUE, M.; CONWAY, J. R. W.; REVERTER, M.; WAHBA, M.; BEEVI, S. S.; TIMPSON, P.; ENRICH, C.; RENTERO, C. Annexin A6-A multifunctional CSaffold in cell motility. **Cell Adhesion & Migration**, v. 11, I. 3, 2017.
- GROL, M. W.; LEE, B. H. Gene therapy for repair and regeneration of bone and cartilage. **Curr. Opin. Pharmacol**, v.40, p. 59–66, 2018.

- GUNAYDIN, C.; SIRRI BILGE S. Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs at the Molecular Level. **Eurasian J Med.** v. 50, p.116–121, 2018.
- GUPTA, G.S. Animal lectins: form. Function and Clinical Applications, Form, Function and Clinical Applications. **Springer**, 2012a.
- GUPTA, R. C. Nutraceuticals in arthritis. In: Gupta RC. Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity. **Amsterdam: Academic Press/Elsevier**, p.161–76, 2016.
- GUPTA, R. C.; LALL, R.; SRIVASTAVA, A.; SINHÁ, A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. **Front Vet. Sci.** v.6, 2019b.
- GUPTA, R. C.; SRIVASTAVA, A.; LALL, R. Nutraceuticals in arthritis. In: Gupta RC, Srivastava A, Lall R. editors. Nutraceuticals in Veterinary Medicine. **Cham: Springer Nature**. p.365–85, 2019.
- HAIJ-MIRZAIAN, A.; GUERMAZI, A.; ROEMER, F. W.; BOWES, M. A.; CONAGHAN, P. G.; DEMEHRI, S. Bisphosphonates intake and its association with changes of periarticular bone area and three-dimensional shape: data from the Osteoarthritis Initiative (OAI). **Osteoarthritis Cartilage**, v.26, p.564-568, 2018.
- HANNOODEE S.; NASURUDDIN D. N. Acute Inflammatory Response, **StatPearls** [Internet], 2020.
- HARRIS, E. N.; WEIGEL, P. H. The ligand-binding profile of HARE: hyaluronan and chondroitin sulfates A, C, and D bind to overlapping sites distinct from the sites for heparin, acetylated low-density lipoprotein, dermatan sulfate, and CS-E. **Glycobiology**, v.18, p.638-48, 2008.
- HARRISON-MUÑOZ, S.; ROJAS-BRIONES, V.; Irarrázaval S. Is glucosamine effective for osteoarthritis? **Medwave**. v. 15, 2017.
- HASEGAWA, M.; YOSHID, T.; SUDO, A. Tenascin-C in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.
- HAUNG, Z.; STABLER, T.; PEI, F.; KRAUS, V. B. Both systemic and local lipopolysaccharide (LPS) burden are associated with knee OA severity and inflammation. **Osteoarthritis Cartilage**. v.24, p.1769-1775, 2016.
- HAYASHI, K.; MIKI K.; KAJIYAMA, H.; IKEMOTO, T.; YUKIOKA, M. Impact of Non-steroidal Anti-inflammatory Drug Administration for 12 Months on Renal Function. **Front. Pain Res.**, 2021.
- HAYASHI, S.; KAMEI, N.; IKUTA, Y.; SHIMIZU, R.; ISHIKAWA, M.; ADACHI, N.; OCHI, M. Chondrocyte Cell-Sheet Transplantation for Treating Monoiodoacetate-Induced Arthritis in Rats. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 23, N. 6, 2017.
- HAYASHI. D-Glucosamine contributes to cell membrane stability and regenerative medicine. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, p.75–77, 2020.

- HAYDER, J.; CHAOUCH, M. A.; AMIRA, N.; MANSOUR, M. B.; MAJDOUB, H.; CHAUBET F.; MAAROUFI, R. M. Co-immobilization of chitosan and dermatan sulfate from raja montagui skin on polyethylene ter-ephthalate surfaces: Characterization and antibiofilm activity. **Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.** v. 67, p. 277–287, 2018.
- HE, W.; KAUNG, M. J.; ZHAO, J.; SUN, L.; LU, B.; WANG, Y.; MA, J.; MA, X. Efficacy and safety of intraarticular hyaluronic acid and corticosteroid for knee osteoarthritis: A meta-analysis. **Int J. Surg.**, v. 39, p. 95-103, 2017.
- HEEBA, G.H.; MORSY, M. A. Fucoidan Ameliorates Steatohepatitis and Insulin Resistance by Suppressing Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines in Experimental Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v.40, p.907–914, 2015.
- HELBERT, W. Marine Polysaccharide Sulfatases. **Front. Mar. Sci.**, 2017.
- HELDIN, P.; LIN, C. Y.; KOLLIPOULOS, C.; CHEN, Y.; SKANDALIS, S. S. SKANDALIS, S.S. Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production. **Matrix Biol.**, 2018.
- HENROTIN Y, MOBASHERI A, MARTY M. What is the current status of chondroitin sulfate and glucosamine for the treatment of knee osteoarthritis? **Maturitas**, v.78, p.184–7, 2014.
- HENROTIN, Y.; MATHY, M.; SANCHEZ, C.; LAMBERT, C. Chondroitin Sulfate in the Treatment of Osteoarthritis: From in Vitro Studies to Clinical Recommendations. **Ther Adv Musculoskelet Dis.**, v.2, p.335–348, 2010.
- HENROTIN, Y.; MATHY, M.; SANCHEZ, C.; LAMBERT, C. Chondroitin Sulfate in the Treatment of Osteoarthritis: From in Vitro Studies to Clinical Recommendations. **Ther. Adv. Musculoskelet Dis.**, v.2, p. 335-348, 2010.
- HERMANS, J.; BIERMA-ZEINSTRAS, S. M. A.; BOS, P. K.; NIESTEN, D. D.; VERHAAR, J. A. N.; REIJMAN, M. The effectiveness of high molecular weight hyaluronic acid for knee osteoarthritis in patients in the working age: a randomised controlled trial. **BMC Musculoskeletal Disorders**, 2019.
- HERRERO-BEUAMONT, G.; LARGO, R. Glucosamine and O-GAcylation: a novel immunometabolic therapeutic target for OA and chronic, low-grade systemic inflammation? **Ann Rheum Dis.**, v. 79, n. 10, 2020.
- HIDALGO, A.; PEIRED, A. J.; VESTWEBER, M. W. D.; FRENETTE, P. S. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. **Immunity**. v. 26, p. 477-489, 2007.
- HIRAMITSU, T.; YASUDA, T.; ITO, H.; SHIMIZU, M.; JULOVI, S. M.; KAKINUMA, T.; AKIYOSHI, M.; YOSHIDA, M.; NAKAMURA, T. Intercellular adhesion molecule-1 mediates the inhibitory effects of hyaluronan on interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinase production in rheumatoid synovial fibroblasts via down-regulation of NF- κ B and p38. **Rheumatology**, v. 45, p. 824–832, 2006.

- HISADA, N.; SATSU, H.; MORI, A.; TOTSUKA, M.; KAMEI, J.; NOZAWA, T.; SHIMIZU, M. Low-molecular-weight hyaluronan permeates through human intestinal Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 72, p.1111–1114, 2008.
- HOCHBERG M. C. Structure-modifying effects of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of 2-year duration. **Osteoarthritis Cartilage**, v.18, S28 - 31, 2010.
- HOCHBERG, M. C.; MARTEL-PELLETIER, J.; MONFORT, J.; MÖLLER, I.; CASTILLO, J. R.; ARDEN, N.; BERENBAUM, F.; BLANCO, F. J.; CONAGHAN, P. G.; DOMÉNECH, G.; HENROTIN, Y.; PAP, T.; RICHETTE, P.; SAWITZKE, A.; SOUICH, P.; PELLETIER, J. Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib. **Ann Rheum Dis**. v.75, p.37–44. 2015.
- HOCHBERG, M. CHEVALIER, X.; HENROTIN, Y.; HUNTER, D. J.; UEBELHART, D. Symptom and structure modification in osteoarthritis with pharmaceutical-grade chondroitin sulfate: what's the evidence? **Current Medical Research & Opinion**. v.29, p.259–267, 2013.
- HONVO, G.; BRUYÈRE, O.; GEERINCK, A.; VERONESE, N.; REGISTRE, J. Efficacy of Chondroitin Sulfate in Patients with Knee Osteoarthritis: A Comprehensive Meta-Analysis Exploring Inconsistencies in Randomized, Placebo-Controlled Trials. **Adv Ther**, v. 36, p. 1085–1099, 2019b.
- HONVO, G.; REGINSTER, J.; RANNOU, F.; RYGAERT, X.; GEERINCK, A.; RABENDA, V.; MCALINDON, T.; CHARLES, A.; FUGGLE, N.; COOPER, C.; CURTIS, E.; ARDEN, N.; AVOAUC, B.; BRUYÈRE, O. Safety of Intra-articular Hyaluronic Acid Injections in Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis. **Drugs & Aging**. v.36, p.101–127, 2019.
- HONVO, G.; REGISTRE, J.; RANNOU, F.; RYGAERTY, X.; GEERINCK, A.; RABENDA, V.; MCALINDON, T.; CARLOS, A.; FUGGLE, N.; COOPER, C.; CURTIS, E.; ARDEN, N.; AVOAUC, B.; BRUYÈRE, O. Safety of Intra-articular Hyaluronic Acid Injections in Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis. **Drugs & Aging**, v.36, p.101–127, 2019a.
- HOOTMAN, J. M.; HELMIK, C. G.; BARBOUR, K. E.; THEIS K. A.; BORING, M. A. Updated projected prevalence of self-reported doctor-diagnosed arthritis and arthritis-attributable activity limitation among US adults, 2015–2040. **Arthritis Rheumatol**, v. 68, p.1582–1587, 2016.
- HOURI-HADDAD, Y.; SOSKOLNE, W. A.; HALABI, A.; SHAPIRA, L. IL-10 gene transfer attenuates P. gingivalis-induced inflammation. **J Dent Res**, v. 86, p. 560–564, 2007.
- HUI, J. H.; CHAN, S.; LI, J.; GOH, J. C. H.; LI, L.; REN, X. F.; LEE, E. H. Intra-articular delivery of chondroitin sulfate for the treatment of joint defects in rabbit model. **J Mol Hist**, v. 38, p. 483-489, 2007.

- HUNTER, D. J.; BIERMA-ZEINSTRA, S. Osteoarthritis. **Lancet**, v. 393, p. 1745–1759, 2019.
- HUNTER, D. J.; BIERMA-ZEINSTRA, S. Osteoarthritis. **Lancet**, v. 393, p. 1745–1759, 2019.
- HYNES, R. O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, p. 11–25, 1992.
- IBRAHIM, A.; GILZAD-KOHAN, M. H.; AGHAZADEH-HABASHI, A.; JAMALI, F. Absorption and Bioavailability of Glucosamine in the Rat. **J Pharm Sci.** v.101, p. 2574-83, 2012.
- IGARASHI, M.; SOKAMOTO, K.; NAGAOKA, I. Effect of glucosamine on expression of type II collagen, matrix metalloproteinase and sirtuin genes in a human chondrocyte cell line. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, p.472-478, 2016.
- IMADA, K.; OKA, H.; KAWASAKI, D.; MIURA, N.; SATO, T.; ITO, A. Anti-arthritis action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. **Biol. Pharm. Bull.** v.33, p.410–414, 2010.
- IOVU, M.; SOUICH G. D. P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and Cartilage.** v.16, S14eS18, 2008.
- ISMAIL, M. M.; AMER, M. S. Characterization and biological properties of sulfated polysaccharides of *Corallina officinalis* and *Pterocladia capillacea*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, p. 623-632, 2020.
- JACKSON, D.G. Hyaluronan in the lymphatics: The key role of the hyaluronan receptor LYVE-1 in leucocyte trafficking. **Matrix Biol.**, v.79, p.219–235, 2019.
- JALEEL, G. A. A.; SALEH, D. O.; AL-AWDAN, S. W.; HASSAN, A.; ASAAD, G. F. Effects of chondroitin sulfate on modulation of MMPs and TIMP-1 in a monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis model. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, v.11, p.10749-10757, 2018.
- JENSEN, T.S.; FINNERUP N. B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. **Lancet Neurol.** v.13, p. 924-35, 2014.
- JEON, O.; KIM, C.; LABERGE, R.; DEMARIA, M.; RATHOD, S.; VASSEROT, A. P.; CHUNG, J. W.; KIM, D. H.; POON, Y.; DAVID, N.; BAKER, D. J.; DEURSEN, J. M. V.; CAMPISI, J.; ELISEEFF, J. H. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. **Nature medicine**, v.26, p.775-781, 2017.
- JEROCSH, J. Effects of Glucosamine and Chondroitin Sulfate on Cartilage Metabolism in OA: Outlook on Other Nutrient Partners Especially Omega-3 Fatty Acids. **Int. J. Rheumatol.**, p. 1–17, 2011.

- JI, R.; NACKLEY, A.; HUH, Y.; TERRANDO, N.; MAIXNER, W. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. **Anesthesiology**. v. 129, p.343–366., 2018.
- JIAO-JIAO, G.; SHU-LIN, Y. Advances in Optimization of Hyaluronic Acid Production by Genetic Engineering Technology. **China Biotechnology**, v. 37 p.72-77, 2017.
- JUNG, J. H.; IWABUCHI, K.; YANG, Z.; LOEKEN, M. R. Embryonic Stem Cell Proliferation Stimulated By Altered Anabolic Metabolism From Glucose Transporter 2-Transported Glucosamine. **Scientific Reports**, v.6, 28452, 2016.
- JÚNIOR, O. V. L.; INÁCIO, A. M. Use of glucosamine and chondroitin to treat osteoarthritis: a review of the literature. **Rev. bras. Ortop**, v.48, n.4, 2013.
- JURZYNSKI, C.; GYSIN, J.; POUVELLE, B. CD44, a signal receptor for the inhibition of the cytoadhesion of CD36-binding Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by CSA-binding infected erythrocytes. **Microbes Infect**, v.9, p.1463-70, 2007.
- KALFF, K.; MOUEDDEN, M. E.; EGMOND, J. V.; VEENING, J.; JOOSTEN, L.; CSHEFFER, G. J.; MEERT, T.; VISSERS, K. Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. **Eur J Pharmacol.**, v.1, p.108-13. 2010.
- KANG, I.; CHANG, M. Y.; WIGHT, T. N.; FREVERT, C. W. Proteoglycans as Immunomodulators of the Innate Immune Response to Lung Infection. **J Histochem Cytochem**. v. 66, p. 241–259, 2018.
- KANG, Y. H.; PARK, S.; AHN, C.; SONG, J.; KIM, D.; JIN, E. J. Beneficial reward-to-risk action of glucosamine during pathogenesis of osteoarthritis. **EUR. J. Med. Res.**, v.20, n.89, 2015.
- KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J.; FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, p.33-42, 2011.
- KARVINENA, J.; JOKIB, T.; YLÄ-OUTINENB, L.; KOIVISTOA, J. T.; NARKILAHTIB, S. MINNA KELLOMÄKI. Soft hydrazone crosslinked hyaluronan- and alginate-based hydrogels as 3D supportive matrices for human pluripotent stem cell-derived neuronal cells. *React. Funct.* **Polym.** v.124, p.29–39, 2018.
- KASHIUCHI, S.; MIYAZAWA, R.; NAGATA, H.; SHIRAI, M.; SHIMIZU, M.; SONE, H.; KAMIYAMA, S. Effects of administration of glucosamine and chicken cartilage hydrolysate on rheumatoid arthritis in SKG mice. **Food Funct**, v.10, p.5008-5017, 2019.
- KATZ, J.; ROSENBLOOM, B. N.; FASHLER, S. Chronic Pain, Psychopathology, and SDM-5 Somatic Symptom Disorder. **Can J Psychiatr**. v. 60, p.160–167, 2015.

- KELLETT, G. L.; BROT-LAROCHE, E.; MACE, O. J.; LETURQUE, A. Sugar absorption in the intestine: The role of GLUT2. **Annu Rev Nutr**, v.28, p.35–54, 2008.
- KHANDEPARKAR, A.; RATABOLI, P. V. A study of harmful drug–drug interactions due to polypharmacy in hospitalized patients in Goa Medical College. **Perspect Clin Re.**, v.8, p.180–186, 2017.
- KHWALDIA. Chapter 2.3 - Chondroitin and Glucosamine. **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**, p. 27-35, 2019.
- KIM, H. D.; LEE, E. A.; AN, Y.; KIM, S. L.; LEE, S. S.; YU, S. J.; JANG, H. L.; NAM, K. T.; IM, S. G.; HWANG, N. S. Chondroitin Sulfate-Based Biomineralizing Surface Hydrogels for Bone Tissue Engineering. **ACS Appl Mater Interfaces**. v. 5, n. 9, p.21639-21650, 2017.
- KIM, M. K.; HA, C. W.; IN, Y.; CHO, S. D.; CHOI, E. S.; HA, J. K.; LEE, J. H.; YOO, J. D.; BIN, S. I.; CHOI, C. H.; KYUNG, H. S.; LEE, M. C. A Multicenter, Double-Blind, Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Cell and Gene Therapy in Knee Osteoarthritis Patients. **Hum Gene Ther Clin Dev.**, v.29, p.48-59, 2018.
- KIM, M. K.; HA, C. W.; IN, Y.; CHO, S. D.; CHOI, E. S.; HA, J. K.; LEE, J. H.; YOO, J. D.; BIN, S. I.; CHOI, C. H.; KYUNG, H. S.; LEE, M. C. A Multicenter, Double-Blind, Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of a Cell and Gene Therapy in Knee Osteoarthritis Patients. **Hum Gene Ther Clin Dev.**, v.29, p.48-59, 2018.
- KIM, S. Y.; LI, B.; LINHARDT, R. J. Pathogenesis and inhibition of flaviviruses from a carbohydrate perspective. **Pharmaceuticals**, v.10, 44, 2017.
- KIMBERLEY, F. C. & CSREATON, G. R. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. **Cell Res.**, v.14, p.359–372, 2004.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.
- KLEIN-WIERINGA, I. R.; LANGE-BROKAAR, B. J. E.; YUSUF, E.; ANDERSEN, S. N.; KWEKKEBOOM, J. C.; KROON, H. M.; OCSH, G. J. V. M. V.; ZUURMOND, A.; STOJANOVIC-SUSULIC, V.; NELISSEN, R. G. H. H.; TOES, R. E. M.; KLOPPENBURG, M.; IOAN-FACSINAY, A. Inflammatory Cells in Patients with Endstage Knee Osteoarthritis: A Comparison between the Synovium and the Infrapatellar. **Fat Pad. J Rheumatol**. v. 43, p. 771-8, 2016.
- KLOPPENBURG M.; BEREBAUM F. Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 28, p. 242-248, 2020.
- KLOPPENBURG, M.; KROON, F. P.; BLANCO, F. J.; DOHERTY, M.; DZIEDZIC, K. S.; GREIBROKK, E.; HAUGEN, I. K.; HERRERO-BEUMONT, G.; JONSSON, H.; KJEKEN, I.; MAHEU, E.; ROMANDA, R.; RITT, M. J.; SMEETS, W.; SMOLEN, J. S.; STAMM, T. A.; SZEKANCZ, Z.; WITTOEK, R.; CARMONA,

L. 2018 update of the EULAR recommendations for the management of hand osteoarthritis. **Ann Rheum Dis.** v.78, p.16–24, 2019.

KLOPPENBURG, M.; PETERFY, C.; HAUGEN, I. K.; KROON, F.; CHEN, S.; WANG, L.; LIU, W.; LEVY, G.; FLEICSHMANN, R. M.; BERENBAUM, F.; HEIJDE, D.; BANSAL, P.; WITTOEK, R.; FENG, S.; FANG, Y.; SALTARELLI, M.; MEDEMA, J. K.; LEVESQUE, M. C. A Phase 2A, Placebo-Controlled, Randomized Study of ABT-981, an Anti-Interleukin-1Alpha and -1Beta DAUI Variable Domain Immunoglobulin, to Treat Erosive Hand Osteoarthritis [abstract]. **Arthritis Rheumatol**, v. 69, 2017.

KNAPIK, J. J.; POPE, R.; HOEDEBECKE, S. S.; CSHRAM, B.; ORR, R. M. Effects of Oral Chondroitin Sulfate on Osteoarthritis-Related Pain and Joint Structural Changes: Systematic Review and Meta-Analysis. **J Spec Oper Med. Spring**, v.19, p.113-124, 2019.

KNOPF-MARQUES, H.; PRAVDA, M.; WOLFOVA, L.; VELEBNY, V.; CSHAAF, P.; VRANA, N. E.; LAVALLE, P. Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Coating and Delivery Systems: Applications in Tissue Engineering, Regenerative Medicine and Immunomodulation. **Adv. Healthc. Mater.** v.5, p.2855, 2016.

KOHN, M. D.; SASSOON, A. A.; FERNANDO, N. D. Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 474, p. 1886–1893, 2016.

KOLASINSKI, A. L.; NEOGI, T.; HOCHBERG, M. C.; OATIS, C.; GUYATT, G.; BLOCK, J.; CALLAHAN, L.; COPENHAVER, C.; DODGE, C.; FELSON, D.; GELLAR, K.; HARVEY, W. F.; HAWKER, G.; HERZING, E.; KWOH, C. K.; NELSON, A. E.; SAMUELS, J.; CSANZELLO, C.; WHITE, D.; WISE, B.; ALTMAN, R. D.; RENZO, D. D.; FONTANAROSA, J.; GIRADI, G.; ISHIMORI, M.; MISRA, D.; SHAH, A. A.; SHMAGEL, A. K.; THOMAS, L. M.; TURGUNBAEV, M.; TURNER, A. S.; RESTON, J. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. **Arthritis & Rheumatology**, p. 1–14, 2020.

KOLASINSKI, S. L.; NEOGI, T.; HOCHBERG, M. C.; OATIS, C.; GUYATTM, G.; BLOCK, J.; CALLAHAN, L.; COPENHAVER, C.; DODGE, C.; FELSON, D.; GELLAR, K.; HARVEY, W. F.; HAWKER, G.; HERZIG, E.; KWOH, K.; NELSON, A. E.; SAMUELS, J.; CSANZELLO, C.; WHITE, D.; WISE, B.; ALTMAN, R. D.; DIRENZO, D.; FONTANAROSA, J.; GIRADI, G.; ISHIMORI, M.; MISRA, D.; SHAH, A. A.; SHMAGEL, A. K.; THOMA, L. M.; TURGUNBAEV, M.; TURNER, A. S.; RESTON, J. American College of Rheumatology/Arthritis Foundation Guideline for the Management of Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. **Arthritis & Rheumatology**, v. 0, pp 1–14, 2020.

KÖWITSCH, A.; ZHOU, G.; GROTH, T. Medical Application of Glycosaminoglycans - A Review. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, p. 23-41, 2017.

- KROON, F. P. B.; CARMONA, L.; SCHOONES, J. W.; KLOPPENBURG, M. Efficacy and safety of nonpharmacological, pharmacological and surgical treatment for hand osteoarthritis: a systematic literature review informing the 2018 update of the EULAR recommendations for the management of hand osteoarthritis. **Rheumatic & Musculoskeletal Diseases**, v. 4, 2018.
- KUCHARZ, E. J.; KOVALENKO, V.; SZÁNTÓ, S.; BRUYÈRE, O.; COOPER, C.; REGISTRE, J. Y. A review of glucosamine for knee osteoarthritis: why patented crystalline glucosamine sulfate should be differentiated from other glucosamines to maximize clinical outcomes. **Rheumatology**, p. 997-1004, 2016.
- KUNWAR, A.; KUMAR, M.; SINGH, S. Pathological perspective of chondrocyte apoptosis in osteoarthritis. **Journal of orthopedisc, traumatology and rehabilitation**, v. 9, p. 1-5, 2017.
- KWON, H. J.; HAN, Y. Chondroitin sulfate-based biomaterials for tissue engineering. **Turk J Biol**, v. 40, p.290-299, 2016.
- KWON, J.; LEE, S. H.; NA, H.; JUNG, K.; CHOI, J.; CHO, K. H.; LEE, C.; KIM, S. J.; PARK, S.; SHIN, D.; CHO, M. Kartogenin inhibits pain behavior, chondrocyte inflammation, and attenuates osteoarthritis progression in mice through induction of IL-10. **CSientific Reports**, v. 8, n. 13832, 2018.
- LAMBERT, C.; ZAPPIA, J.; SANCHEZ, C.; FLORIN, A.; DUBUC, J.; HENROTIN, Y. The Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) as Potential Targets to Treat Osteoarthritis: Perspectives From a Review of the Literature. **Front Med (Lausanne)**, v. 7, 2020.
- LAMBERTIN, I. E.; PENALAZZI, L.; PANDOLFI, A.; MANDATORI, D.; SOLLAZZO, V.; PIVA, R. Human osteoclasts/osteoblasts 3D dynamic co-culture system to study the beneficial effects of glucosamine on bone microenvironment. **International Journal of molecular medicine**, v. 47, 2021.
- LAMPROPOULOU-ADAMIDOU, K.; LELOVAS, P.; KARADIMAS, E. V.; LIAKOU, C.; TRIANTAFILLOPOULOS, I. K.; DONTAS, I.; PAPAIOANNOU, N. A. Useful animal models for the research of osteoarthritis. **Eur J Orthop Surg Traumatol**, v. 24, p. 263–271, 2014.
- LARGO, R.; ROMAN-BLAS, J. A.; MORENO-RUBIO, J.; SÁNCHEZ-PERNAUTE, O.; MARTÍNEZ-CALATRAVA, M.J.; CASTAÑEDA, S.; HERRERO-BEUAMONT, G. Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigen-induced arthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, S17eS23, 2010.
- LATOURTE, A.; KLOPPENBURG, M.; RICHETTE, P. Emerging pharmaceutical therapies for osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v.16, p.673–688, 2020.
- LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nat Rev Immunol**, v.13, p.397-411, 2013.

- LAUDER, R. M. Chondroitin sulphate: A complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. **Complement Therapies Med.**, v.17, p.56–62, 2009.
- LAUDER, R. M. Chondroitin sulphate: A complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. **Complement Therapies Med.** v.17, p.56–62, 2009.
- LAW, Y. Y.; LIN, Y. M.; LIU, S. C.; WU, M. H.; CHUNG, W. H.; TSAI, C. H.; FONG, Y. C.; TANG, C. H.; WANG, C. K. Visfatin increases ICAM-1 expression and monocyte adhesion in human osteoarthritis synovial fibroblasts by reducing miR-320a expression. **Aging**. v.29, p.18635-18648, 2020.
- LAWRANCE, W.; BANERJI S.; DAY, A. J.; BHATTACHARJEE, S.; JACKSON, D. G. Binding of Hyaluronan to the Native Lymphatic Vessel Endothelial Receptor LYVE-1 Is Critically Dependent on Receptor Clustering and Hyaluronan Organization. **J. Biol Chem.**, v.291 p. 8014–8030, 2016.
- LAZAREV, V. F.; GUZHOVA, I. V.; MARGULIS, B. A. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Is a Multifaceted Therapeutic Target. **Pharmaceutics**. v. 12, 416, 2020.
- L'ECSSALOPIER, N.; ANRACT, P.; BIAU, D. Surgical treatments for osteoarthritis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**. v. 59, p. 227-233, 2016.
- LEE, J. H.; LUO, X.; REN, X.; TAN, T. C.; SMITH, R. A. A.; SWAMINATHAN, K.; SEKAR, S.; BHAKOO, K.; NURCOMBE, V.; HUI, J. H.; COOL, S. M. A Heparan Sulfate Device for the Regeneration of Osteochondral Defects. **Tissue Eng. Part A**, v.25, p.352–363, 2019.
- LEGENDRE, F.; BAUGE, C.; ROCHE, R.; SUAREL, A. S.; & PUJOL, J. P. Chondroitin sulfate modulation of matrix and inflammatory gene expression in IL-1 β -stimulated chondrocytes - Study in hypoxic alginate bead cultures. **Osteoarthritis Cartilage**. v.16, p.105–114, 2008.
- LEPETSOS, P.; PAPAVALASSILIOU, A. G. ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, p. 576-591, 2016.
- LI, Y.; CHEN, L.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; LIANG, Y.; MEI, Y. Anti-inflammatory effects in a mouse osteoarthritis model of a mixture of glucosamine and chitooligosaccharides produced by bi-enzyme single-step hydrolysis. **Scientific Reports**. v. 8, 2018.
- LI, Z-H.; GAO, X.; CHUNG, V. C.; ZHONG, W. F.; FU, Q.; YUE-BIN, N.; WANG, Z. H.; SHEN, D.; ZHANG, X. R.; ZHANG, P. D.; LI, F. R.; HAUNG, Q. M.; CHEN, Q.; WEI-QI, C.; WU, X. B.; SHI, X. M.; KRAUS, V. B.; YANG, X.; MAO, C. Associations of regular glucosamine use with all-cause and cause-specific mortality: a large prospective cohort study. **Ann Rheum Dis.**, v.79, p.829–836, 2020.
- LIM, J. D.; LEE, S. R.; KIM, T.; JANG, S.; KANG, S. C.; KOO, H. J.; SOHN, E.; BAK, J. P.; NAMKOONG, S.; KIM, H. K.; SONG, I. S.; KIM, N.; SOHN, E.; HAN, J.

- Fucoidan from *Fucus Vesiculosus* Protects against Alcohol-Induced Liver Damage by Modulating Inflammatory Mediators in Mice and Hepg2 Cells. **Mar. Drugs**, v.13, p.1051–1067, 2015.
- LIN, T.; SHIEH, C.; KUO, C.; JAUNG, Y.; SHIEH, Y. S. Y.; CHIANG, H.; HUNG, S.; JIANG, C.; LIANG, P. Sulfation Pattern of Chondroitin Sulfate in Human Osteoarthritis Cartilages Reveals a Lower Level of Chondroitin-4-Sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v.229, Feb, 2020.
- LIN, T-S.; SHIEH, C. H.; KUO, C.; JAUNG, Y. P.; SHIEH, Y. S.; CHIANG, H.; HUNG, S. C.; JIANG, C. C.; LIANG, P. H. Sulfation Pattern of Chondroitin Sulfate in Human Osteoarthritis Cartilages Reveals a Lower Level of Chondroitin-4-Sulfate. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, 2020.
- LITWINIUK, M.; KREJNER, A.; SPEYRER, M. S.; GAUTO, A. R.; GRZELA, T. Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. **Wounds**. v.28, p.78-88, 2016.
- LIU L.; LIU, Y.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Produção microbiana de ácido hialurônico: estado atual, desafios e perspectivas. **Microb Cell Fact**, v.10, n. 99, 2011.
- LIU, D.; YAO, S.; WISE, G. E. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. **Eur J Oral Sci.**, v. 114, p. 42-9. 2006.
- LIU, Q.; WANG, J.; SUN, Y.; HAN, S. Chondroitin sulfate from sturgeon bone protects chondrocytes via inhibiting apoptosis in osteoarthritis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.134, p.1113–1119, 2019.
- LOESER, R. F.; COLLINS J. A.; DIEKMAN B. O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v.12, p.412–420, 2016.
- LÓPEZ-SENRA, E.; CASAL-BEIROA, P.; LÓPEZ-ÁLVAREZ, M.; SERRA, J.; GONZÁLEZ, P.; VALCARCEL, J.; VÁZQUEZ, J. A.; BURGUERA, E. F.; BLANCO, F. J.; MAGALHÃES, J. Impact of Prevalence Ratios of Chondroitin Sulfate (CS) - 4 and -6 Isomers Derived from Marine Sources in Cell Proliferation and Chondrogenic Differentiation Processes. **Mar. Drugs**, v.18, 2020.
- LUCIA, O.; JEROCSE, J.; YOON, S.; SAYRE, T.; NGAI, W.; FILIPPOU, G. One-year efficacy and safety of single or one to three weekly injections of hylan G-F 20 for knee osteoarthritis: a systematic literature review and meta-analysis. **Clinical Rheumatology**, 2020.
- LUO, P.; GAO, F.; NIU, D.; SUN, X.; SONG, Q.; GUO, C.; LIANG, Y.; SUN, W. The Role of Autophagy in Chondrocyte Metabolism and Osteoarthritis: A Comprehensive Research Review. **Biomed Res Int.**, 2019.
- MA, H.; Li, X.; Sun, D.; ZHOU, T.; LEI, S. H.; GUSTAT, J.; HEIANZA, Y.; QI, L. Association of habitAUI glucosamine use with risk of cardiovascular disease: prospective study in UK Biobank. **BMJ**, v.365, 1628, 2019.

- MA, H.; Li, X.; ZHOU, T.; SUN, D.; LIANG, Z.; LI, Y.; HEIANZA, Y.; QI, L. Glucosamine use, inflammation, and genetic susceptibility, and incidence of type 2 diabetes: a prospective study in UK Biobank. **Diabetes Care**, v.43, p.719–725, 2020.
- MAAS, S. L.; SOEHNLEIN, O.; VIOLA, J. R. Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta. **Front. Immunol.** 2018.
- MACCARI, F.; FERRARINI, F.; VOLPI, N. Structural characterization of chondroitin sulfate from sturgeon bone. **Carbohydr. Res.** v.345, p.1575–1580, 2010.
- MACCARI, F.; FERRARINI, F.; VOLPI, N. Structural characterization of chondroitin sulfate from sturgeon bone. **Carbohydr. Res.** v.345, p.1575–1580, 2010.
- MACCARI, F.; MANTOVANI, V.; GABRIELLI, O.; CARLUCCI, A.; ZAMPINI, L.; GALEAZZI, T.; GALEOTTI, F.; COPPA, G. V.; VOLPI, N. Metabolic fate of milk glycosaminoglycans in breastfed and formula fed newborns. **Glycoconj J.**, v. 33, p.181- 188, 2016
- MACCARI, F.; MANTOVANI, V.; GABRIELLI, O.; CARLUCCI, A.; ZAMPINI, L.; GALEAZZI, T.; GALEOTTI, F.; COPPA, G. V.; VOLPI, N. Metabolic fate of milk glycosaminoglycans in breastfed and formula fed newborns. **Glycoconj J.** v. 33, p.181- 188, 2016.
- MAHEU, E.; RANNOU, F.; REGINSTER, J. Y. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of osteoarthritis: evidence from real-life setting trials and surveys. **Semin Arthritis Rheum.** v.45, p.S28-S33, 2016.
- MANCUSO, P.; BURKE, A.; IVANOVSKA, A.; HENNESSY, C.; MUKERIA, E.; RAMAN, S.; BARRY, F.; MURPHY, M. Mesenchymal stem cell therapy modulates synovial macrophages in a murine model of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 27, p. S422-S423, 2019.
- MANNING, J. E.; LEWIS, J. W.; MARSH, L.; MCGETTRICK, H. M. Insights Into Leukocyte Trafficking in Inflammatory Arthritis – Imaging the Joint. **Front. Cell Dev. Biol.**, 2021.
- MANTOVANI, V.; MACCARI, F.; VOLPI N. Chondroitin Sulfate and Glucosamine as Disease Modifying Anti- Osteoarthritis Drugs (DMOADs). **Curr Med Chem.**, v.23, p.1139-51, 2016.
- MARQUES, J.; VILANOVA, E.; MOURÃO, P. A. S.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X. Marine organism sulfated polysaccharides exhibiting significant antimalarial activity and inhibition of red blood cell invasion by Plasmodium. **Sci. Rep.** v.6, 2016.
- MARTEL-PELLETIER, J.; FARRAN, A.; MONTELL, E.; VERGÉS, J.; PELLETIER, J. P. Discrepancies in Composition and Biological Effects of Different Formulations of Chondroitin Sulfate. **Molecules**, v.20, p.4277-4289, 2015.

- MARTEL-PELLETIER, J.; FARRAN, A.; MONTELL, E.; VERGÉS, J.; PELLETIER, J. Discrepancies in Composition and Biological Effects of Different Formulations of Chondroitin Sulfate. **Molecules**, v. 20, p. 4277–4289, 2015.
- MAUDENS, P.; JORDAN, O.; ALLÉMAN, E. Recent advances in intra-articular drug delivery systems for osteoarthritis therapy. **Drug Discovery Today**, v.23, p. 1761-1775, 2018.
- MAZARÍO, J.; BASBAUM, A. I. Contribution of Substance P and Neurokinin A to the Differential Injury-Induced Thermal and Mechanical Responsiveness of Lamina I and V Neurons. **Journal of Neuro Science**. v. 27, p. 762-770, 2007.
- MCEVER, R. P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovasc. Res.** v. 107, p. 331–339, 2015.
- MCNEIL, J. D. Intra-articular hyaluronic acid preparations for use in the treatment of osteoarthritis. **Int J Evid Based Healthc.** v. 9, p.261–264, 2011.
- MELO-FILHO, N. M.; BELMIRO, C. L.; GONÇALVES, R. G.; TAKIYA, C. M.; JR, M. L.; PAVÃO, M. S. G.; MOURÃO, P. A. S. Fucosylated chondroitin sulfate attenuates renal fibrosis in animals submitted to unilateral ureteral obstruction: a P-selectin-mediated event? **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 299, p. F1299-F1307, 2010.
- MELROSE, J. Keratan sulfate (KS)-proteoglycans and neuronal regulation in health and disease: The importance of KS-glycodynamics and interactive capability with neuroregulatory ligands. **J. Neurochem.**, v.149, p.170–194, 2019.
- MICHL, G. L.; KATZ, J. N.; LOSINA, E. Risk and risk perception of knee osteoarthritis in the US: a population-based study. **Osteoarthritis Cartilage**, v.24, p.593–596, 2016.
- MIRAGLIA, N.; BIANCHI, D.; TRENTIN, A.; VOLPI, N.; SONI, M. G. Safety assessment of non-animal chondroitin sulfate sodium: Subchronic study in rats, genotoxicity tests and human bioavailability. **Food Chem. Toxicol**, v. 93, p.89–101, 2016.
- MIRAGLIA, N.; BIANCHI, D.; TRENTIN, A.; VOLPI, N.; SONI, M. G. Safety assessment of non-animal chondroitin sulfate sodium: Subchronic study in rats, genotoxicity tests and human bioavailability. **Food Chem. Toxicol.** v. 93, p.89–101, 2016.
- MOBASHERI, A; BATT M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 59, p. 333-339, 2016.
- MOMMERT, S.; CSHAPER, J. T.; CSHAPER-GERHARDT, K.; GUTZMER, R.; WERFEL, T. Histamine Increases Th2 Cytokine-Induced CCL18 Expression in Human M2 Macrophages. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n.11648, 2021.
- MORADI, B.; ROSSHIRT, N.; TRIPEL, E.; KIRCSH, J.; BARIÉ, A.; ZEIFANG, F.; GOTTERBARM, T; HAGMANN S. Unicompartmental and bicompartmental

- knee osteoarthritis show different patterns of mononuclear cell infiltration and cytokine release in the affected joints. **Clin Exp Immunol.**, v. 180, p.143-54. 2015.
- MORAIS, S. V.; CZECHKO, N. G.; MALAFAIA, O.; FILHO, J. M. R.; GARCIA, J. B. S.; MIGUEL, M. T.; ZINI, C.; MASSIGNAN, A. G. Osteoarthritis model induced by intra-articular monosodium iodoacetate in rats knee. **Acta Cir. Bras.**, v. 31, 2016.
- MOREIRA, J. J.; COELHO, J. M.; MACHADO, T. S. L.; MORAIS, A. P. L.; MICHELACCI, Y. M.; BACCARIN, R. Y. A. Oral glucosamine and chondroitin sulfate on synovial fluid biomarkers from osteoarthritic equine joints. **Cienc. Rural**, v.49, 2019.
- MOREIRA, J. J.; COELHO, J. M.; MACHADO, T. S. L.; MORAIS, A. P. L.; MICHELACCI, Y. M.; BACCARIN, R. Y. A. Oral glucosamine and chondroitin sulfate on synovial fluid biomarkers from osteoarthritic equine joints. **Cienc. Rural**, v. 49, 2019.
- MOURÃO, P. A. S. Perspective on the use of sulfated polysaccharides from marine organisms as a source of new antithrombotic drugs. **Mar drugs**. v. 13, p. 2770–2784, 2015.
- MULLER W. A. The regulation of transendothelial migration: new knowledge and new questions. **Cardiovascular Research**, v. 107, p. 310–320, 2015.
- MULLER, W. A. Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. **Vet Pathol**, v. 50, p. 7–22, 2013.
- MURATA, M.; YUDOH, K.; SHIMIZU, H.; BEPPU, M.; NAKAMURA, H.; KATO, T.; MASUKO, K. Layilin, a talin-binding hyaluronan receptor, is expressed in human articular chondrocytes and synoviocytes and is down-regulated by interleukin-1 β . **Modern Rheumatology**, v. 23, p.478–488, 2013.
- NAGAOKA, I.; IGARASHI, M.; HAU, J.; JU, Y.; YOMOGIDA, S.; SAKAMOTO, K. Recent aspects of the anti-inflammatory actions of glucosamine. **Carbohydrate Polymers**. v.84, p.825–830, 2011.
- NAGAOKA, I.; IGARASHI, M.; SAKAMOTO, K. Biological activities of glucosamine and its related substances. **Adv Food Nutr Res**. v.65, p.337-352, 2012.
- NASCIMENTO, F. G. S.; BRINGEL, P. H. S. F.; MAIA, F. W. S.; LIMA, C. P. C.; ALVES, R. C.; FEITOSA, J. P. A.; MOTA, M. R. L.; ASSREUY, A. M. S.; CASTRO, R. R. Galactomannan of *Delonix regia* seeds reduces nociception and morphological damage in the rat model of osteoarthritis induced by sodium monoiodoacetate. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 394, p. 491–501, 2021.
- NAVARRO-ALVAREZ, N.; GONÇALVES, B. M. M.; ANDREWS, A. R.; SACHS, D. H.; HAUNG, C. A. A CFA-Induced Model of Inflammatory Skin Disease in Miniature Swine. **Int J Inflam.**, 2018.

- NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L.; KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. **Veterinarni Medicina**, v.53, p.397–411, 2008.
- NELSON, A. E. Osteoarthritis year in review 2017: clinical. **Osteoarthritis Cartilage**. v.26, p. 319–325, 2017.
- NEOGI, T.; LI, S.; PELOQUIN, C.; MISRA, D.; ZHANG, Y. Effect of bisphosphonates on knee replacement surgery. **Ann Rheum Dis.**, v.77, p.92–97, 2018.
- NEVES, M. I.; ARAÚJO, M.; MORONI, L.; SILVA, R. M. P.; BARRIAS, C. C. Glycosaminoglycan-Inspired Biomaterials for the Development of Bioactive Hydrogel Networks. **Molecules**, v.25, n. 978, 2020.
- NICHOLLS, M. A.; FIERLINGER, A.; NIAZI, F.; BHANDARI, M. The Disease-Modifying Effects of Hyaluronan in the Osteoarthritic Disease State. **Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord**, 2017.
- NICOLA, V. D. Degenerative osteoarthritis a reversible chronic disease. **Regenerative Therapy**. v. 15, p.149-160, 2020.
- NISHIMOTO, S.; TAKAGI, M.; WAKITANI, S.; NIHIRA, T.; YOSHIDA, T. Effect of chondroitin sulfate and hyaluronic acid on gene expression in a three-dimensional culture of chondrocytes. **J Biosci Bioeng**. v.100, p.123–126, 2005.
- NOSIVETS, D.; MONTELL, E.; OPRYSHKO, V. Histological changes following the administration of two different chondroitin sulfate products in experimental osteoarthritis models in rats. **Eur J Clin Exp Med.**, v.19, p. 23–32, 2021.
- OGATA, T.; IDENO, Y.; AKAI, M.; SEICHI, A.; HAGINO, H.; IWAYA, T.; DOI, T.; YAMADA, K.; CHEN, A. Z.; LI, Y.; HAYASHI, K. Effects of glucosamine in patients with osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Rheumatology**, v. 37, p. 2479–2487, 2018.
- OGBONNA, A. C.; CLARK, A. K.; GENTRY, C.; HOBBS, C.; MALCANGIO, M. Pain-like behaviour and spinal changes in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis in C57Bl/6 mice. **European Journal of Pain**, v. 17, p. 514-526, 2013.
- OGURA, C.; HIRANO, K.; MIZUMOTO, S.; YAMADA, S.; NISHIHARA, S. Dermatan sulphate promotes neuronal differentiation in mouse and human stem cells. **J. Biochem.**, 2020.
- O'HANLON, C. E.; NEWBERRY, S.; BOOTH, M.; GRANT, S.; MOTALA, A.; MAGLIONE, M. A.; GERALD, J. D. F.; SHEKELLE, P. G. Hyaluronic acid injection therapy for osteoarthritis of the knee: concordant efficacy and conflicting serious adverse events in two systematic reviews. **Syst Rev.**, v.5, 2016.
- OHTAKE, Y.; SAITO A.; Li, S. Several functions of the protein tyrosine phosphatase sigma in the nervous and immune systems. **Exp Neurol**. v.302, p.196–204, 2018.
- OKUMO, T.; FURUKAWA, S.; ASANO, K.; KOBAYASHI, H.; SUNAGAWA, M. Suppressive Activity of Chondroitin Sulfate on Nitric Oxide (NO) Production by Synoviocytes from Knee Osteoarthritis In Vitro. **Int J Pharma Sci Res.**, v.4, 2017.

- OLIVEIRA, J. D.; CARVALHO, L. S.; GOMES, A. M. V.; QUEIROZ, L. R.; MAGALHÃES, B. S.; PARACHIN, N. S. Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. **Microb Cell Fact**, v. 15, Jul, 2016.
- OLIVERA-CASTILLO, L.; GRANT, G.; KANTÚN-MORENO, N.; BARRERA-PÉREZ, H. A.; MONTERO, J.; OLVERA-NOVOA, M. A.; CARRILLO-COCOM, L. M.; ACEVEDO, J. J.; CASTILLO, C. P.; SOLÍS, V. M.; PÉREZ-VEGA, J. A.; ZAMORANO, J. G.; HERNÁNDEZ-GARIBAY, E.; FERNÁNDEZ-HERRERA, M. A.; PÉREZ-TAPIA, M.; MEDINA-CONTRERAS, O.; VILLANUEVA-TOLEDO, J. R.; RODRÍGUEZ-CANUL, R.; DÁVALOS, A. A Glycosaminoglycan-Rich Fraction from Sea Cucumber *Isostichopus badionotus* Has Potent Anti-Inflammatory Properties In Vitro and In Vivo. **Nutrients**, v.12, n.1698, 2020.
- OLSON, A.; GRAVER, A.; GRANDE D. CSaffolSD for articular cartilage repair. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v.22, p.219-227, 2012.
- ONAGA, T. Tachykinin: recent developments and novel roles in health and disease. **Biomolecular Concepts**., 2014.
- ORITA, S.; ISHIKAWA, T.; MIYAGI, M.; OCHIAI, N.; INOUE, G.; EGUCHI, Y.; KAMODA, H.; ARAI, G.; TOYONE, T.; AOKI, Y.; KUBO, T.; TAKAHASHI, K.; OHTORI, S. Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to **inflammatory pain**. **BMC Musculoskelet. Desordem**, v.12, n. 134, 2011.
- PAHWA, R. et al. Chronic Inflammation. **StatPearls**, 2021.
- PAOLA, R. D.; FUCSO, R.; IMPELLIZZERI, D.; CORDARO, M.; BRITTI, D.; MORITTU, V. M.; EVANGELISTA, M.; CUZZOCREA, S. Adelmidrol, in combination with hyaluronic acid, displays increased anti-inflammatory and analgesic effects against monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis in rats. **Arthritis Research & Therapy**, v.18, n. 291, 2016.
- PARK, J.; HONG, J.; HAN, K.; SUH, S.; PARK, S.; YANG, J.; HAN, S. Prevalence of symptomatic hip, knee, and spine osteoarthritis nationwide health survey analysis of an elderly Korean population. **Medicine (Baltimore)**, v. 96, n. 6372, 2017.
- PASHUCK, T. D.; KUROKI, K.; COOK, C. R.; STOKER, A. M.; COOK, J. L. Hyaluronic Acid Versus Saline Intra-Articular Injections for Amelioration of Chronic Knee Osteoarthritis: A Canine Model. **J. Orthop Res.**, v.34, p.1772-1779, 2016.
- PATRO, N.; SHARMA, A.; KARIAYA, K.; PATRO, I. Spirulina platensis protects neurons via suppression of glial activation and peripheral sensitization leading to restoration of motor function in collagen-induced arthritic rats. **Indian J Exp Biol**, v. 49, p. 739-48, 2011.

- PELLETIER, J. P.; RAYNAULD, J. P.; BEUALIEU, A. D.; BESSETTE, L.; MORIN, F.; FERNANDES, A. J. B.; DELORME, P.; DORAIS, M.; PAIEMENT, P.; ABRÃO, F.; MARTEL-PELLETIER, J. Chondroitin sulfate efficacy versus celecoxib on knee osteoarthritis structural changes using magnetic resonance imaging: a 2-year multicentre exploratory study. **Arthritis Res Ther.** v.18, 2016.
- PELLETIER, J.; RAYNAULD, J.; BEUALIEU, A. D.; BESSETTE, L.; MORIN, F. A.; BRUM-FERNANDES, J.; DELORME, P.; DORAIS, M.; PAIEMENT, P.; ABRAM, F.; MARTEL-PELLETIER J. Efficacy of chondroitin sulfate versus celecoxib on structural changes in knee osteoarthritis using magnetic resonance imaging: a 2-year multicenter exploratory study. **Arthritis Res Ther.** v.18, n.256, 2016.
- PÉREZ-CASTRILLO, S.; GONZALEZ-FERNANDEZ, M. L.; ÁLVAREZ-SUÁREZ, J.; SÁNCHEZ-LÁZARO, J.; ESTEBAN-BLANCO, M.; GUTIERREZ-VELACSO, L.; GONZÁLEZ-CUBERO, E.; VILLAR-SUÁREZ, V. Effect of mesenchymal stem cells combined with chondroitin sulfate in an osteoarthritis in vitro model. **Molecular Biology**, 2020.
- PHULL, A.; MAJID, M.; HAQ, I.; KHAN, M. R.; KIM, S. J. In Vitro and in Vivo Evaluation of Anti-Arthritic, Antioxidant Efficacy of Fucoidan from Undaria Pinnatifida (Harvey) Suringar. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 97, 468–480, 2017.
- PITCHER, T.; SOUSA-VALENTE, J.; MALCANGIO, M. The Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis Pain in the Mouse. **J Vis Exp.** n. 111, 53746, 2016.
- POLEKSIC, A.; XIE, L. Database of adverse events associated with drugs and drug combinations. **CSientific Reports**, v. 9, n. 20025, 2019.
- POMIN, V. H.; MULLOY B. Glycosaminoglycans and Proteoglycans. **Pharmaceuticals**, v. 11, n 27, 2018.
- POMONIS, J. D.; BOULET, J. M.; GOTTSHALL, S. L.; PHILLIPS, S.; SELLERS, R.; BUNTON, T.; WALKER, K. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. **Pain.** V. 114, p. 339-346, 2005.
- POVEDA-REYES, S.; MOULISOVA, V.; SANMARTÍN-MASIÁ, E.; QUINTANILLA-SIERRA, L.; SALMERÓN-SÁNCHEZ, M.; FERRER, G. G. Gelatin-Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation. **Macromol. Biosci.** v.16, p.1311–1324, 2016.
- PRECSOTT, S. A.; RATTÉ S. Chapter 23 - Somatosensation and Pain. **Conn's Translational NeuroCSience**, p. 517-539, 2017.
- PRITZKER, K. P. H.; GAY, S.; JIMENEZ, S. A.; OSTERGAARD, K.; PELLETIER, J.; REVELL, P. A.; D. SALTER; BERG, W. B. V. D. Pathology os osteoarthritis. Brandt; Doherty; Lohmander (ESD.), Osteoarthritis (2nd edn.), Oxford University Press (2003), p. 49-58.

- PRITZKER, K. P. H.; GAY, S.; JIMENEZ, S. A.; OSTERGAARD, K.; PELLETIER, J.; REVELL, P. A.; SALTER, D.; BERG, W. B. V. D. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, p. 13-29, 2006.
- RACHEL, H. K.; JIN, Y.; KIM, J.; HWANG, N. S. Inflammation-Modulating Hydrogels for Osteoarthritis Cartilage Tissue Engineering. **Cells**, v.9, 419, 2020.
- RAHMATI, M.; MOBASHERI, A.; MOZAFARI, M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: a critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. **Bone**, v. 85, p. 81–90, 2016.
- RAINSFORD, K. D. Importance of pharmaceutical composition and evidence from clinical trials and pharmacological studies in determining effectiveness of chondroitin sulphate and other glycosaminoglycans: a critique. **J Pharm Pharmacol**, v. 61, p.1263–1270, 2009.
- RAUN, M. Z. C.; PATEL, R. M.; DAWSON, B. C.; JIANG, M.; LEE, B. H. L. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 21, p. 1355–1364. 2013.
- REED, R. K.; TOWNSLEY, M. L.; LAURENT, T. C.; TAYLOR, A. E. Hyaluronan flux from cat intestine: Changes with lymph flow. **Am J Physiol**, n. 262, p.H457–H462, 1992.
- REGINSTER, J. Y.; VERONESE, N. Highly purified chondroitin sulfate: a literature review on clinical efficacy and pharmacoeconomic aspects in osteoarthritis treatment. **Aging Clin Exp Res**, v.33, p.37-47, 2020.
- REICHENBACH, S.; STERCHI, R.; CSHERER, M.; TRELLE, S.; BÜRG, E.; BÜRG, U.; DIEPPE, P. A.; JÜNI, P. Meta-analysis: Chondroitin for Osteoarthritis of the Knee or Hip. **Ann Intern Med**, v.146, p.580-590, 2007.
- REID, K. J.; HARKER, J.; BALA, M. M.; TRUYERS, C.; KELLEN, E.; BEKKERING, G. E.; KLEIJNEN, J. Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact. **Curr Med Res Opin**, v. 27, p. 449-462, 2011.
- REN, Z.; JI, Y.; WANG, Y.; DONG, L. Chondroitin sulfate from *CSophthalmus maximus* for treating osteoarthritis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 1158-1164, 2018.
- RESTAINO, O. F.; FINAMORE, R.; DIANA, P.; MARSEGLIA, M.; VITIELLO, M.; CASILLO, A.; BEDINI, E.; PARRILLI, M.; CORSARO, M. M.; TRIFUOGGI, M.; ROSA, M.; CSHIRALD, C. A multi-analytical approach to better assess the keratan sulfate contamination in animal origin chondroitin sulfate. **Anal. Chim. Acta**, v. 958, p.59–70, 2017.
- RESTAINO, O. F.; FINAMORE, R.; STELLAVATO, A.; DIANA, P.; BEDINI, E.; TRIFUOGGI, M.; ROSA, M.; CSHIRALDI, C. European chondroitin sulfate and glucosamine food supplements: A systematic quality and quantity assessment compared to pharmaceuticals. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, 114984, 2019.

- RESTAINO, O. F.; FINAMORE, R.; STELLAVATO, A.; DIANA, P.; BEDINI, E.; TRIFUOGGI, M.; ROSA, M.; CSHIRALDI, C. European chondroitin sulfate and glucosamine food supplements: A systematic quality and quantity assessment compared to pharmaceuticals. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, 114984, 2019.
- RICHARDS, M. M.; MAXWELL, J. S.; WENG, L.; ÂNGELOS, M. G.; GOLZARIAN, J. Intra-articular Treatment of Knee Osteoarthritis: from Antiinflammatories to Products of Regenerative Medicine. **Phys Sportsmed**, v. 44, p.101–108, 2016.
- ROEMER, F. W.; AYDEMIR, A.; LOHMANDER, S.; CREMA, M. D.; MARA, M. D.; MUURAHAINEN, N.; FELSON, D. T.; ECKSTEIN, F.; GUERMAZI, A. Structural effects of sprifermin in knee osteoarthritis: a post-hoc analysis on cartilage and non-cartilaginous tissue alterations in a randomized controlled trial. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 17, n. 267, 2016.
- ROEMER, F. W.; AYDEMIR, A.; LOHMANDER, S.; CREMA, M. D.; MARA, M. D.; MUURAHAINEN, N.; FELSON, D. T.; ECKSTEIN, F.; GUERMAZI, A. Structural effects of sprifermin in knee osteoarthritis: a post-hoc analysis on cartilage and non-cartilaginous tissue alterations in a randomized controlled trial. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 17, n. 267, 2016.
- ROMAN-BLAS, J. A.; CASTANEDA, S.; SANCHEZ-PERNAUTE, O.; LARGO, R.; HERRERO-BEAUMONT, G. Combined Treatment With Chondroitin Sulfate and Glucosamine Sulfate Shows No Superiority Over Placebo for Reduction of Joint Pain and Functional Impairment in Patients With Knee Osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 69, N. 1, p 77–85, 2017.
- ROMAN-BLAS, J. A.; CASTANEDA, S.; SÁNCHEZ-PERNAUTE, O.; LARGO, R.; HERRERO-BEUMAMONT, G. Combined Treatment With Chondroitin Sulfate and Glucosamine Sulfate Shows No Superiority Over Placebo for Reduction of Joint Pain and Functional Impairment in Patients With Knee Osteoarthritis: A Six-Month Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. **Arthritis Rheumatol**, v.69, p.77-85, 2017.
- ROMAN-BLAS, J. A.; MEDIERO, A.; TARDIO, L.; NUNEZ, S. P.; GRATAT, P.; HERRERO-BEUMAMONT, G.; LARGO, R. The combined therapy with chondroitin sulfate plus glucosamine sulfate or chondroitin sulfate plus glucosamine hydrochloride does not improve joint damage in an experimental model of knee osteoarthritis in rabbits. **Eur J Pharmacol**, v.5, p.8-14, 2017.
- ROMEREIM, S. M.; JOHNSTON, C. A.; REDWINE, A. L.; WACHS, R. A.; Development of an in vitro intervertebral disc innervation model to screen neuroinhibitory biomaterials. **Orthopaedic Research Society**, v. 38, p. 1016-1026, 2020.
- ROSA, G. D.; RUGGERI, C.; ALOISI, A. From exosome glycobiology to exosome glycotecnology, the role of natural occurring polysaccharides. **Polysaccharides**, v. 2, p. 311-338, 2021.

- ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Front Physiol.** v. 9, p. 113, 2018.
- ROUGHLEY, P. J.; MORT, J. S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. **Journal of Experimental Orthopaedics**, v. 1, n. 8, 2014.
- RUI, X.; PAN, H.; SHAO, S.; XU, X. Anti-Tumor and Anti-Angiogenic Effects of Fucoidan on Prostate Cancer: Possible JAK-STAT3 Pathway. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.17, p.1–8, 2017.
- RUNHAAR, J.; ROZENDDAAI, R. M.; MIDDELKOOP, M. V.; BIJLSMA, H. J. W.; DOHERTY, M.; DZIEDZIC, K. S.; LOHMANDER, L. S.; MCALINDON, T.; ZHANG, W.; ZEINSTR, S. B. Subgroup analyses of the effectiveness of oral glucosamine for knee and hip osteoarthritis: a systematic review and individual patient data meta-analysis from the OA trial bank. **Ann. Rheum. Dis.**, v.76, p.1862–1869, 2017.
- SAENGNIPANTHKUL, S.; WAIKAKUL, S.; ROJANASTHIEN, S.; TOTEMCHOKCHYAKARN, K.; SRINKAPAIBULAYA, A.; CHIN, T. C.; HONG, N. M.; BRUYÈRE, O.; COOPER, C.; REGINSTER, J.; LWIN M. Differentiation of patented crystalline glucosamine sulfate from other glucosamine preparations will optimize osteoarthritis treatment. **Int J Rheum Dis.**, v.22, p.376–385, Mar, 2019.
- SAMVELYAN, H. J.; HUGHES, D.; STEVENS, C.; STAINES, K. A. Models of Osteoarthritis: Relevance and New Insights. **Calcified Tissue International**, v. 109, p. 243–256, 2021.
- SANDKÜHLER, J. Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia. **Physiol Rev.** v. 89, p. 707–758, 2009.
- SCHNITZER, T. J.; EASTON, R.; PANG, S.; LEVINSON, D. J.; PIXTON, G.; VIKTRUP, L.; DAVIGNON, I.; BROWN, M. T.; OESTE, C. R.; VERBURG, K. M. Effect of Tanezumab on Joint Pain, Physical Function, and Patient Global Assessment of Osteoarthritis Among Patients With Osteoarthritis of the Hip or Knee. **JAMA.** v. 2, p.37–48, 2019.
- SCHNITZER, T. J.; EASTON, R.; PANG, S.; LEVINSON, D. J.; PIXTON, G.; VIKTRUP, L.; DAVIGNON, I.; BROWN, M. T.; OESTE, C. R.; VERBURG, K. M. Effect of Tanezumab on Joint Pain, Physical Function, and Patient Global Assessment of Osteoarthritis Among Patients With Osteoarthritis of the Hip or Knee. **JAMA.** v. 2, p.37–48, 2019.
- SEFKOW-WERNER, J.; MACHILLOT, P.; SALES, A.; CASTRO-RAMIREZ, E.; DEGARDINC, M.; BOTURYNC, D.; CAVALCANTI-ADAMD, E. A.; ALBIGES-RIZOE, C.; PICART, C. Elisa Migliorini. Heparan sulfate co-immobilized with cRGD ligands and BMP2 on biomimetic platforms promotes BMP2-mediated osteogenic differentiation. **Acta Biomater.** v.114, p. 90–103, 2020.
- SERT, N. P.; RICE, A. S. C. Improving the translation of analgesic drugs to the clinic: animal models of neuropathic pain. **Br J Pharmacol.**, v.17, p. 2951–2963, 2014.

- SETNIKAR, I.; PALUMBO, R.; CANALI, S.; ZANOLO, G. Pharmacokinetics of glucosamine in man. **Arzneimittelforschung**, v. 43, p.1109-13, 1993.
- SHANG, X. WANG, Z.; TAO, H. Mechanism and therapeutic effectiveness of nerve growth factor in osteoarthritis pain. **Ther Clin Risk Manag**, v.13 p.951-956, 2017.
- SHARMA, M.; SINGH, A.; DHILLON, M. S.; KAUR, S. Comparative Impact of Nonpharmacological Interventions on Pain of Knee Osteoarthritis Patients Reporting at a Tertiary Care Institution: A Randomized Controlled Trial. **Indian J Palliat Care**, V. 24, p. 478–485, 2018.
- SHI, D.; SHENG A.; CHI L. Glycosaminoglycan-Protein Interactions and Their Roles in Human Disease. **Front Mol Biosci**, v.8, 639-666, 2021.
- SIKKA, G.; MILLER, K. L.; STEPPAN, J.; PANDEY, D.; JUNG, S. M.; FRASER, C. D.; ELLIS, C.; ROSS, D.; VANDEGAER, K.; BEDJA, D.; GABRIELSON, K.; WALSTON, J. D.; BERKOWITZ, D. E.; BAROUCH, L. A. Interleukin 10 knockouts frail mice develop cardiac and vascular dysfunction with increased age. **Exp Gerontol**, v. 48, p. 128-35, 2013.
- SIMENTAL-MENDÍA, M.; SÁNCHEZ-GARCÍA, A.; VILCHEZ-CAVAZOS, F.; ACOSTA-OLIVO, C. A.; PEÑA-MARTÍNEZ, V. M. Effect of glucosamine and chondroitin sulfate in symptomatic knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. **Rheumatology International**, v. 38, p. 1413–1428, 2018.
- SOARES, P. A. G.; RIBEIRO, K. A.; VALENTE, A. P.; CAPILLÉ, N. V.; OLIVEIRA, S. M. C. G.; TOVAR, A. M. F.; PEREIRA, M. S.; VILANOVA, E.; MOURÃO, P. A. S. A unique fucosylated chondroitin sulfate type II with strikingly homogeneous and neatly distributed α -fucose branches. **Glycobiology**, v. 28, p. 565–579, 2018.
- SODHI H.; PANITCH A. et al. Glycosaminoglycans in Tissue Engineering: A Review. **Biomolecules**, v.11, 29, 2021.
- SODHI, H.; PANITCH, A. Glycosaminoglycans in Tissue Engineering: A Review. **Biomolecules**, v. 11, n. 29, 2021.
- SOUICH, DU P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS. **Pharmacology & Therapeutics**, v.142, p.362–374, 2014.
- SOUICH, P. DU.; VALLIÈRES, M. Modulation of inflammation by chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. S1-S6, 2010.
- SOUZA, I. F. S.; NETA, R.S. O.; CALDAS, R. T. J.; NERY, M. Osteoarthritis of the hands and muscle strengthening exercises: an integrative update and review of the literature. **BrJP**, v. 1, 2018.
- STABLER, T. V.; KRAUS, V. B.; HAUNG, Z.; MONTELL, E.; VERGÉS, J. Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic

and damage associated molecules. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, p.166-174, 2017.

- STABLER, T. V.; HAUNG, Z.; MONTELL, E.; VERGÉS, J.; KRAUS, V. B. Chondroitin sulphate inhibits NF- κ B activity induced by interaction of pathogenic and damage associated molecules. **Osteoarthritis Cartilage**, v.25, p.166-174, 2017.
- STEINMEYER, J.; BOCK, F.; STÖVE, J.; JEROCSH, J.; FLECHTENMACHER, J. Pharmacological treatment of knee osteoarthritis: Special considerations of the new German guideline. **Orthopedic Reviews**, v. 107782, 2018.
- STEINMEYER, J.; BOCK, F.; STÖVE, J.; JEROCSH, J.; FLECHTENMACHER, J. Pharmacological treatment of knee osteoarthritis: Special considerations of the new German guideline. **Orthop Rev (Pavia)**, v.10, n. 7782, 2018.
- STEVENS R (2018 b) A Clinical Study to Test Efficacy and Safety of Repeat Doses of CNTX-4975-05 in Patients With Osteoarthritis Knee Pain. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03660943?id=NCT02508155+OR+NCT03660943+OR+NCT03429049&rank=1&load=cart>.
- STEVENS, R (2018 a) A clinical study to test efficacy and safety of CNTX-4975–05 in patients ith osteoarthritis knee pain. 2018. September07,2018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03429049?id=NCT02508155+OR+NCT03660943+OR+NCT03429049&rank=2&load=cart>. Accessed 10 Sept 2018.
- STEVENS, R (2018 a) A clinical study to test efficacy and safety of CNTX-4975–05 in patients ith osteoarthritis knee pain. 2018.
- STEVENS, R.; PETERSEN, D.; ERVIN, J.; NEZZER, J.; NIEVES, Y.; CAMPBELL, J.; GUEDES, K.; BURGESS, R.; HANSON, P. Efficacy and Safety of Cntx-4975 in Subjects with Moderate to Severe Osteoarthritis Knee Pain: 24-Week, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Ranging Study. **ACR/ARHP AnnAUI Meeting**, 2017.
- STEVENSON, G. W.; MERCER, H.; CORMIER, J.; DUNBAR, C.; BENOIT, L.; ADAMS, C.; JEZIERSKI, J.; LUGINBUHL, A.; BILSKY, E. J. Monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis produces pain-depressed wheel running in rats: Implications for preclinical behavioral assessment of chronic pain. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 98, p. 35-42, 2011.
- SU, Y.; SUN, W.; SU, C. C. Y.; SUN, W. Molecular mechanism of inflammatory pain. **World J Anesthesiol**. v. 3, p. 71-81, 2014.
- SUGIMOTO, M. A.; SOUSA, L. P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? **Front Immunol**. v. 7, n. 160, 2016.
- SUKHIKH, S.; BABICH, O.; PROSEKOV, A.; PATYUKOV, N.; IVANOVA, S. Future of Chondroprotectors in the Treatment of Degenerative Processes of Connective Tissue. **Pharm**, v. 13, n. 220, 2020.

- SULAIMAN, S. Z. S.; TAN, W. M.; RADZI, R.; SHAFIE, I. N. F.; AJAT, M.; MANSOR, R.; MOHAMED, S.; NG, A. M. H.; LAU, S. F. Comparison of bone and articular cartilage changes in osteoarthritis: a micro-computed tomography and histological study of surgically and chemically induced osteoarthritic rabbit models. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v.16, 663, 2021.
- SUN, Y.; ZHANG, G.; LIU, Q.; LIU, X.; WANG, L.; WANG, J.; LIANG, L. Chondroitin sulfate from sturgeon bone ameliorates pain of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate in rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 95-101, 2018.
- SUN, Y.; ZHANG, G.; LIU, Q.; LIU, X.; WANG, L.; WANG, J.; LIANG, L. Chondroitin sulfate from sturgeon bone ameliorates pain of osteoarthritis induced by monosodium iodoacetate in rats. **Int J Biol Macromol**, v. 1, p.117:95-101, out, 2018.
- SUSANTE, J. L. C.; PIEPER, J.; BUMA, P.; KUPPEVELT, T. H.; BEUNINGEN, H.; DER KRAAN, P. M.; VEERKAMP, J. H.; BERG, W. B.; VETH, R. P. H. Linkage of chondroitin-sulfate to type I collagen scaffolds stimulates the bioactivity of seeded chondrocytes *in vitro*. **Biomaterials**, v. 22, p. 2359-2369, 2001.
- SVANOVSKY, E.; VELEBNY, V.; LAZNICKOVA, A.; LAZNICEK, M. The effect of molecular weight on the biodistribution of hyaluronic acid radiolabeled with ¹¹¹In after intravenous administration to rats. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet**, v.33, p.149-57, 2008.
- TACHMAZIDOU, I.; HATZIKOTOULAS, K.; SOUTHAM, L.; GORDILLO, J. E.; HABERLAND, V.; ZHENG, J.; JOHNSON, T.; KOPRULU, M.; ZENGINI, E.; STEINBERG, J.; WILKINSON, J. M.; BHATNAGAR, S.; HOFFMAN, J. D.; BUCHAN, N.; SÜVEGES, D.; ARCOGEN, C.; YERGES-ARMSTRONG, L.; SMITH, G. D.; GAUNT, T. R.; CSOTT, R. A.; MCCARTHY, L. C. Eleftheria Zeggini Identification of new therapeutic targets for osteoarthritis through genome-wide analyses of UK Biobank data. *Nat Genet*. **Nature Genetics**, v.51, p.230–236, 2019.
- TAKEUCHI, T. Glucosamine Suppresses Osteoclast Differentiation through the Modulation of Glycosylation Including O-GAcylation. **Biological and Pharmaceutical**, V. 40, 2017.
- TANG, X.; WANG, S.; ZHAN, S.; NIU, J.; TAO, K.; ZHANG, Y.; LIN, J. The Prevalence of Symptomatic Knee Osteoarthritis in China: Results From the China Health and Retirement Longitudinal Study. **Arthritis Rheumatol**. v. 68, p.648–653, 2016.
- TANINO, Y.; HASHIMOTO, T.; OJIMA, T.; MIZUNO, M. F-Fucoidan from *Saccharina Japonica* Is a Novel Inducer of Galectin-9 and Exhibits Anti-Allergic Activity. **J. Clin. Biochem. Nutr.** v.59, p.25–30, 2016.

- TARABALLI, F.; Corradetti, B.; Minardi, S.; Powel, S.; Cabrera, F.; Eps, J. L. V.; Weiner, B. K.; TaCSiotti, E. Biomimetic collagenous scaffold to tune inflammation by targeting macrophages. **J Tissue Eng.**, 2016.
- TAT S. K.; AMÁVEL, N.; PELLETIER, J. P.; BOILEUA, C.; LAJEUNESSE, D.; DUVAL, N.; MARTEL-PELLETIER, J. Modulation of OPG, RANK and RANKL by human chondrocytes and their implication during osteoarthritis. **Rheumatology**, v. 48, p. 1482–1490, 2009.
- TAT S. K.; PELLETIER, J. P.; MINEUA, F.; DUVAL, N.; MARTEL-PELLETIER, J. Variable effects of 3 different chondroitin sulfate compounds on human osteoarthritic cartilage/chondrocytes: relevance of purity and production process. **J Rheumatol**, v.37, p.656–664, 2010.
- TCHETINA, E. V., SQUIRES, G.; POOLE, A. R. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. **J. Rheumatol**, v. 32, p.876–886, 2005.
- TCHETINA, E. V.; SQUIRES, G.; POOLE, A. R. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. **The Journal of Rheumatology**, v.32, p. 876-886, 2005.
- TEIXEIRA, M. J.; ALMEIDA, D. B.; YENG, L. T. Concept of acute neuropathic pain. The role of nervi nervorum in the distinction between acute nociceptive and neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17, p. 5-10, 2016.
- TERENCIO, M. C.; FERRÁNDIZ, M. L.; CARCELLER, M. C.; RUHÍ, R.; DALMAU, P.; VERGÉS, J.; MONTELL, E.; TORRENT, A.; ALCARAZ, M. J. Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats. **Biomed Pharmacother**, v. 79, p.120-128, 2016.
- THAKUR, M.; RAHMAN, W.; HOBBS, C.; DICKENSON, A. H.; BENNETT, D. L. H. Characterisation of a Peripheral Neuropathic Component of the Rat Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis. **PLoS One**. v. 7, 2012.
- TOFFOLETTO, O.; TAVARES, A.; CASARINI, D. E.; REDUBLO, B. M.; RIBEIRO, A. B. Pharmacokinetic Profile of Glucosamine and Chondroitin Sulfate Association in Healthy Male Individuals. **Acta Ortop Bras**, v. 13, 2005.
- TSAI, H.; CHEN, T.; CHEN, Y.; CHEN, R. Traumatic osteoarthritis-induced persistent mechanical hyperalgesia in a rat model of anterior cruciate ligament transection plus a medial meniscectomy. **Journal of Pain Research**, v. 11, 2018.
- UDO, M.; MUNETA, T.; TSUJI, K.; OZEKI, N.; NAKAGAWA, Y.; OHARA, T.; SAITO, R.; YANAGISAWA, K.; KOGA, H.; SEKIYA, I. Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, p. 1284-1291, 2016.

- ULDRY, M.; IBERSON, M.; HOSOKAWA, M.; THORENS, B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. **FEBS Lett**, v.524, p.199–203, 2002.
- ULLAH, S.; KHALIL, A. A.; SHAUKAT, F.; SONG, Y. Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. **Foods**, v. 8, 304, 2019.
- UNITY biotechnology (2020) UNITY Biotechnology Announces 12-week data from UBX0101 Phase 2 Clinical Study in Patients with Painful Osteoarthritis of the Knee. 2019. <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/08/17/2079116/0/en/UNITY-Biotechnology-Announces-12-week-data-from-UBX0101-Phase-2-Clinical-Study-in-Patients-with-Painful-Osteoarthritis-of-the-Knee.html>.
- USTYUZHANINA, N. E.; ANISIMOVA, N. Y.; BILAN, M. I.; DONENKO, F. V.; MOROZEVICH, G. E.; YASHUNSKIY, D. V.; USOV, A. I.; SIMINYAN, N. G.; KIRGISOV, K. I.; VARFOLOMEEVA, S. R.; KISELEVSKIY, M. V.; NIFANTIEV, N. E. Chondroitin Sulfate and Fucosylated Chondroitin Sulfate as Stimulators of Hematopoiesis in Cyclophosphamide-Induced Mice. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 1074, 2021.
- USTYUZHANINA, N. E.; BILAN, M. I.; NIFANTIEV, N. E.; USOV, A. I. New insight on the structural diversity of holothurian fucosylated chondroitin sulfates. **Pure Appl. Chem.**, v. 91, p. 1065–1071, 2019.
- VALENTE J. S. The Pharmacology of Pain Associated With the Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis. **Front Pharmacol**, v.10, n. 974, 2019.
- VALLET, S. D.; CLERC, O.; RICARD-BLUM, S. Glycosaminoglycan–Protein Interactions: The First Draft of the Glycosaminoglycan Interactome. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. v. 69, p.93–104, 2021.
- VALLIÈRES, SOUICH. Modulation of inflammation by chondroitin sulfate. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p.S1-S6, 2010.
- VAN DEN BERG, W. B. Osteoarthritis year 2010 in review: pathomechanisms. **Osteoarthr. Cartil.** v.19, p.338–341, 2011.
- VANCE, C. G. T.; DAILEY, D. L.; RAKEL, B. A.; SLUKA, K. A. Using TENS for pain control: the state of the evidence, **Pain Manag.**, v. 4, p. 197–209. 2014.
- VARRASSI, G.; ALON, E.; BAGNACSO, M.; LANATA, L.; MAYORAL-ROJALS, V.; PALADINI, A.; PERGOLIZZI, J. V.; PERROT, S.; CSARPIGNATO, C.; TÖLLE, T. Towards an Effective and Safe Treatment of Inflammatory Pain: A Delphi-Guided Expert Consensus. **Adv Ther.** v.36, p.2618–2637, 2019.
- VASILIADIS, H. S.; Tsikopoulos, K. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. **World J Orthop**, v.18, p. 1–11, Jan, 2017.

- VÁZQUEZ, J. A.; FRAGUAS, J.; NOVOA-CARVALLAL, R.; REIS, R. L.; ANTELO, L. T.; PÉREZ-MARTIN, R. I.; VALCARCEL, J. Isolation and Chemical Characterization of Chondroitin Sulfate from Cartilage By-Products of Blackmouth Catshark (*Galeus melastomus*). **Mar. Drugs**, v. 16, n. 344, 2018.
- VERONESE, N.; DEMURTAS, J.; SMITH, L.; REGISTRE, J. Y.; BRUYÈRE, O.; BEUADART, C.; HONVO, G.; MAGGI, S. Glucosamine sulphate: an umbrella review of health outcomes. **Ther Adv Musculoskel Dis**, v. 12, p. 1–12, 2020.
- VESSELLA, G.; VÁZQUEZ, J. A.; VALCÁRCEL, J.; LAGARTERA, L.; MONTERREY, D. T.; BASTIDA, A.; GARCÍA-JUNCEDA, E.; BEDINI, E.; FERNÁNDEZ-MAYORALAS, A.; REVUELTA, J. Deciphering Structural Determinants in Chondroitin Sulfate Binding to FGF-2: Paving the Way to Enhanced Predictability of Their Biological Functions. **Polymers**, v. 13, n. 313, 2021.
- VINCENT, T. L. IL-1 in osteoarthritis: time for a critical review of the literature. **F1000Res**, v.8, 2019.
- VOLPI, N. Advances in chondroitin sulfate analysis: application in physiological and pathological States of connective tissue and during pharmacological treatment of osteoarthritis. **Curr Pharm Des**, v.12 p.639-658, 2006a.
- VOLPI, N. Analytical aspects of pharmaceutical grade chondroitin sulfates. **J Pharm Sci.**, v.96, Dec, 2007.
- VOLPI, N. Chondroitin Sulfate Safety and Quality. **Molecules**, v. 24, n. 1447, 2019.
- VOLPI, N. Oral absorption and bioavailability of ichthyic origin chondroitin sulfate in healthy male volunteers. **Osteoarthritis Cartilage**, v.11, p.433-441, 2003.
- VOLPI, N. Oral bioavailability of chondroitin sulphate (CondrosulfR) and its constituents in healthy male volunteers. **Osteoarthritis Cartilage**, v.10, p.768–777, 2002.
- VOLPI, N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. **J. Pharm. Pharmacol**, v.61, p.1271–1280, 2009.
- VOLPI, N. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. **J. Pharm. Pharmacol**, v.61, p.1271–1280, 2009.
- WACSH, R. A.; HOOGENBOEZEM, E. N.; HUDA, H. I.; XIN, S.; PORVASNIK, S. L.; CSHMIDT, C. E. Creation of an injectable in situ gelling native extracellular matrix for nucleus pulposus tissue engineering. **The Spine Journal**, v. 17, p.435–444, 2017.
- WALY, N. E.; REFAIY, A.; ABOREHAB, N. M. IL-10 and TGF- β : Roles in chondroprotective effects of Glucosamine in experimental Osteoarthritis? **Pathophysiology**, v. 24, p. 45-49, 2017.
- WANDEL, S.; JÜNI, P.; NÜESCH, E.; VILLIGER, P. M.; WELTON, N. J.; REICHENBACH, S.; TRELLE, S. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo

- in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta-analysis. **BMJ**, v.341, Jul, 2010.
- WANG, C.; POON, S.; MURALI, S.; KOO, C.; BELL, T. J.; HINKLEY, S. F.; YEONG, H.; BHAKOO, K.; NURCOMBE, V.; COOL, S. M. Engineering a vascular endothelial growth factor 165-binding heparan sulfate for vascular therapy. **Biomaterials**, v.35, p.6776–6786, 2014.
- WANG, W.; TAN, M.; YU, J.; TAN, L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. **Ann Transl. Med.** v.3, n.136, 2015.
- WANG, T.; HE C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 44, p.38-50, 2018.
- WANG; YANG. A comparative study of chondroitin sulfate and heparan sulfate for directing three-dimensional chondrogenesis of mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, volume 8, 284, 2017.
- WEI, S.; TAO, Z.; XUE Y.; CAO, D. Peripheral Sensitization. **Life Sciences**, 2019.
- WEIGEL, P.H.; Yik, J. H. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -General Subjects**, v.1572, p.341–363, 2002.
- WOLFF, D. G.; CHRISTOPHERSEN, C.; BROWN, S. M.; MULCAHEY, M. K. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the treatment of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. **Phys Sportsmed.** v. 49, p.381-391, 2021.
- WU, J.; QU, Y.; ZHANG, Y. P.; DENG, J. X.; YU, Q. H. RHAMM induces progression of rheumatoid arthritis by enhancing the functions of fibroblast-like synoviocytes. **BMC Musculoskelet Disord**, v.19, 2018.
- XING, D.; WANG, B.; LIU, Q.; KE, Y.; XU, Y.; LI, Z.; LIN, J. Intra-articular Hyaluronic Acid in Treating Knee Osteoarthritis: a PRISMA-Compliant Systematic Review of Overlapping Meta-analysis. **Scientific Reports**, v.6, 2016.
- XUE, J.; CHEN, J.; SHEN, Q.; CHAN, D.; LI, J.; TANGAUI, A. P.; CSHMIDT, T. A.; NIAZI, F.; PLAAS, A. Addition of High Molecular Weight Hyaluronic Acid to Fibroblast-Like Stromal Cells Modulates Endogenous Hyaluronic Acid Metabolism and Enhances Proteolytic Processing and Secretion of Versican. **Cells**. v.9, 2020.
- YAMAZAKI, K.; FUKUDA, K.; MATSUKAWA, M.; HARA, F.; YOSHIDA, K.; AKAJI, M.; MUNAKATA, H.; HAMANISHI, C. Reactive oxygen species depolymerize hyaluronan: involvement of the hydroxyl radical. **Pathophysiology**, v.9, p.215–220, 2003.
- YAN, L.; ZHU, M.; WANG, D.; TAO, W.; LIU, D.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J.; YE, X.; CHEN, S. Oral Administration of Fucosylated Chondroitin Sulfate Oligomers in Gastro-Resistant Microcapsules Exhibits a Safe Antithrombotic Activity. **Thromb Haemost.** v. 121, p. 015-026, 2021.

- YANG, Z.; YIN, J.; WANG, Y.; WANG, J.; XIA, B.; LI, T.; YANG, X.; HU, S.; JI, C.; GUO, S. The Fucoidan A3 from the Seaweed *Ascophyllum nodosum* enhances RCT-Related Genes Expression in Hyperlipidemic C57BL/6J Mice. **Int. J. Biol. Macromol**, v.134, p.759–769, 2019.
- YAO, H.; XUE, J.; WANG, Q.; XIE, R.; LI, W.; LIU, S.; CAI, J.; QIN, D.; WANG, D.; REN, L. Glucosamine-modified polyethylene glycol hydrogel-mediated chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 79, p. 661-670, 2017.
- YAO, H.; XUE, J.; XIE, R.; LIU, S.; WANG, Y.; SONG, W.; WANG, D.; REN, L. A novel glucosamine derivative with low cytotoxicity enhances chondrogenic differentiation of ATDC5. **J Mater Sci Mater Med.**, V. 28, 2017.
- YAZICI, Y., MCALINDON, T.; GIBOFSKY, A.; LANE, N.; LATTERMANN, C.; SKREPNIK, N.; SWEARINGEN, C.; DIFRANCECSO, A.; TAMBIAH, J.; HOCHBERG, M. Thu0458 efficacy and safety from a phase 2b trial of sm04690, a novel intra-articular wnt pathway inhibitor for the treatment of osteoarthritis of the knee. **Rheumatic Diseases**, v. 78, 2019.
- YAZICI, Y., MCALINDON, T.; GIBOFSKY, A.; LANE, N.; LATTERMANN, C.; SKREPNIK, N.; SWEARINGEN, C.; DIFRANCECSO, A.; TAMBIAH, J.; HOCHBERG, M. Thu0458 efficacy and safety from a phase 2b trial of sm04690, a novel intra-articular wnt pathway inhibitor for the treatment of osteoarthritis of the knee. **Rheumatic Diseases**, v. 78, 2019.
- YONGYAUN, M. A.; GUO, H.; BAI, F.; ZHANG, M.; YANG, L.; DENG, J.; XIONG, L. A Rat Model of Knee Osteoarthritis Suitable for Electroacupuncture Study. **Experimental Animals**, 2018.
- YOUSEFZADEH, M. J.; ZHU, Y.; MCGOWAN, S. J.; ANGELINE, L.; FUHRMANN-STROISSNIGG, H.; XU, M.; LING, Y. Y.; MELOS, K. I.; PIRTSHALAVA, T.; INMAN, C. L.; MCGUCKIAN, C.; WADE, E. A.; KATO, J. I.; GRASSI, D.; WENTWORTH, M.; BURD, C. E.; ARRIAGA, E. A.; LADIGES, W. L.; TCHKONIA, T.; KIRKLAND, J. L.; ROBBINS, P. D.; NIEDERNHOFER, L. J. Fisetin is a senotherapeutic that extends health and lifespan. **EBioMedicine**, v.36, p.18-28, 2018.
- YÜCEL, G.; ZHAO, Z.; EL-BATRAWY, I.; LAN, H.; LANG, S.; LI, X.; BULJUBASIC, F.; ZIMMERMANN, W.; CYGANER, L.; UTIKAL, J.; RAVENS, U.; WIELAND, T.; BORGGREFE, M.; ZHOU, X.; AKIN, I. Lipopolysaccharides induced inflammatory responses and electrophysiological dysfunctions in human-induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes, **Scientific Reports**, v. 7, 2017.
- YUSUF, E. Pharmacologic and Non-Pharmacologic Treatment of Osteoarthritis. **Current Treatment Options in Rheumatology**, v. 2, p. 111–125, 2016.
- ZAHAN, O.; SERBAN, O.; GHERMAN, C.; FODOR, D. The evaluation of oxidative stress in osteoarthritis. **Med Pharm Rep.** v. 93, p. 12–22, 2020.

- ZENG, C.; WEI, J.; PERSSON, M. S. M.; SARMANOVA, A.; DOHERTY, M.; XIE, D.; WANG, Y.; LI, X.; LI, J.; LONG, H.; LEI, G.; ZHANG, W. Relative efficacy and safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. **Br J. Sports Med.** v.52, p. 642–650, 2018.
- ZHAO, X.; GUO, F.; HU, J.; ZHANG, L.; XUE, C.; ZHANG, Z.; LI, B. Antithrombotic Activity of Oral Administered Low Molecular Weight Fucoidan from Laminaria Japonica. **Thromb. Res.**, v.144, p.46–52, 2016.
- ZHENG, H. X.; CHEN, D. J.; ZU, Y. X.; WANG, E. Z.; QI, S. S. Chondroitin Sulfate Prevents STZ Induced Diabetic Osteoporosis through Decreasing Blood Glucose, AntiOxidative Stress, Anti-Inflammation and OPG/RANKL Expression Regulation. **Int. J. Mol. Sci.**, v.21, 2020.
- ZHENG, W.; FENG, Z.; YOU, S.; ZHANG, H.; TAO, Z.; WANG, Q.; CHEN, H.; WU, Y. Fisetin inhibits IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through activating SIRT1 and attenuates the progression of osteoarthritis in mice. **Int Immunopharmacol**, v.45, p.135-147, 2017.
- ZHOU, Z.; TANG, S.; NIE, X.; ZHANG, Y.; LI, D.; ZHAO, Y.; CAO, Y.; YIN, J.; CHEN, T.; RAUN, G.; ZHU, Z.; BAI, X.; HAN, W.; DING, C. Osteoarthritic Infrapatellar Fat Pad Aggravates Cartilage Degradation via Activation of p38MAPK and ERK1/2 Pathways. **Research Square**, 2020.
- ZHU, X.; SANG, L.; WU, D.; RONG, J.; JIANG, L. Effectiveness and safety of glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 13, n. 170, 2018.
- ZHU, Z.; WANG, Y. M.; YANG, J.; LUO, X. S. Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering. **Plast Aesthet Res**, v. 4, p. 219-227, 2017.

ANEXO A – CÓDIGO DE ÉTICA DA FIOCRUZ

O protocolo deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) processo nº 0087/2019.

ANEXO B - SÚMULA CURRICULAR

Curso de Interpretação de Exames Laboratoriais - Aplicação Clínica da Série.
(Carga horária: 5h). Liga Acadêmica de Oncologia e Hematologia da Unigranrio, LAOH,
Brasil;

1º minicurso online sobre Introdução a procedimentos experimentais em anim.
(Carga horária: 3h). Fiocruz (PE), FIOCRUZ (PE), Brasil;

PCR e Marcadores Moleculares. (Carga horária: 2h). Universidade Federal de
Pernambuco, UFPE, Brasil;

Especialização em Saúde Pública. (Carga Horária: 360h). Faculdade Unyleya,
UNYLEYA, Brasil. Título: Saúde Pública.