

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

PAULA LIMA BOSI

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA ANEXINA A1 NA INFLAMAÇÃO,
LESÃO E DISFUNÇÃO TECIDUAL DA OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL

Belo Horizonte

2024

PAULA LIMA BOSI

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA ANEXINA A1 NA INFLAMAÇÃO,
LESÃO E DISFUNÇÃO TECIDUAL DA OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral

Belo Horizonte

2024

043

Bosi, Paula Lima.

Avaliação do papel da proteína Anexina A1 na inflamação, lesão e disfunção tecidual da osteoartrite experimental [manuscrito] / Paula Lima Bosi. – 2024.

87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Inflamação. 3. Nociceptividade. 4. Anexina A1. 5. Osteoartrite. I. Amaral, Flávio Almeida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE TESE

PAULA LIMA BOSI

Às **treze horas** do dia **19 de dezembro de 2024**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA ANEXINA A1 NA INFLAMAÇÃO, LESÃO E DISFUNÇÃO TECIDUAL DA OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Flávio Almeida Amaral**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição
Prof. Dr. Flávio Almeida Amaral	UFMG
Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva	UFMG
Profa. Dra. Soraia Macari	UFMG
Profa. Dra. Raquel Alves Costa	UFSJ
Profa. Dr. Renê Donizeti Ribeiro de Oliveira	FMRP-USP

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 19 de dezembro de 2024.**

Belo Horizonte, 13 de janeiro de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Rene Donizeti Ribeiro de Oliveira, Usuário Externo**, em 13/01/2025, às 10:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraia Macari, Professora do Magistério Superior**, em 13/01/2025, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Alves Costa, Usuário Externo**, em 13/01/2025, às 22:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 12/02/2025, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Pinho da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 12/02/2025, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3876458** e o código CRC **87F8D614**.

Dedico esta tese aos meus pilares: Fernando José Bosi Filho (*in memoriam*), Edileide Lima Bosi, Fernando Lima Bosi, Rafael e Laura

Ao meu pai, que partiu recentemente, mas sua presença continua viva em cada passo que dou. Pai, você foi e sempre será meu maior exemplo de honra, sabedoria e amor. Este trabalho é uma homenagem a tudo o que me ensinou e a toda a força que me deu, mesmo nos momentos mais difíceis. Sinto sua falta todos os dias, mas levo comigo a certeza de que você estaria orgulhoso desta conquista.

À minha mãe, pelo amor incondicional. Sua força inspiradora e sua confiança inabalável em mim foram os alicerces que me sustentaram em cada passo desta jornada. Sou eternamente grata por tudo o que você fez e continua fazendo por mim.

Ao meu irmão, meu parceiro de vida e meu melhor amigo. Você é a pessoa que estive ao meu lado em cada momento, celebrando minhas vitórias, ajudando-me a superar os desafios e me inspirando a ser melhor todos os dias.

Aos meus dois seres de luz, Rafael e Laurinha, vocês são minha maior inspiração. O amor e a alegria que vocês trazem à minha vida me motivam a ser sempre melhor, tanto como pessoa quanto como profissional.

Essa vitória é compartilhada com vocês, que são minha força e meu coração. Com amor eterno e gratidão."

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Dr. Flávio Amaral**, minha mais profunda gratidão pela orientação, pela paciência e pela confiança ao longo dessa jornada. Obrigada por aceitar me orientar mesmo quando todas as evidências apontavam que você poderia desistir dessa hipótese. Seu apoio, cuidado transformaram essa experiência em algo que vou levar comigo para toda a vida.

Às minhas amigas de laboratório, **Amanda Braga e Vivian Louise**, minha gratidão transcende as paredes do laboratório. Obrigada por cada café nos intervalos, pelas chamadas de vídeo no meio dos experimentos, por cada orientação e por tudo que passamos juntas. Vocês não foram apenas minhas parceiras de trabalho, mas amigas que levarei para a vida inteira.

Ao **Laboratório de Imunofarmacologia**, agradeço por oferecerem todo o suporte necessário para o desenvolvimento deste trabalho. Aos colegas e professores do grupo de Imunofarmacologia, minha gratidão pela parceria, convivência e carinho. Agradeço, em especial, à **Anna Clara, Eliza, Gabrielly, Izabela Paulo e Taiane**, por tornarem essa jornada mais leve e enriquecedora.

Ao **Celso**, pela generosidade nas trocas de conhecimento e pelo apoio indispensável nas histologias.

Ao **Domênico e à Mara**, pelas valiosas colaborações e pelas inúmeras conversas que tornaram as histologias mais leves e divertidas.

Aos queridos amigos **Ilma e Hermes**, por sempre me acolherem com carinho e estarem prontos para ajudar em todos os momentos desta trajetória.

À **Rose** pelo suporte técnico essencial que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Frank**, por sua disponibilidade e dedicação nas citometrias, sempre contribuindo de forma crucial para este projeto.

Agradeço ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**, bem como à **CAPES, CNPq e FAPEMIG**, pelo suporte financeiro que tornou este trabalho possível.

Ao **Rodrigo**, meu parceiro em todas as decisões, mesmo nas mais mirabolantes, como esta. Sua parceria, apoio incondicional e incentivo constante foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

Às amigas **Regiane, Giselle e Fernanda**, pela compreensão, carinho e acolhimento neste período desafiador.

Agradeço, acima de tudo, a **Deus**, por todas as bênçãos concedidas, pela força nos momentos difíceis e pelas oportunidades que me trouxeram até aqui.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para as conquistas que me levaram a este momento, deixo minha mais sincera gratidão.

RESUMO

A osteoartrite (OA) é uma doença crônica e debilitante que afeta grande parte da população mundial, com maior prevalência entre os idosos. A inflamação e o dano estrutural na OA são progressivos e estão relacionados com fatores genéticos e ambientais, como o estresse biomecânico. Entretanto, as opções atuais de terapia ainda não são eficientes para evitar a progressão da doença. Atualmente, alguns tratamentos farmacológicos disponíveis para a OA se limitam ao controle de sintomas, principalmente da dor. Assim, é especulado que futuros medicamentos modificadores do curso da OA estejam relacionados com o controle da atividade destas células sinoviais. Neste trabalho, consideramos que a proteína Anexina A1, uma potente molécula envolvida na resolução da resposta inflamatória, possa controlar os danos articulares da osteoartrite. Utilizando um modelo experimental, identificamos que camundongos deficientes para a Anexina A1, apresentaram uma piora do quadro da osteoartrite nos parâmetros dor e lesão articular quando comparados com animais selvagens. De maneira interessante, animais tratados com o peptídeo mimético da Anexina A1, o Ac2-26, demonstraram redução na progressão da lesão e dor na OA experimental, mesmo quando esse tratamento se iniciou em tempos mais tardios. Além disso foi demonstrado que o tratamento melhorou os níveis de MMP-3 e de forma similar outro parâmetro de lesão que utilizamos, a análise de RANK-L também demonstrou a redução após o tratamento. Por fim, os níveis de Il-10 aumentaram com o tratamento. Esses dados sugerem um papel promissor da Anexina A1 e do peptídeo Ac2-26 para reduzir os danos e sintomas da OA.

Palavras Chave: Osteoartrite do Joelho, Inflamação, Mediadores Lipídicos Pró-Resolução Especializados.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a chronic and debilitating disease that affects a large part of the world population, with a higher prevalence among the elderly. Inflammation and structural damage in OA are progressive and are related to genetic and environmental factors, such as biomechanical stress. However, current therapeutic options are not yet effective in preventing disease progression. Currently, some pharmacological treatments available for OA are limited to controlling symptoms, mainly pain. Thus, it is speculated that future drugs that modify the course of OA may be related to controlling the activity of these synovial cells. In this study, we consider that the protein Annexin A1, a potent molecule involved in the resolution of the inflammatory response, may control joint damage in osteoarthritis. Using an experimental model, we identified that mice deficient in Annexin A1 presented a worsening of the osteoarthritis condition in the parameters of pain and joint damage when compared to wild-type animals. Interestingly, animals treated with the Annexin A1 mimetic peptide, Ac2-26, demonstrated reduced lesion progression and pain in experimental OA, even when treatment was initiated at a later time point. In addition, treatment was shown to improve MMP-3 levels. Similarly, another parameter we used, RANK-L analysis, also demonstrated a reduction after treatment. Finally, IL-10 levels increased with treatment. These data suggest a promising role for Annexin A1 and the Ac2-26 peptide in reducing the damage and symptoms of OA.

Keywords: Knee Osteoarthritis, Inflammation, Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators.

LISTA DE ABREVIACES

5-LOX - 5-lipoxigenase

ADAMTS- desintegrina e metaloprotease com domnios trombospondina

ANOVA: análise de varincia

BSA: Bovine Serum Albumin – Soro Albumina Bovina

C57/BL6: linhagem de camundongos

CEUA: Comissão de ética no uso de animais

DNA: cido desoxirribonucleico

AnxA1 - Anexina A1

ATP - adenosina trifosfato

AUC rea sobre a curva.

cAMP - Adenosina mofosfato cíclica

CCL17- Quimiocina (C-C motif) ligante 2

CCL2 - Quimiocina (C-C motif) ligante 2

CCR5 - C-C receptor quimiocina tipo 5

CD11c Proteína transmembrana 145-150 kDa

CD206 - receptor de manose

CGRP peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CiOA - Modelo experimental de Osteoartrite induzida por colagenase

CXCR3 - receptor acoplado  proteína G α i na família de receptores de quimiocinas CXC

DRG - gânglios da raiz dorsal

ECM - matriz extracelular

EDTA: cido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay – Imunoensaio enzimático

fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

FGF-2 - Fator de crescimento fibroblástico

FPRs2/AXL - receptor de peptídeos formilados

GAG - glicosaminoglicano

GM-CSF - Fator Estimulante de Colnias de Granulócitos-Macrófagos

GSK3 - Glicogene Sintase Kinase 3

i.a Tratamento intra-articular

IL- Interleucina

IL-17 - Interleucina-17

IL-6 - Interleucina-6

IMC - índice de massa corporal

LCA - ligamento cruzado anterior

MIA - monoiodoaceto de sódio

MMP - metaloproteinases de matriz

MMP-1 metaloproteinases de matriz tipo1

MMP-13 - metaloproteinases de matriz tipo13

MMP-3 - metaloproteinases de matriz tipo 3

NF κ B: Nuclear Factor kappa B – Fator nuclear kappa B

PBS: phosphate buffered saline - tampão salina fosfato

PKA: Proteína quinase A

TNF α : fator de necrose tumoral- α

OA - osteoartrite

OARSI - Osteoarthritis Research Society International

RANKL- Ativador de receptor do ligante do fator nuclear kappa-B

ROS - espécies reativas de oxigênio

TGF- β - transformação de crescimento-beta

TNF - Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática das alterações no complexo articular do joelho saudável e com osteoartrite.....	20
FIGURA 2: Representação esquemática da relação da sinovite com o desenvolvimento da osteoartrite.....	22
FIGURA 3: Representação esquemática da Anexina A1 na inibição da inflamação.....	29
FIGURA 4: Representação esquemática do tratamento i.a com Ac2-26, medidas de nocicepção e eutanásia.	36
FIGURA 5: Representação esquemática do tratamento i.o com Ac2-26, medidas de nocicepção e eutanásia. (A) Avaliação da nocicepção após uma hora após o tratamento. (B) Avaliação da nocicepção após uma semana do tratamento.....	37
FIGURA 6: Animais deficientes para Anexina A1 e FPR2 apresentam aumento e persistente da nocicepção mecânica após injeção de colagenase.....	43
FIGURA 7: Camundongos deficientes de Anexina A1 apresentam maior inflamação articular após indução de osteoartrite.....	45
FIGURA 8: Camundongos deficientes de Anexina A1 tem piora progressiva do dano articular após indução de osteoartrite.....	47
FIGURA 9: Expressão de AnxA1 durante no tecido articular no modelo de osteoartrite induzida por colagenase.....	48
FIGURA 10: O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz a nocicepção mecânica induzida por colagenase.....	50
FIGURA 11: O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz o escore inflamatório e hiperplasia na osteoartrite experimental.....	52

FIGURA 12: O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz o escore histopatológico OARSI na osteoartrite experimental.....	54
FIGURA 13: O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz a quantidade e ativação de macrófagos sinoviais.....	56
FIGURA 14: O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz a quantidade e ativação de fibroblastos sinoviais.....	57
FIGURA 15: O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, aumenta a expressão de IL-10 na osteoartrite experimental.....	58
FIGURA 16: O tratamento i.o com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, não a nocicepção mecânica induzida por colagenase após uma hora de tratamento.....	60
FIGURA 17: O tratamento i.o com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, não a nocicepção mecânica induzida por colagenase após uma semana de tratamento.....	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Osteoartrite: Aspectos Gerais e Epidemiologia.....	16
1.2 Alterações anatômicas e histológicas na OA	18
1.3 A dor na OA	28
1.4 O Controle da Resposta Inflamatória: Papel da Anexina A1.....	30
2. JUSTIFICATIVA	36.
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Animais	38
4.2 Modelo experimental de OA induzida por collagenase (CiOA).....	38
4.3 Teste de nocicepção mecânica	38
4.4 Tratamento intra-articular com Ac2-26 (i.a)	39
4.5. Tratamento oral com Ac2-26 (p.o.).....	40
4.6 Estudo morfológico	41
4.6.1 Escore Inflamatório	42
4.6.2 Score de OARSI	42
4.7 Western Blotting	43
4.8 Citometria de fluxo	43
4.9 Quantificação da expressão de mRNA por qRT-PCR.....	44
4.10. Análise estatística	45
5. RESULTADOS	
5.1 A ausência de AnxA1 ou de seu receptor mantém a maior resposta nociceptiva articular após injeção de collagenase	46
5.2 O aumento da expressão de AnxA1 no tecido sinovial é transiente após a injeção de collagenase	52
5.3 O tratamento com o peptídeo mimético de AnxA1, Ac2-26, melhora a nocicepção e o dano articular na osteoartrite experimental	53

5.4 O tratamento Ac2-26, aumenta a expressão de IL-10 na osteoartrite experimental em períodos tardios.	62
5.5 Tratamento oral com Ac2-26 reduziu parcialmente a nocicepção em OA experimental.	63
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO	72
8. REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	84

1.INTRODUÇÃO

1.1. Osteoartrite: Aspectos Gerais e Epidemiologia

A osteoartrite (OA) é uma doença crônica que afeta as articulações e seus tecidos, resultando principalmente em danos progressivos na cartilagem articular, seguidos de alterações nos ossos subcondrais e nas estruturas articulares (1). A OA é uma das causas mais importantes de limitação funcional e incapacidade motora, sendo responsável por aproximadamente 2% da população mundial, causando um grande impacto na vida das pessoas afetadas, como dificuldades na participação das atividades diárias e reduzindo a qualidade de vida (2). É a forma mais comum de artrite, afetando 1 em 3 pessoas com mais de 65 anos de idade, sendo mais comum em mulheres do que nos homens (3).

Em 2021, um estudo global mostrou que ocorreram aproximadamente 46,6 milhões de casos incidentes de osteoartrite, um aumento de 123,11% em relação a 1990. A taxa de incidência padronizada por idade aumentou de 489,78 por 100.000 habitantes em 1990 para 535, 00 por 100.000 em 2021. Esses dados não indicam apenas um aumento significativo no número de casos, mas também sugerem a necessidade de abordagens de prevenção e tratamento mais eficazes, considerando o impacto crescente da OA na população global (4). Na América do Sul, houve um crescimento de 3,45 milhões para 6,52 milhões de casos neste mesmo intervalo de tempo, um aumento de mais de 89% (5,6). De acordo com a carga global de doença de 2015, aproximadamente 85% da carga de OA em todo o mundo está relacionada à OA do joelho (6). A prevalência global da OA do quadril e joelho é estimada em 3.754,2 casos por 100.000 habitantes. Nos países de baixa e média renda, essa prevalência varia em torno da média global e tem mostrado um aumento significativo. Entre 2010 e 2017, a OA na África do Sul, Brasil e Nepal apresentaram crescimentos de 9%, 14% e 20%, respectivamente. No mesmo período, as estimativas de anos vividos com incapacidade (YLD) devido à OA aumentaram globalmente em 10%, com variações de 9% na África do Sul, 15% no Brasil e 21% no Nepal (7).

Além de ocasionar problemas físicos aos pacientes, a OA leva uma quantidade substancial de custos de saúde. Para estimar estes custos, estes foram divididos em custos diretos (econômicos) e indiretos (relacionados à perda de treinamento entre adultos empregados em idade ativa). Os custos diretos estão relacionados aos

recursos gastos em gestão, como medicamentos, hospitalização, consultas ambulatoriais, testes de diagnóstico, fisioterapia, dispositivos de assistência e terapias alternativas (8). No total, os custos anuais com a OA é estimado em aproximadamente US\$ 45 bilhões para os Estados Unidos. Os custos totais anuais com saúde entre adultos americanos com OA em relação àqueles sem OA foram de US\$ 1.778 e US\$ 189 por pessoa, respectivamente (9).

No entanto, a perda de trabalho e a aposentadoria prematura entre adultos empregados em idade produtiva representam custos indiretos que são frequentemente mais difíceis de mensurar. Neste contexto, o absenteísmo descreve o tempo gasto longe do trabalho devido a problemas associados a uma doença ou tempo gasto buscando tratamento para aliviar os sintomas (10). Esses números claramente indicam que a OA não representa apenas um problema de saúde, mas também um problema socioeconômico (11).

As articulações afetadas pela OA são os quadris, os joelhos, as mãos, os pés e a coluna, com alta prevalência de envolvimento poliarticular (12–14). O joelho é a maior articulação sinovial em humanos e consiste em estruturas ósseas (fêmur distal, tíbia proximal e patela), cartilagem (menisco e cartilagem livre), ligamentos, almofada de gordura infrapatelar e tecido sinovial. O tecido sinovial é responsável pela produção de fluido sinovial que lubrifica e nutre a cartilagem avascular (15). O desenvolvimento da OA se caracteriza por perda progressiva de cartilagem, remodelação de ossos adjacentes e inflamação local concomitante de baixo grau. O avançar da idade, as lesões anteriores no joelho, a obesidade (aumento do índice de massa corporal (IMC)), o desalinhamento articular e a instabilidade resultam no aumento do estresse mecânico e seu desgaste (16,17). As ações repetitivas, como muitas vezes ajoelhar e levantar peso, juntamente com atividades esportivas profissionais com maior impacto, como corrida de longa distância, futebol, handebol e hóquei, estão associadas a um maior risco de desenvolver OA, principalmente devido a lesões mais frequentes, causando lesões de cartilagem, no menisco e no ligamento cruzado anterior (LCA) (18,19). Por estes motivos, a etiologia da OA parte do conceito das consequências de um processo de desgaste mecânico da articulação (20,21).

Apesar da inatividade física e a obesidade estarem altamente relacionadas com o desenvolvimento da OA, dois subgrupos estão em maior risco de OA: 1) indivíduos < 65 anos de idade com IMC > 32,5 kg/m² e 2) indivíduos > 65 anos de idade que estavam tipicamente acima do peso ou obesos com IMC < 35 kg/m² (22). O aumento

da idade e do IMC podem contribuir para o aparecimento de OA através de vias relacionadas à hiperglicemia e inflamação elevada (23–26). Em uma revisão sistemática recente contendo 40 estudos que correlacionou doenças crônicas metabólicas com a OA, concluiu-se que diferentemente da síndrome metabólica (agrupamento de três fatores como hipertensão, obesidade e hiperglicemia), que não mostrou correlação direta com a OA, pacientes com hipertensão arterial de forma isolada estavam mais propensos a desenvolver OA de joelho (27). Outro fator importante é a maior incidência de OA no sexo feminino (28) onde as diferenças anatômicas dos ossos do fêmur das mulheres em relação aos dos homens, sendo mais estreitos, com patelas mais finas, ângulos maiores de quadríceps e diferenças no tamanho dos côndilos tibiais, levando a uma cinemática diferente, pode influenciar o sexo feminino a ser mais propenso a desenvolver OA, levando a uma maior prevalência de OA em mulheres (29).

1.2 Alterações antatômicas e histológicas na OA

A cartilagem articular é um tecido avascular, alinfático e aneural, sendo os condrócitos como os únicos tipos de células no tecido (31,32). Além dos condrócitos, a cartilagem é formada pela matriz extracelular (ECM), composta de água (mais de 70%) e componentes orgânicos, como colágeno tipo II, III, VI, IX e XI, agrecano, outros proteoglicanos (decorina, biglicano e fibromodulina) e glicosaminoglicanos (31,33). A OA é caracterizada por alteração da estrutura articular, incluindo destruição progressiva da cartilagem, inflamação sinovial, alterações no osso subcondral, menisco, membrana sinovial e gordura infrapatelar. As características estruturais comuns da OA incluem ainda, formação de osteófitos (novas formações ósseas) e alterações na sinóvia e na cápsula articular (28,30).

A cartilagem articular pode ser dividida em quatro camadas: zona superficial (tangencial), zona média (transicional), zona profunda (radial) e uma zona altamente mineralizada de cartilagem calcificada. Esta zona calcificada é separada das camadas superiores de cartilagem não mineralizadas por uma zona histologicamente definida, chamada marca de maré, e divide a cartilagem do osso subcondral subjacente (31,34,35). As camadas são caracterizadas pela forma e posicionamento dos condrócitos, bem como pela orientação das fibrilas de colágeno (36,37). Na zona superficial, os condrócitos são em forma de disco e as fibrilas de colágeno são orientadas horizontalmente. As fibrilas de colágeno na zona média são direcionadas

diagonalmente e os condrócitos de forma redonda são localizados aleatoriamente. A zona profunda é definida por colunas verticais de condrócitos juntamente com fibrilas de colágeno alinhadas radialmente. Na cartilagem calcificada, as fibrilas de colágeno são dispostas perpendicularmente à superfície articular (38). A população de condrócitos é escassa nesta zona e eles têm uma forma arredondada sem posicionamento específico (39).

Sobre as alterações observadas na OA, a matriz da cartilagem parece ser alterada precocemente e sofre várias alterações patológicas. À medida que os mecanorreceptores detectam forças físicas, os condrócitos respondem com uma adaptação de sua atividade metabólica. Uma das primeiras mudanças, que resulta de carga mecânica excessiva, é um aumento do teor de água na zona superficial da cartilagem articular, com a perda de glicosaminoglicanos (GAG) e degradação de proteoglicanos. À medida que a OA avança, um processo conhecido como inchaço da matriz se expande para a zona profunda (16). (Figura 1)

No estágio inicial da OA, quando as alterações das articulações macroscópicas ainda não são vistas, a matriz da cartilagem passa por mudanças através de enzimas degradantes. Durante este estágio, as agressões de ADAMTS (uma desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina), particularmente ADAMTS-4 e ADAMTS-5, clivam a proteína do núcleo agrecano da espinha dorsal do ácido hialurônico (40). O local de clivagem está localizado abaixo da parte rica em GAG do agrecano, o que leva o descolamento do agregado de proteoglicanos. Como as moléculas GAG são responsáveis pelas propriedades osmóticas da matriz da cartilagem, sua função é interrompida. Com isso, os condrócitos aumentam sua atividade sintética, como em uma tentativa de compensar a degradação de agrecano. Esta degradação é vista primeiramente na camada superficial, apresentando-se como fibrilação superficial da cartilagem (41). Outra família de enzimas degradantes da matriz são as metaloproteinases de matriz (MMP). Estas participam da degradação da matriz, sendo a MMP-13 uma das mais expressas na OA (42). Sua função, como de outras MMP (MMP-1 e MMP-3), é uma interrupção da rede de colágeno. Embora o MMP-13 possa degradar vários colágenos e até mesmo o agrecano e outras proteínas, o alvo principal do MMP-13 é o colágeno tipo II, que é o tipo mais comum de colágeno na estrutura da cartilagem (43). Assim, o desequilíbrio entre processos anabólicos e catabólicos leva a novas mudanças estruturais e progressão da OA (21).

Além das mudanças na matriz extracelular, a matriz pericelular também sofre degradação pelo aumento da ativação de proteinases. Durante a tentativa de reparo do dano da matriz da cartilagem induzidos por carga mecânica excessiva, os condrócitos se reúnem para aumentar ainda mais sua atividade sintética. Para manter a alta atividade metabólica, os condrócitos experimentam uma resposta proliferativa, mas também se ajustam passando por diferenciação hipertrófica (39). Estas alterações superficiais, como as fibrilações, se estendem distalmente no tecido, formando fissuras profundas, levando à delaminação da cartilagem, evidenciando a calcificação da cartilagem e exposição do osso subcondral (31). O afinamento da cartilagem articular hialina é acompanhado pela expansão da cartilagem calcificada subjacente, o que também contribui para o aumento do estresse mecânico e a produção adicional de fatores catabólicos (1). Além disso, um aumento da camada de cartilagem calcificada avança para a cartilagem articular sobrejacente (44).

Mesmo que o dano progressivo à cartilagem e sua eventual perda tenham sido as características mais mencionadas da OA no passado, agora é bem aceito que as alterações ósseas subcondrais e a inflamação sinovial também influenciam todas as outras estruturas da articulação. Os osteoclastos desempenham um papel fundamental na OA ao contribuir para a redução da massa óssea subcondral e a perda da estrutura trabecular por meio da reabsorção óssea. Além disso, eles estimulam o crescimento de nervos e vasos sanguíneos no osso subcondral, o que intensifica a dor e promove a progressão da doença. Em contrapartida, os osteoblastos, sob condições normais, são responsáveis pela formação de novo tecido ósseo. No início da OA, porém, esses osteoblastos liberam níveis elevados de RANKL, TGF- β e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), os quais têm funções relevantes no desenvolvimento e progressão da OA (45). Essas moléculas desencadeiam uma série de efeitos em cascata: o RANKL promove a maturação dos osteoclastos, o VEGF estimula a angiogênese anormal, e o TGF- β está associado ao desenvolvimento de osteosclerose nos estágios mais avançados da doença. Dessa forma, a atividade desregulada entre osteoclastos e osteoblastos contribui para a progressão da OA, exacerbando tanto a degeneração óssea quanto os sintomas de dor crônica (46).

As mudanças estruturais dos ossos próximos às articulações são características importantes da doença, confirmando que a OA é uma doença articular completa. Em relação à taxa de remodelação mais lenta da cartilagem articular, o osso subcondral sofre modelagem e remodelação mais rápidas em resposta a mudanças no ambiente

mecânico (46). O osso subcondral consiste em duas camadas: a camada em forma de placa de osso cortical abaixo da cartilagem calcificada, também conhecida como placa óssea subcondral, e a camada mais profunda de osso trabecular (47,48). A estrutura do osso subcondral depende principalmente de dois tipos de células que sintetizam o osso novo e reabsorvem o antigo em resposta ao ambiente local: osteoblastos e osteoclastos (46).

As lesões da medula óssea representam microdanos ao osso e são caracterizadas por fibrose localizada, cistos e um aumento local no remodelamento ósseo que resulta em microfraturas do osso trabecular (49). Essas características são comumente associadas à erosão e fissuras da cartilagem sobrejacentes, particularmente com o osso subcondral exposto (50). Também foi descoberto que o aparecimento de lesões da medula óssea e áreas desnudadas do osso subcondral estão relacionados a sintomas clínicos, particularmente a dor (51). Com o aumento iniciado do *turnover* ósseo e a neovascularização do osso subcondral, vasos recém-formados, juntamente com os nervos, se infiltram no osso, invadem o tecido cartilaginoso sobrejacente, formando um canal de comunicação para a troca de fatores biológicos (46). Este processo é outro mecanismo que causa dor na OA. O desenvolvimento de cistos ósseos subcondrais, uma característica importante da OA avançada, depende da reabsorção óssea mediada por osteoclasto, um processo iniciado por dano ósseo e necrose nos locais de lesões antigas (16). Como um mecanismo adaptativo adicional, os osteófitos se formam nas margens articulares via ossificação endocondral (21).

Outra estrutura importante no complexo articular do joelho que também sofre alterações na progressão da OA é a gordura infrapatelar ou gordura de Hoffa. Este tecido está localizado no compartimento anterior do joelho, entre a sinóvia e a cápsula articular. Possui função de amortecedor para reduzir o impacto do peso, protegendo o joelho de danos mecânicos (52). Este é um tecido muito sensível, que contém adipócitos, fibroblastos, macrófagos e outras células imunes (53). Ele é innervado por nociceptores, como as fibras C, que produzem e liberam a substância P na articulação de pacientes osteoartrosicos (52). Em pacientes com OA, foram encontrados um aumento do número de macrófagos na gordura infrapatelar e seus marcadores foram semelhantes aos macrófagos do sinóvia do tecido adiposo subcutâneo, caracterizados pela expressão de CD11c e CD206 (54). O complexo da gordura infrapatelar é um potente produtor de adipocinas e citocinas, o que torna essa região

um órgão endócrino ativo (55). Em pacientes com OA, é relatado que a gordura infrapatelar e fluido sinovial contêm quantidades significativas de fator de crescimento fibroblástico (FGF-2), VEGF, Fator de necrose tumoral (TNF) e Interleucina -6 (IL-6). Além disso, a gravidade da OA do joelho parece estar associada à concentração de leptina (uma adipocina) no líquido sinovial (56). Coletivamente, alterações na almofada de gordura infrapatelar podem ser uma possível causa de dor crônica no joelho em OA (57,58).

Outro importante risco para o desenvolvimento de OA do joelho são as lesões de menisco, devido a reduções na resistência a forças mecânicas, como tensão, compressão e tensão de cisalhamento (59). A perda da função do menisco leva à OA devido à instabilidade articular e a distribuição anormal de peso no tecido meniscal (60,61). Além disso, em pacientes com OA confirmada radiograficamente, o dano ao menisco está quase sempre presente, causando em perdas de suporte de carga, absorção de choque, lubrificação e instabilidade, o que pode levar a alterações estáticas na articulação tibiofemoral, levando a danos na cartilagem articular, bem como no osso subcondral, contribuindo para a progressão da OA do joelho (60,63).

Alterações na musculatura esquelética também mostraram ter relação com o desenvolvimento da OA. Uma das principais limitações funcionais na OA do joelho é a disfunção do músculo quadríceps, isquiotibiais e músculos do quadril (62). A fraqueza dos músculos periarticulares tem um impacto significativo na biomecânica do joelho. No entanto, não está claro se a fraqueza muscular está associada ao início da OA ou à progressão da OA (63,64).

Em um conceito mais atual sobre a progressão da OA, tem relacionado a sinovite com principal responsável pelo seu progresso e degeneração. A membrana sinovial, juntamente com o fluido sinovial, constitui a sinóvia (65). O fluido desempenha um papel crucial na nutrição da cartilagem. A cartilagem avascular utiliza o fluido sinovial como fonte de nutrientes, mas também como reservatório para seus produtos degradantes (66). A membrana sinovial consiste em camada íntima (revestimento) e subíntima (de sublinhamento) de até 5 mm de espessura em indivíduos saudáveis (67,68). Duas a três camadas de células metabolicamente altamente ativas (sinoviócitos) ficam sobre o tecido conjuntivo solto vascularizado para formar o subíntimo, com muitos fibroblastos secretores de colágeno (65,67,68). Dois tipos de macrófagos foram encontrados na sinóvia: M1 e M2 que desempenham um papel vital na regulação precisa da inflamação e regeneração tecidual.(69). Na OA do joelho, os

macrófagos são mediadores importantes, pois produzem fator de crescimento endotelial vascular, que pode ser um possível mecanismo que causa sinovite e inflamação (70).

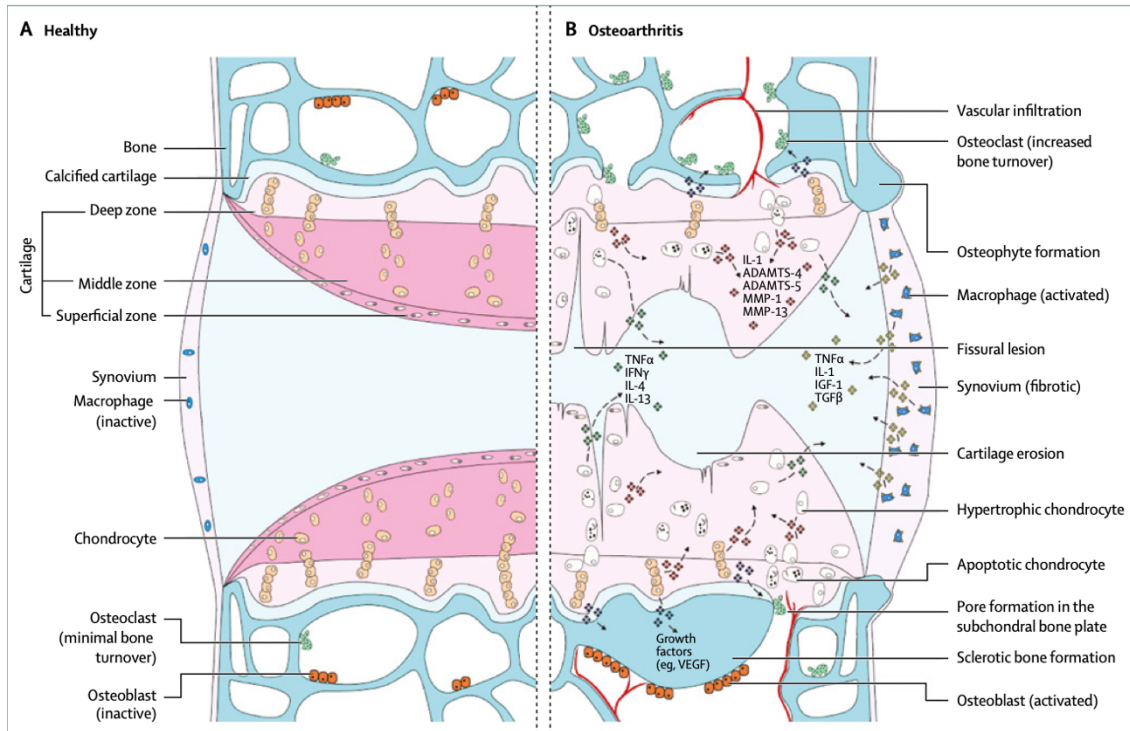


Figura 1: Representação esquemática das alterações no complexo articular do joelho saudável e com osteoartrite. Hunter & Bierma - Zeinstra, 2019.

A sinóvia articular é composta por uma camada de revestimento sinovial e um compartimento subjacente. Os macrófagos, uma das células imunes mais abundantes na sinóvia, estão localizados principalmente na camada de revestimento sinovial junto com os fibroblastos e desempenham um papel crítico na manutenção da homeostase dos tecidos sinoviais saudáveis (71). Ambos os macrófagos sinoviais residentes em tecidos (isto é, derivados embrionários) e os macrófagos sinoviais não residentes em tecidos (isto é, derivados da medula óssea/monócitos) são capazes de autorrenovação, embora os macrófagos sinoviais residentes em tecidos possam persistir independentemente da hematopoiese da medula óssea por períodos prolongados (55).

Os monócitos e macrófagos são fundamentais na sinovite relacionada à OA, pois atuam como células inflamatórias que liberam uma variedade de fatores neurotróficos, citocinas, padrões moleculares associados a danos e quimiocinas.

Esses mediadores podem ativar neurônios locais, estimulando a nocicepção e sensibilizando as células nervosas, além de desencadear processos inflamatórios (72).

Foi demonstrado que macrófagos não residentes em tecidos se diferenciam em fenótipos pró-inflamatórios semelhantes a M1 ou anti-inflamatórios semelhantes a M2 após retornarem aos tecidos, regulando a inflamação e a cicatrização (73). Além disso, os macrófagos que se desenvolvem após o nascimento geralmente representam um fenótipo misto (F4/80⁺/CD11b⁺), dificultando ainda mais a distinção entre precursores embrionários e derivados da medula óssea (74–76). Na tentativa de elucidar a origem dessas populações diferenciais de macrófagos, Culemann e colaboradores examinaram a composição dos macrófagos na sinóvia. O grupo identificou dois subtipos distintos de macrófagos sinoviais: CX3CR1⁻ intersticial e CX3CR1⁺ macrófagos de revestimento (camada sinovial íntima). Curiosamente, os macrófagos de revestimento CX3CR1⁺ também exibiram uma resposta limitada à estimulação inflamatória, conservaram seu estado *naïve* e restringiram a progressão inflamatória através da formação de uma barreira (77). Ainda, macrófagos e monócitos também foram detectados no líquido sinovial das articulações OA(78).

Independentemente de sua origem, é bem reconhecido que os macrófagos sinoviais são uma importante fonte de moléculas de sinalização pró-inflamatórias pós-lesão articular, incluindo alarminas (por exemplo, a proteína da família S100) (79) e citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF (80). Além disso, macrófagos sinoviais CD14⁺ humanos são relatados por ativarem a produção de MMPs pelos fibroblastos sinoviais (81). Embora alguns macrófagos, particularmente o fenótipo tipo M2, possam liberar citocinas anti-inflamatórias, incluindo IL-4 e IL-10, essas moléculas anti-inflamatórias muitas vezes não são suficientes para controlar a resposta inflamatória catabólica, particularmente devido à presença de um alto número de macrófagos com perfil M1 (82). Como resultado, essas MMPs e mediadores inflamatórios mudam o perfil de citocinas do líquido sinovial articular em favor da inflamação com altos níveis de IL-1 β , IL-6 e CXCL8/IL-8, estimulando os condrócitos a produzir mais enzimas degradativas da matriz extracelular e agravando ainda mais destruição da matriz da cartilagem.

Embora a função de monócitos e macrófagos seja bem compreendida, o papel das células T, mastócitos e fibroblastos na dor e na progressão da OA, ainda está sendo explorado. Um estudo realizado por Rosshirt e colaboradores (83) revelou uma

infiltração de células T CD4+ na sinóvia, que apresentou níveis elevados dos receptores CCR5 e CXCR3, correlacionando-se especificamente com a dor nas articulações. Além disso, níveis aumentados de interleucina-17 (IL-17), foram detectados após a indução experimental de OA e no fluido sinovial de pacientes com OA, revelando que a IL-17 seja um mediador da dor tanto no nível local (sinóvia) quanto central (cérebro) (84)(85).

Estruturalmente relacionada aos interferons, a IL-10 exerce seu efeito ao se ligar ao receptor IL-10R, um heterodímero composto pelas subunidades IL-10R1 e IL-10R2. Embora seja produzida principalmente por células do sistema imunológico, a IL-10 também é sintetizada por condrócitos, desempenhando um papel crucial na renovação da matriz extracelular da cartilagem. Após a ligação ao receptor, a via intracelular da cinase JAK-STAT é ativada, levando à expressão de genes dependentes da IL-10. Isso resulta em um efeito condroprotetor, antiapoptótico de condrócitos e anti-inflamatório, mediado pela estimulação da síntese de colágeno tipo II e agrecano, além da inibição da produção de metaloproteinases da matriz (MMPs) (86). Além disso, a IL-10 manifesta suas propriedades anti-inflamatórias ao estimular a produção de antagonistas da IL-1 β pelos macrófagos e inibir citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-12. Estudos *in vitro* demonstraram que o tratamento com IL-10 em modelos de lesão da cartilagem resulta em efeitos condroprotectores e aumento do conteúdo de GAGs. Ainda, implantes de condrócitos autólogos tratados com IL-10 mostraram melhora na diferenciação dos condrócitos e na formação da matriz da cartilagem. (87)

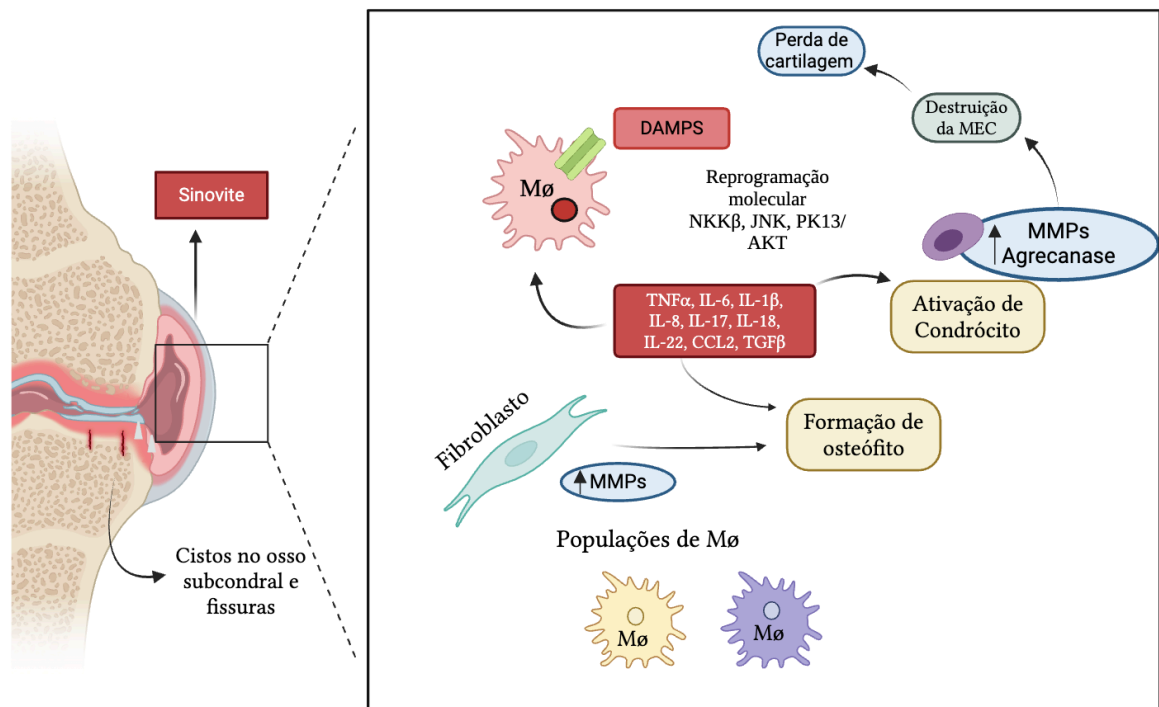


Figura 2: Representação esquemática da relação da sinovite com o desenvolvimento da osteoartrite. Destacando o papel das metaloproteinases, populações de macrófagos e citocinas pró inflamatórias. Imagem criada pela autora pelo App BioRender

A IL-1 β está envolvida em uma série de eventos que estão relacionados à destruição da cartilagem. A IL-1 β induz a síntese da MMP-1, MMP-3, MMP-9 e MMP-13 pelos condrócitos, que, por sua vez, destroem a cartilagem articular, reduzindo a produção de colágeno tipo II e causando a apoptose de condrócitos (3,30,88). Esta relação se explica devido à expressão dos receptores de IL-1 expressos em muitos tipos de células diferentes, incluindo condrócitos tanto em articulações saudáveis (89).

Outra citocina que possui efeitos deletérios na lesão da OA é o TGF- β . Estudos mostraram que o TGF- β têm um conjunto diverso de efeitos nos processos celulares, incluindo a proliferação celular, reconhecimento, diferenciação, morfogênese, apoptose, homeostase do tecido e regeneração (90). O aumento da atividade de TGF- β pode aumentar a expressão de enzimas degradativas da cartilagem, como MMP-13. Por exemplo, o TGF- β diminui a atividade miR-140 em condrócitos humanos, um microRNA originalmente encontrado na cartilagem e que regula negativamente a expressão de genes conhecidos por desempenhar papéis prejudiciais na cartilagem OA, como a própria MMP-13 (91).

Além de citocinas, padrões moleculares endógenos (DAMPs – danger-associated molecular patterns) também participam das lesões da OA, como representantes da família S100 (ROSENBERG JH, et al 2017). S100A8 e S100A9 são proteínas de baixo peso molecular e são 100 % solúveis em amônia. Quando liberadas, S100A8/9 se ligam predominantemente a TLR4, seu principal receptor em monócitos e condrócitos humanos. De maneira interessante, camundongos deficientes para S100A9 apresentaram significativa redução da inflamação sinovial e degeneração da cartilagem articular em um modelo de OA induzido por colagenase (92,93). A Figura 1 mostra, de maneira esquemática, as alterações que ocorrem na articulação com OA em relação à uma articulação saudável.

A sinóvia desempenha um papel central nos processos relacionados à patogênese da OA. Caracteriza-se por alterações como hiperplasia tecidual, infiltrado inflamatório e fibrose, predominantes na sinovite. Essa condição patológica ocorre tanto em estágios iniciais quanto avançados da OA, correlacionando-se diretamente com a gravidade dos sintomas clínicos e o grau de degeneração articular. A transformação da membrana sinovial e a resposta dos fibroblastos sinoviais às mudanças no microambiente articular são evidentes, embora ainda não esteja claro se essas alterações agem como mecanismo inicial ou perpetuador da doença (94).

Os fibroblastos sinoviais produzem mediadores como IL-1, IL-6 e TNF- α , citocinas fundamentais na patogênese da OA. Além disso, secretam quimiocinas como IL-8/CXCL8 e RANTES/CCL5, que recrutam linfócitos, macrófagos e granulócitos. Outros mediadores incluem fatores de crescimento, óxido nítrico, prostaglandina E2 (PGE2) e enzimas como metaloproteinases de matriz (MMPs 1, 3, 9 e 13) e proteases extracelulares da família ADAMTS (39,94). Esses agentes promovem o recrutamento de leucócitos, prejudicam a viabilidade dos condrócitos, favorecem a angiogênese e a destruição da matriz extracelular, alimentando um ciclo de retroalimentação que intensifica a destruição articular (18,94).

Existem, no entanto, dois subconjuntos principais diferentes de FLS na membrana sinovial. A proteína de ativação de fibroblastos alfa + (FAP α +) antígeno de célula do timo 1+ (THY1+) FLS, localizada no sub-revestimento sinovial, promove seletivamente a inflamação na artrite com pouco efeito na destruição óssea e da cartilagem e o FAP α +THY1-FLS, localizado na camada de revestimento sinovial, que promove seletivamente o comprometimento ósseo e da cartilagem com pouco efeito

na inflamação. Assim, os dois subtipos de FLS não sobrepostos explicam os processos inflamatórios e destrutivos que fundamentam a OA-FLS(95).

1.3 A dor na OA

A OA é uma das principais causas de dor crônica e dificuldade de locomoção em idosos. A dor da OA é tipicamente agravada pelo movimento articular e aliviada com o repouso. Esta dor tende a ser localizada na(s) articulação(s) afetada(s), mas em casos mais avançados da doença esta dor por ser irradiada para outras regiões devido ao comprometimento neuronal. Nos estágios iniciais da doença, a dor ocorre de maneira intermitente, tornando-se mais frequentes e graves à medida que a doença progride (96). Embora a perda de cartilagem seja uma característica estrutural importante, ela não é inervada e, portanto, não pode ser uma fonte direta de dor em doenças leves a moderadas. Dentro da articulação há neurônios sensoriais associados com a percepção de dor (nociceptores) em muitos dos tecidos anatômicos afetados pela OA, incluindo o periósteo e o osso subcondral, tecidos moles, incluindo inserções ligamentares menisco e sinóvia (96).

O osso é um tecido mecanorresponsivo com múltiplas alterações durante a OA. A nova formação óssea (osteofitose) se forma inicialmente como um condrofito e ocorre em vários locais da articulação, provavelmente como uma resposta mecanoadaptativa e, dependendo da localização, contribuem para experiência de dor nos pacientes com OA (97). Os nociceptores inervam diferentes tecidos no joelho, incluindo a sinóvia, o tecido adiposo intrapatelar, a cápsula articular, as margens do menisco e os locais de inserção dos ligamentos cruzados (98).

A dor da OA é classicamente considerada uma condição de dor nociceptiva decorrente do excesso de peso em uma articulação em processo de desgaste. À medida que a articulação OA se decompõe, os nervos do osso subcondral ficam expostos ao meio intra-articular, que é rico em mediadores inflamatórios. Os nervos sensoriais em outros tecidos articulares, como o tecido sinovial e de meniscos, também estão em contato com essas moléculas pró-algésicas, levando à sensibilização periférica e à geração de dor inflamatória (99,100).

Ao contrário da dor nociceptiva, que é causada por danos teciduais reais ou estímulos potencialmente prejudiciais aos tecidos, a dor neuropática ocorre por danos ao próprio sistema nervoso. A definição de dor neuropática é "dor causada por uma lesão ou doença do sistema somatossensorial", que inclui fibras nervosas periféricas

(fibras A β , A δ e C) (101,102) e nervos no sistema nervoso central (103). Durante o desenvolvimento da OA, foi demonstrado que o dano neuronal pode ocorrer na articulação lesada, nos gânglios da raiz dorsal e na medula espinhal (100).

A articulação do joelho é inervada por fibras nervosas periféricas sensoriais e simpáticas, que realizam ações como nocicepção, vasorregulação e propriocepção. Os nervos sensoriais consistem em fibras finas A δ mielinizadas (grupo III; condução rápida) e fibras não mielinizadas C (grupo IV; condução lenta), que inervam a cápsula articular, sinóvia, ligamentos, meniscos, periósteo e osso subcondral. As fibras A β mielinizadas espessas (grupo II) que inervam a membrana sinovial, a cápsula articular, as bolsas periarticulares, o coxim adiposo, os ligamentos, os meniscos e o periósteo ósseo adjacente são os principais responsáveis pela mecanossensibilidade não nociva e pela propriocepção. Como a cartilagem articular não é inervada e é avascular em condições fisiológicas normais, os tecidos ricamente inervados descritos acima são a fonte de nocicepção na OA. Os nervos sensitivos e simpáticos podem aparecer na cartilagem articular na OA leve e grave através de canais vasculares. As fibras A β são ativadas pelo movimento articular, enquanto as fibras A δ e C são ativadas por estímulos mecânicos, térmicos e químicos nocivos, como mediadores inflamatórios. As fibras A δ se projetam da periferia para as lâminas I e V do corno dorsal da medula espinhal, enquanto as fibras C fazem sinapse com neurônios de segunda ordem na lâmina II do corno dorsal (96,104).

Os corpos celulares dos nervos aferentes que inervam o joelho residem nos gânglios da raiz dorsal (DRG), níveis lombares 3-5 (L3-L5). Uma extensa literatura documenta profundas alterações moleculares e celulares nos DRGs em uma variedade de modelos experimentais de dor inflamatória crônica e neuropática, incluindo alterações na excitabilidade neuronal, produção de quimiocinas e citocinas e presença de células inflamatórias (105,106). A ideia de que a sinovite pode conduzir ao início inflamatório da dor, inclusive, contribuindo para a intensidade, tem sido alvo de pesquisas. A quimiocina CCL2 também foi relacionado na sensibilização à dor em OA experimental em camundongos, causando aumento da infiltração de macrófagos nos gânglios da raiz dorsal e retardando o desenvolvimento de comportamento semelhante à dor (nocicepção) (106). Outra quimiocina relacionada à dor na OA é a CCL17, juntamente com as citocinas TNF e (Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos-Macrófagos) GM-CSF. Foi relatado que pode haver uma interdependência de TNF e GM-CSF levando à ativação do eixo GM-CSF-CCL17, o

que pode ajudar a explicar algumas das funções álgicas e pró-inflamatórias do TNF. Curiosamente, esta via do GM-CSF-CCL17 também parece regular a dor e a doença da OA experimental induzidas por colagenase (107). De forma interessante, o mRNA de CCL17 foi altamente expresso no osso e na cartilagem durante a dor no modelo de OA induzida por iodoacetato monossódico em ratos (108).

1.4. O Controle da Resposta Inflamatória: Papel da Anexina A1

A inflamação é uma resposta de defesa que ocorre quando os tecidos do corpo são invadidos ou danificados e tem por finalidade a restauração da homeostase tecidual (109). Por outro lado, evidências indicam que a inflamação descontrolada é um componente proeminente de muitas doenças comuns, incluindo doenças inflamatórias bem conhecidas, como artrites e doença periodontal, bem como doença inflamatória intestinal, doença cardiovascular, doenças neurodegenerativas, asma, câncer, síndromes metabólicas diabetes e doenças autoimunes (110). A OA é caracterizada por uma inflamação moderada na membrana sinovial (sinovite), com aumento de atividade pró-inflamatória de células residentes nesta região, como os fibroblastos e macrófagos sinoviais. Com a identificação das funções destas células na patogênese da OA, é sugerido que fármacos anti-inflamatórios que reduzam suas atividades possam ser utilizados para o tratamento da OA (111).

Diferentemente dos mecanismos anti-inflamatórios, a resolução da inflamação é um processo controlado e ativo que potencializa a eliminação de estímulos incitantes, promovendo a apoptose e eferocitose de células polimorfonucleares (PMN), estimulando o recrutamento não flogístico de macrófagos e a reprogramação de macrófagos (Serhan et al., 2007; Perretti, & Teixeira, 2019). Esses eventos favorecem o fim da inflamação e a restauração da homeostase do tecido. Inicialmente ocorre uma fase de resolução se expandindo do pico do acúmulo de PMN até seu declínio completo no tecido afetado. Embora estes processos possam parecer simplistas, esses sistemas são eficazes, permitindo a identificação de moléculas endógenas pró-resolução e sua clareza ao longo das diferentes fases da inflamação, bem como suas principais fontes (112).

Terapeuticamente, compostos anti-inflamatórios têm sido usados extensivamente por séculos, e avanços contínuos têm sido feitos para desenvolver agentes inovadores, melhorando sua farmacologia, reduzindo efeitos colaterais e descobrindo novos alvos. Embora o uso de medicamentos anti-inflamatórios a curto

prazo seja relativamente seguro, seu uso prolongado, como em doenças inflamatórias crônicas, é comumente acompanhado por efeitos colaterais notáveis (por exemplo, densidade mineral reduzida e risco aumentado de fratura óssea; efeitos metabólicos, como metabolismo de glicose prejudicado e resistência à insulina; efeitos gastrointestinais, como sangramento e dores de estômago; e problemas dermatológicos, incluindo atrofia da pele e cicatrização de feridas perturbada) e um risco aumentado de imunossupressão (113,114).

O conhecimento dos mecanismos de pró-resolutivos foi adquirido principalmente por meio de modelos inflamatórios agudos de auto-resolução, onde a resolução completa é simplificada pela análise da depuração total do acúmulo de PMN no local inflamatório, com a fase de resolução se expandindo do pico do acúmulo de PMN até seu declínio completo no tecido afetado. Esses sistemas são eficazes, permitindo a identificação de moléculas endógenas de pró-resolução principais e sua correlação ao longo das diferentes fases da inflamação (112). É importante ressaltar que as moléculas de pró-resolutivas também podem apresentar efeitos anti-inflamatórios, por exemplo, bloqueando sinais pró-inflamatórios e recrutamento de PMN.

No entanto, as moléculas anti-inflamatórias não necessariamente exibem propriedades de pró-resolução, por exemplo, induzindo a reprogramação de macrófagos e aumentando a eferocitose. Além disso, já foi descrito que a terapia anti-inflamatória precoce, administrada durante as etapas iniciais da inflamação, pode afetar a produção de mediadores pró-resolução, especialmente aqueles derivados de ácidos graxos poli-insaturados (mediadores pró-resolução especializados, SPMs) (115).

O controle da inflamação é uma necessidade para o tratamento de variadas doenças com as mais diversas etiologias. Utilizando modelos de inflamação aguda e autorresolutiva, vários mediadores endógenos anti-inflamatórios e pró-resolutivos foram identificados em diferentes momentos da inflamação, os quais controlam a intensidade da inflamação e iniciam programas para sua resolução. Dos mediadores pró-resolutivos já conhecidos, é possível citar a Anexina A1 (AnxA1), a lipoxina A4, a Resolvina D1 (RvD1), dentre outros (116). Os mediadores pró-resolutivos possuem algumas propriedades que os qualificam durante o processo de resolução da inflamação. A etapa 1 consiste em interromper o recrutamento de células do sistema imune com propriedades pró-inflamatórias derivadas do sangue, como os neutrófilos

(uma marca registrada da inflamação aguda); a etapa 2 ele irá promover o recrutamento não flogístico de monócitos; na etapa 3 ele será capaz de induzir a apoptose de células imunes extravasadas; na etapa 4, o pró-resolutivo poderá aumentar o engolfamento de células apoptóticas por células residentes (denominadas eferocitose), normalmente por macrófagos, o que previne a necrose e a liberação de fatores inflamatórios, incluindo IL-1 β , IL-6, TNF- α e espécies reativas de oxigênio (ROS).

Os mediadores endógenos da inflamação, como a AnxA1, têm potencial como ferramentas terapêuticas para tratar doenças inflamatórias. Embora o uso clínico de estratégias pró-resolução ainda necessite de mais evidências sobre eficácia e possíveis efeitos adversos, acredita-se que essas abordagens sejam promissoras, com menos efeitos colaterais, por mimetizarem vias naturais de resolução da inflamação (117,118).

A AnxA1 pertence à superfamília de anexinas (13 membros) que se ligam a superfícies de membrana carregadas negativamente via íons de Ca²⁺. Esta é uma proteína de 37 kDa, possui uma região central homóloga que compreende 90% da estrutura e um domínio N-terminal bioativo único. Essa conformação permite a ligação a receptores específicos, como os receptores de peptídeos formil (FPRs). Sua atividade pró-resolutiva atua como um inibidor da fosfolipase A2 (PLA2) e da síntese de eicosanoides, a AnxA1 também modula a resposta inflamatória, regulando processos celulares por meio de interações com FPRs.. Em ambientes inflamatórios, a AnxA1 intacta (37 kDa) pode ser clivada por proteinase-3 e elastase neutrofílica, gerando uma isoforma de 33 kDa (inativa) e peptídeos derivados do N-terminal (117–119). (Figura 3)

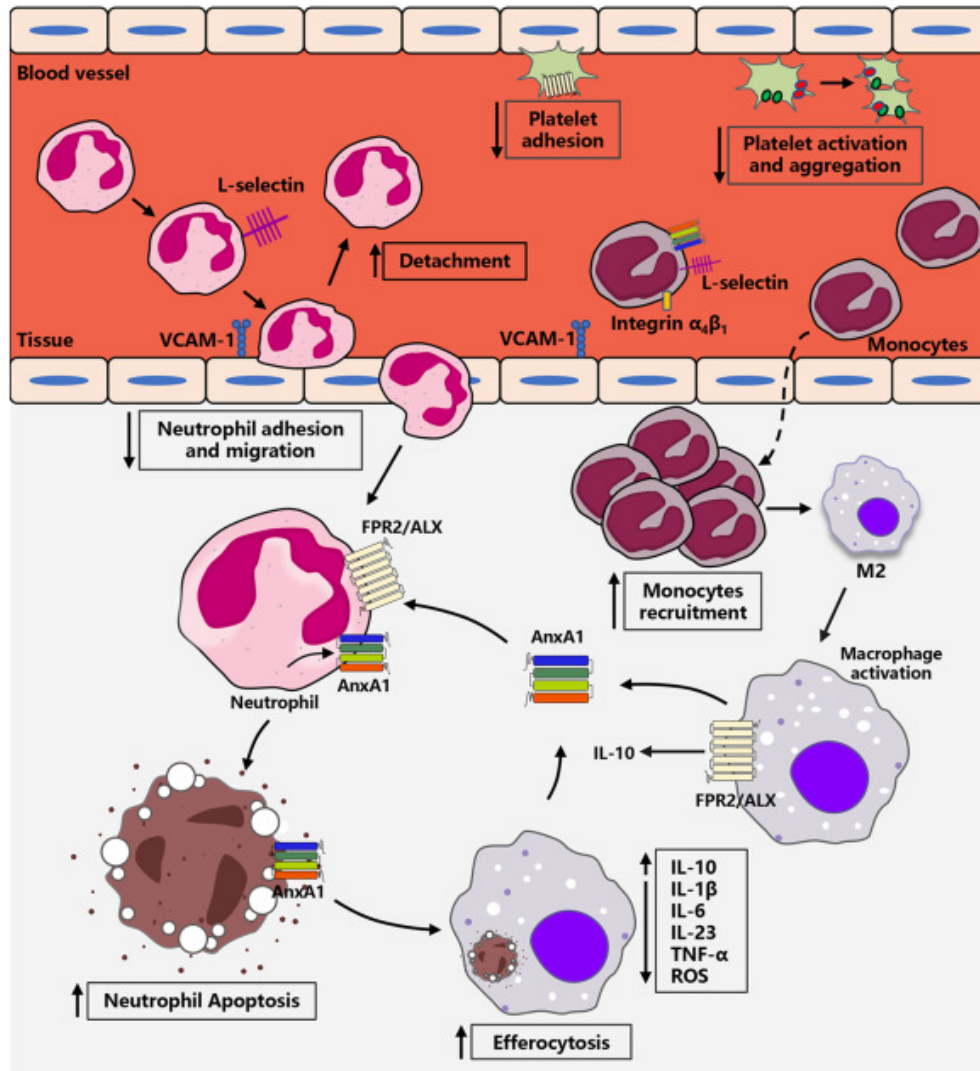


Figura 3. Representação esquemática da Anexina A1 na inibição da inflamação. Zhibin Yan, Xurui Cheng, Tao Wang, Xiangyu Hong, Gang Shao, Caiyun Fu, 2022.

A AnxA1 possui importantes características como um mediador pró-resolutivo, incluindo a indução da apoptose de granulócitos, a eferocitose, a diferenciação de macrófagos para um perfil M2/Mres e a promoção do de reparo tecidual (118). Em condições fisiológicas, a AnxA1 está presente em grânulos de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e em alguns subtipos de linfócitos (121,122). Esta proteína atua como um potente modulador endógeno da inflamação, inibindo a atividade de enzimas que atuam na produção de mediadores pró-inflamatórios e interferindo no processo de transmigração dos leucócitos (121,123) (124) (125,126).

As ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas da AnxA1 ocorrem através da interação com o receptor de peptídeos formilados FPR2/AXL, o quais são receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana (127). Após essa interação, a porção α da Proteína G S (estimulatória) se liga e ativa a adenilato ciclase,

a qual aumenta os níveis de Adenosina mofosfato cíclica (cAMP) pela conversão de ATP para cAMP. As elevações nos níveis intracelulares do cAMP ativam a proteína quinase A (PKA) e a proteína de troca diretamente ativada por vias dependentes do cAMP (Epac). A PKA fosforila o fator de transcrição Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), levando à transcrição de citocinas anti-inflamatórias e à produção de mediadores pró-resolução, como a própria AnxA1 e a 5-lipoxigenase (Alox5), enzima que leva à produção de 15-epi-lipoxina A4. Além disso, a PKA inibe a proteína cinase GSK3 (Glicogene Sintase Kinase 3), a via PI3K/Akt e NF-κB, diminuindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e sinais pró-sobrevivência (128).

Experimentalmente, camundongos deficientes para AnxA1 desenvolveram doença articular mais grave (caracterizada por aumento da destruição da cartilagem e um tecido mais espesso no dia sete) do que camundongos de tipo selvagem em um modelo de artrite monoarticular induzida por antígeno. Níveis aumentados de mRNA de IL-1 e IL-6 também foram detectados nas articulações desses camundongos (129). Em modelo de artrite gotosa aguda, camundongos deficientes para AnxA1 apresentaram maior número de neutrófilos acumulados na articulação quando comparados com animais selvagens. De maneira interessante, a expressão de AnxA1 está aumentada no tecido articular em fases envolvidas com a resolução da inflamação da gota experimental, indicando que a AnxA1 é importante para o controle dessa inflamação articular (130).

Considerando o papel relevante da AnxA1 para o controle da inflamação, é esperado o desenvolvimento de fármacos que desempenham suas funções para o tratamento de doenças inflamatórias. No entanto, existem várias barreiras fisiológicas relacionadas com a farmacocinética e farmacodinâmica da droga proteica (AnxA1 intacta), como sua degradação por múltiplas enzimas. O Ac2-26 é um peptídeo que mimetiza as ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas da AnxA1. É derivado da porção N terminal da AnxA1 e que pode ser formado via síntese em fase sólida. Devido ao seu baixo peso molecular e estrutura simples, o peptídeo Ac2-26 possui melhor estabilidade e menor imunogenicidade do que a AnxA1 (131). Como um mediador pró-resolutivo, o peptídeo Ac2-26 pode inibir o tráfico de granulócitos e aumentar a eferocitose de células apoptóticas por macrófagos *in vivo* (132), exercendo assim o efeito da resolução da inflamação e do reparo do tecido.

A eficácia farmacológica do peptídeo Ac2-26 vem sendo demonstrada em diferentes tipos de modelos experimentais de doenças agudas e crônicas, onde foram

mostradas a redução do acúmulo de leucócitos tecido inflamado, redução de danos teciduais, aumento da apoptose de neutrófilos e eferocitose, (131,133–136) mostrando ser uma interessante molécula que possa ser utilizada para o controle de respostas inflamatórias.

Alguns estudos tem demonstrado o potencial farmacológico da AnxA1 e também do seu pepítdeo para minimizar a dor, demonstrando sua importância no controle da inflamação. Em 2020, Zhenzhao Luo e colaboradores sugeriram que o Ac2-26 atenua a dor ao inibir a ativação dos astrócitos induzida por LPS e a produção de mediadores inflamatórios (137).

Em um outro estudo, foi demonstrado o mecanismo da anexina A1 para modular TRPV1 e nocicepção em neurônios do gânglio da raiz dorsal. Em animais deficientes de AnxA1, foi demonstrado um aumento do calor nocivo ou a nocicepção induzida por capsaicina e o Ac2-26 aumentou o Ca^{2+} intracelular, dessensibilizou TRPV1 por meio de FPR2 e, assim, reduziu a transmissão nociceptiva e exercendo efeitos analgésicos (138).

2 JUSTIFICATIVA

Como a forma mais prevalente de doença articular, a OA está intimamente associada a sérios problemas de incapacidade funcional, dor e elevados custos pessoais e públicos para tratamento. A gestão abrangente da OA envolve intervenções não farmacológicas, como controle de peso, prática de atividades físicas, artroplastias de joelho, além de opções farmacológicas. Pacientes com sintomas leves geralmente respondem bem a essas intervenções não farmacológicas, enquanto aqueles com formas mais avançadas da doença podem necessitar de uma abordagem combinada. No entanto, ainda não existe um tratamento eficaz que altere de fato o curso da doença, sendo que os objetivos terapêuticos atuais se concentram principalmente em reduzir a dor e minimizar a perda funcional nas articulações.

Embora estudos tenham demonstrado que o acúmulo de leucócitos no tecido articular da OA não é tão acentuado quanto em casos de artrite reumatoide, há um consenso de que a inflamação em grau moderado está presente na OA. Assim, é fundamental investigar moléculas que possam modular essa inflamação. Neste estudo, estamos avaliando o papel da AnxA1 e de seu receptor AXL/FPR2 no controle da inflamação, lesão e disfunção tecidual associada à OA, dada sua capacidade de promover a resolução inflamatória e melhorar o quadro degradativo da doença. A hipótese central deste trabalho é que a AnxA1 desempenha um papel crucial no controle da resposta inflamatória, nociceptiva e na prevenção dos danos estruturais em um modelo experimental de osteoartrite em camundongos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar o papel da AnxA1 na inflamação, lesão e nocicepção da osteoartrite experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar se a AnxA1 endógena e seu receptor controlam a resposta nociceptiva, inflamação e dano articulares dos animais com osteoartrite;
2. Investigar se o tratamento com Ac2-26 reduz a resposta nociceptiva articular dos animais com osteoartrite;
3. Investigar se o tratamento com Ac2-26 reduz a resposta inflamatória e dano articulares dos animais com osteoartrite;
4. Investigar se o tratamento com Ac2-26 regula a expressão gênica e a atividade de sinoviócitos presentes na osteoartrite.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil. Camundongos deficientes para a AnxA1 (AnxA1^{-/-} - Balb/c) e camundongos deficientes para o receptor FPR2/3 (Fpr2/3^{-/-} - C57Bl/6) foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, em microisoladores alocados em estantes para animais com filtros de entrada e saída de ar, em condições de temperatura e luz controladas, com livre acesso à água e ração, e em um ciclo de 12h claro/escuro. O biotério possui autorização para criação de animais geneticamente modificados emitida pela Comissão de Biossegurança do ICB/UFMG (CQB: 038/97). Ao final dos experimentos, os animais foram sacrificados por meio de anestesia, seguido de deslocamento cervical.

4.2 Modelo experimental de Osteoartrite induzida por collagenase (CiOA)

A OA foi induzida através da injeção de collagenase do tipo VII (Sigma-Aldrich; C0773) dentro da cavidade articular (modelo de CiOA – para a degradação direta da cartilagem) e as análises foram avaliadas nos tempos de 7, 21 e 42 após a indução (139). Este projeto foi aprovado pelo CEUA/UFMG sob o número de protocolo 240/2020 (Anexo 1). Os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório e foram realizadas duas injeções com 1 unidade de collagenase em 10 µl de solução salina por joelho, com intervalo de 48 horas entre as duas injeções. Como padronização, utilizamos sempre o joelho direito com a injeção de collagenase e no joelho contralateral foi aplicada solução salina, utilizada para diluir a collagenase.

4.3 Teste de nocicepção mecânica:

Para a determinação da nocicepção articular, foi utilizado um algômetro eletrônico de von Frey (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (140). Os animais foram distribuídos em caixas de acrílico acomodadas sobre uma estante cujo assoalho é composto por uma rede 38 de malha que permite a utilização de um espelho acoplado 25 cm abaixo das caixas com inclinação de aproximadamente 35 graus possibilitando a visualização das patas dos animais. Após a ambientação dos

animais por 30 min, a medição da nocicepção foi realizada utilizando um transdutor de força portátil, com uma ponteira de polipropileno (4,15 mm), foi aplicada uma força vertical e constante na superfície plantar central da pata do camundongo. Este procedimento tinha como objetivo produzir um estímulo mecânico articular para a flexão do joelho. A força suficiente em gramas (g) para desencadear um movimento de retirada da pata, o comportamento aversivo característico para evitar o stress incidente, foi registada por um componente eletrônico do aparelho. O limiar de retirada foi calculado através da repetição do procedimento em triplicado para cada camundongo (e as médias foram expressas em valores absolutos) (140). Os resultados foram expressos pela como o limiar de retirada da pata (em gramas) e através do cálculo da área sob a curva, utilizado o programa GraphPad Prisma 9.

4.4 Tratamento intra-articular com Ac2-26 (i.a)

Camundongos selvagens da linhagem Balb/c foram submetidos a tratamento semanal com injeção intra-articular de peptídeo de Ac-2-26 com concentração de 10 μ M em volume de 10 μ L.

Os grupos foram divididos da seguinte forma (Figura 4):

- tratamento iniciado a partir 7^o dia de indução (>7)
- tratamento iniciado a partir 14^o dia de indução (>14)
- tratamento iniciado a partir 21^o dia de indução (>21)

Antes de cada aplicação, os animais foram anestesiados com isoflurano inalatório. Animais não tratados receberam injeção salina no joelho contralateral. A avaliação da nocicepção foi realizada semanalmente, sempre antes da aplicação do tratamento. Os animais foram eutanasiados no 42^o dia após a indução por deslocamento cervical após serem anestesiados com solução de cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) através de injeção intraperitoneal.

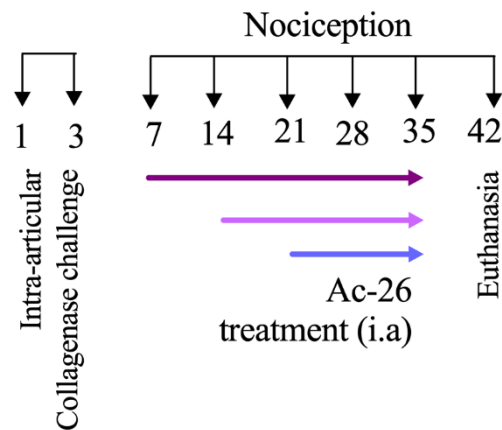


Figura 4: Representação esquemática do tratamento i.a com Ac2-26, medidas de nocicepção e eutanásia.

4.5. Tratamento oral com Ac2-26 (p.o.)

Camundongos selvagens da linhagem Balb/c desafiados com colagenase foram submetidos a um protocolo de tratamento com o peptídeo mimético Ac2-26, administrado por gavagem oral, semanalmente. O tratamento foi iniciado a partir do 21º dia após 150 µM/animal.

Cronograma e Avaliação da Nocicepção:

- Três aplicações nos dias: 21, 28 e 35 .
- As medidas de nocicepção foram realizadas:
 1. Uma hora depois (Figura 5A)
 2. Uma semana após o tratamento (Figura 5B)

Esse protocolo foi desenhado para avaliar tanto os efeitos imediatos quanto prolongados do Ac2-26 na modulação da dor associada à OA, além de observar a progressão do quadro nociceptivo ao longo das semanas de intervenção.

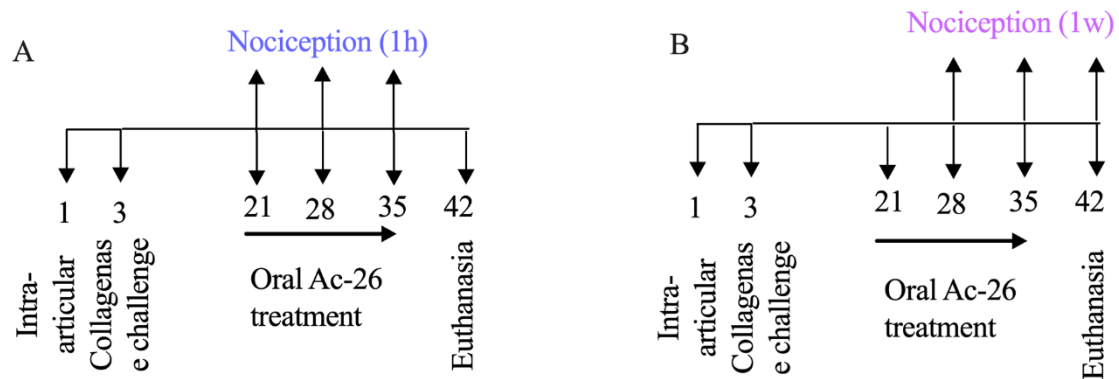


Figura 5: Representação esquemática do tratamento i.o com Ac2-26, medidas de nocicepção e eutanásia. (A) Avaliação da nocicepção após uma hora após o tratamento. (B) Avaliação da nocicepção após uma semana do tratamento.

4.6 Estudo morfológico

As articulações tibiofemorais dos animais foram coletadas após eutanásia e acondicionadas em cassetes para histologia, onde permaneceram por 48 horas em solução de formol tamponado 10 %. Em seguida, os cassetes foram transferidos para solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) a 14 % para descalcificação óssea por 30 dias. Neste período, foi feita a troca da solução de EDTA a cada 48 horas. O processamento da amostra foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Odontologia da UFMG onde os tecidos foram submetidos a etapas de desidratação em etanol com diferentes concentrações (80 %, 90 %, absoluto 1 e 2 – 30 minutos cada) e diafinização em xilol (1 e 2 – 20 a 30 minutos cada). As amostras incluídas em parafina foram cortadas em micrótomo (5 µm de espessura) e fixadas em lâminas histológicas. As lâminas foram coradas em duas técnicas de coloração: hematoxilina e eosina (H&E) (Anexo 2) e também Safranina O fast green (Anexo3) Com a coloração de H&E, foi realizado um escore histopatológico baseado no infiltrado de leucócitos, hiperplasia da membrana sinovial. A coloração de Safranina O fast green foi utilizada para avaliar a perda de proteoglicano na cartilagem, indicativo de lesão da cartilagem, estrutura óssea, erosão óssea e formação de osteófitos. As análises das lâminas foram realizadas em microscópio óptico com aumento de 40 e 400 vezes para avaliação dos parâmetros inflamatórios através de um score articular. A degeneração articular foi então avaliada usando o escore histopatológico OARSI.

4.6.1. Escore Inflamatório

Para refletir melhor o grau de inflamação e as alterações histopatológicas observadas no tecido o score utilizou os seguintes critérios. Intensidade de infiltrado inflamatório: (0) ausente, (1) infiltrado mínimo, (2) infiltrado leve, (3) infiltrado moderado, (4) infiltrado intenso, (5) infiltrado muito intenso) Hiperplasia da membrana sinovial: (0) sem alterações, (1) mínima, (2) leve, (3) moderada, (4) extensa, (5) generalizada/perda. Reabsorção óssea: (0) sem alterações, (1) escassas lacunas de reabsorção, (2) área significativa de perda óssea/cartilagem. Esses critérios somados são representados em um score total que podem totalizar até 12 pontos (0 a 1: ausente, 2 a 4: leve, 5 a 7 moderado, 8 a 10: intenso, 11 a 12: severo). Este escore foi realizado por um patologista especializado e de forma cega

4.6.2 Score de OARSI (*Osteoarthritis Research Society International*)

Para avaliação do grau de lesão articular foi utilizado um escore semi-quantitativo através da análise da coloração faz cartilagens com SafraninaO/*Fast green* em 3 campos randomizados de acordo com a *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI)

Em cada articulação, foram pontuadas as três seções que pareciam mais danificadas. Todas as seções foram pontuadas em uma ordem cega e aleatória. Uma pontuação de 0 representa cartilagem normal, (1) fibrilação superficial sem perda de cartilagem, formação de sulcos verticais, edema focal, ou generalizado da cartilagem, proliferação e hipertrofia dos condrócitos, com formação de aglomerados denominados *clusters*, perda da orientação normal das células, podendo haver também necrose e apoptose de condrócito. (2) fissuras verticais e perda de lâmina superficial, redução da coloração da matriz pela Safranina-O, refletindo a perda de proteoglicanos nas regiões superficiais da cartilagem. (3) fissuras /erosão para a cartilagem calcificada que se estende até <25% da superfície articular, ocorre coloração heterogênea da matriz pela Safranina -O, com áreas de intensa depleção do corante. Alterações dos condrócitos são mais evidentes, com maior proliferação em regiões próximas às fissuras. (4) lesão atinge a cartilagem calcificada por 25–50% da superfície articular, aparecem áreas de delaminação e áreas de escavação na cartilagem, com erosões profundas e por vezes coalescentes, associadas à proliferação e morte de condrócitos. Ocorre intenso esmaecimento de coloração pela Safranina -O. Fragmentos que se despreendem da cartilagem podem ser vistos como

corpos livres (5) lesão atinge a cartilagem calcificada por 50–75% da superfície articular, caracteriza por áreas de desnudamento da superfície cartilaginosa, com exposição do osso subcondral subjacente e deformidade do osso subcondral, podendo haver microfaturas com reparo fibrocartilaginoso e ósseo. (6) a lesão atinge a cartilagem calcificada por mais de 75% da superfície articular (141).

4.7 Western Blotting:

A quantidade de proteína do tecido periarticular do modelo experimental de OA foi determinada pelo reagente de ensaio de Bradford. Os extratos (20 µg) foram separados por eletroforese em SDS-PAGE a 10% e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas serão bloqueadas durante a noite a 4°C com PBS contendo 5% (p/v) de leite desnatado e 0,1% de Tween 20, lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,1% de Tween 20 e depois incubadas com anticorpos anti-AnxA1, e anti-β-actina em PBS contendo 5% (p/v) de BSA e 0,1% de Tween 20. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. As bandas imunorreativas serão visualizadas utilizando um sistema de detecção de ECL. Os valores de AnxA1 ou p-AnxA1 foram quantificados usando software de análise de densitometria (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD). As alterações nos níveis de proteína foram estimadas pelo controle (células não ativadas) e os resultados foram expressos como aumento das unidades arbitrárias de AnxA1 ou p-AnxA1 normalizadas para os valores de β-actina na mesma amostra.

4.8 Citometria de fluxo

Animais com OA tratados ou não com Ac2-26 foram eutanasiados 42 dias após o desafio e o tecido sinovial da articulação tibiofemoral de foi coletado e incubado em 100 µL de 10 mg/L de colagenase VIII (Sigma-Aldrich) em meio DMEM por 1 hora a 37 °C em agitação constante, para digestão enzimática do tecido. As células foram, então, isoladas com auxílio de um filtro Cell Strainer 70 µm, em seguida foram centrifugadas (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C) e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspenso em 100 µL de BSA 1 % em Phosphate-Buffered Saline (PBS), sendo 10 µL dessa suspensão diluído em solução Turk (RenyLab) para contagem do número de células totais por amostra em câmara de Neubauer e os 90 mL restante transferido para placa de 96 poços de fundo em V. Para a preparação das células para marcação, inicialmente as células na placa foram centrifugadas (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C), o

sobrenadante descartado e, então, foi bloqueada com Fc-block 20 µL/poço por 30 min ao abrigo da luz e temperatura a 4 °C. Em sequência, a placa foi lavada com 200 µL de BSA 1 % em PBS por poço, centrifugada (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C), o sobrenadante descartado e adicionado mix de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos para marcação de subpopulações celulares (20 µL/poço), conforme descrito anti-CD45 PercP (Biolegends #103131), anti-CD11b APC-Cy7 (BD Pharmingen #562127), anti-F4/80 FITC (Biolegends #123107), e anti-CX3CR1+ PECy7 (Biolegends #149015), foram usados para identificação dos macrófagos. Anti-CD90 PE (Biolegends #109006) e anti-FAP BV421 (eBioscience #BMS168) foram usados para fibroblastos sinoviais. Outro marcador utilizado foi: anti-RANKL PE (BD Pharmingen #560295). Todos os anticorpos usados foram adquiridos da BD Biosciences e preparados seguindo recomendações do fabricante. Adicionado mix, a placa foi incubada por 30 minutos ao abrigo da luz e temperatura a 4 °C, lavada com 200 µL de BSA 1 % em PBS por poço, centrifugada (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C), o sobrenadante foi descartado e as amostras fixadas por 30 min com 100 µL / poço de formaldeído 4 % em PBS 1X. Por fim, a placa foi novamente centrifugada (2000 rpm / 10 minutos / 4 °C), o sobrenadante descartado e foi adicionado 200 µL/poço de BSA 1 % em PBS para ressuspensão das células e, então, passagem dessas amostras para tubos de fundo redondo específicos para citômetro. A leitura foi realizada em um citômetro de fluxo (FACScanto II, BD Biosciences, USA) no dia seguinte à marcação e os dados adquiridos foram avaliados no programa FlowJo v10.7.1 (Tree Star Company).

4.9 Quantificação da expressão de mRNA por qRT-PCR

O RNA total foi extraído e isolado do tecido ao redor da articulação dos camundongos usando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies Corporation - Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza do RNA total foi determinada utilizando um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific-Waltham, MA, EUA). Para a transcrição reversa de 500 ng de RNA total isolado em cDNA, foi utilizada uma mistura contendo a transcriptase de reserva, SuperScript III, um inibidor de ribonuclease recombinante (RNase Out; Invitrogen Life Technologies Corporation) e ditioneitol (DTT; 1 mM). A etapa de transcrição reversa foi realizada em duplicata e a concentração total de cDNA foi semelhante em todas as amostras. Para qPCR quantitativo em tempo real, o reagente Power SYBR Master Mix

(Invitrogen Life Technologies Corporation) e os primers pares (Integrated DNA Technologies - Coralville, IA, EUA) mais cDNA foram colocados em uma placa de 96 poços, em duplicata, em um volume total de reação de 10 µL, utilizando o sistema StepOne™ (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA) em reação programada: aquecimento inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 60 s e 48 °C por 1 minuto. Os dados foram analisados utilizando o software StepOne™ System e processados pelo método $2^{-\Delta CT}$. Este método utiliza diretamente as informações de CT (ciclo limite) geradas por um sistema qPCR para calcular a expressão relativa de genes nas amostras alvo e de referência, usando um gene de referência para normalizar o RT-qPCR. As sequências de pares de primers utilizadas foram:

- Gene MMP3 (metaloproteinase de matriz 3):

Forward Primer: CACTCACAGACCTGACTCGGTT

Reverse Primer: AAGCAGGATCACAGTTGGCTGG

- Gene IL-10 (interleucina 10):

Forward Primer: TCTGGCTCTGCTACTGGTCT

Reverse Primer: CTCCAGGCTCCCTCTGTTG

As sequências do iniciador e da sonda foram verificadas com o software BLAST™. O 18s foi utilizado como gene de controle de referência e os resultados foram expressos como "Aumento de dobra" em comparação com os grupos de controle negativo injetados com solução salina.

4.10 Análise estatística:

Os resultados serão apresentados como a média \pm EPM. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste não paramétrico ou a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY) seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls ou ANOVA TWO-WAY seguido de comparações múltiplas de Tukey. Os níveis de significância serão estabelecidos em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 A ausência de AnxA1 ou de seu receptor mantem a maior resposta nociceptiva articular após injeção de colagenase

Inicialmente foi avaliada a cinética da resposta nociceptiva articular em animais em animais deficientes para anexina A1 e para o seu receptor FPR2. As medidas foram realizadas antes da indução do modelo e semanalmente após a injeção intra-articular de colagenase (contada a partir da primeira injeção de colagenase) até a 6ª semana (42 dias) (Figura 6A). Nossos resultados mostraram que a injeção de colagenase reduziu o limiar de retirada da pata (associado com maior resposta nociceptiva) em todos os grupos após 7 dias da injeção de colagenase (Figura 6B e D). Como característica deste modelo de OA, a resposta nociceptiva nos animais WT reduzem ao longo das semanas subsequentes (142). Os animais *AnxA1^{-/-}* reduziram o limiar de retirada de pata de maneira similar aos animais WT após 7 dias da injeção de colagenase até o dia 28 em relação aos valores antes da indução do modelo. Porém, nos dias 35 e 42 dias após a injeção de colagenase, os animais *AnxA1^{-/-}* mantiveram a resposta nociceptiva maior (Figura 6B). Por outro lado, os animais *FPR2/3^{-/-}* apresentaram maior resposta nociceptiva em relação aos animais WT 7 dias após a injeção de colagenase. Os valores permaneceram semelhantes nos dias 14 e 21. Porém, os animais *FPR2^{-/-}* mantiveram maior resposta nociceptiva nos dias 28 a 42 em relação aos animais selvagens (Figura 6D). Além disso, a área sob a curva avaliada ao longo de toda a cinética evidencia uma maior resposta nociceptiva nos animais *AnxA1^{-/-}* e *FPR2/3^{-/-}* em relação aos seus respectivos controles WT (Figura 6 C e E).

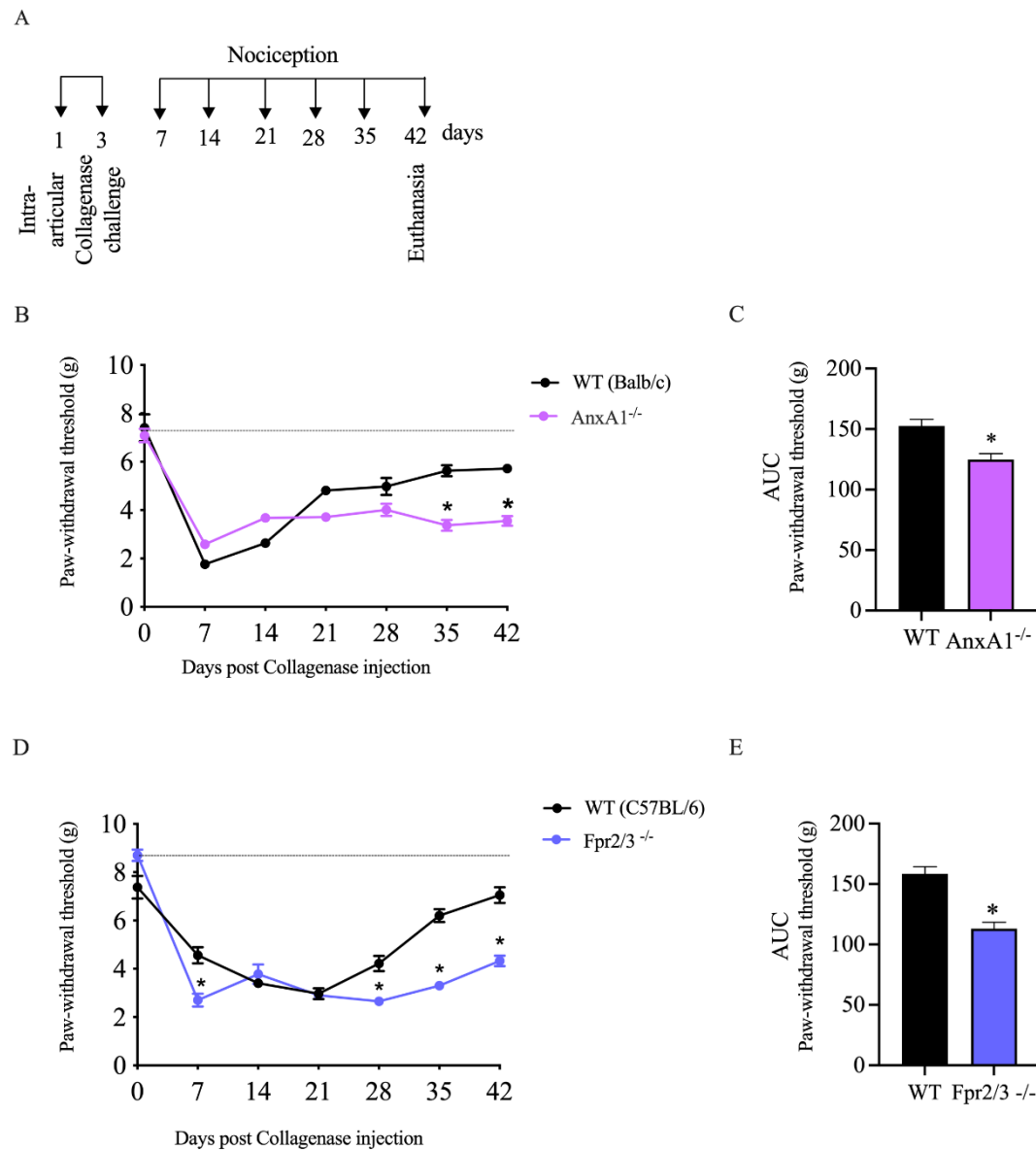
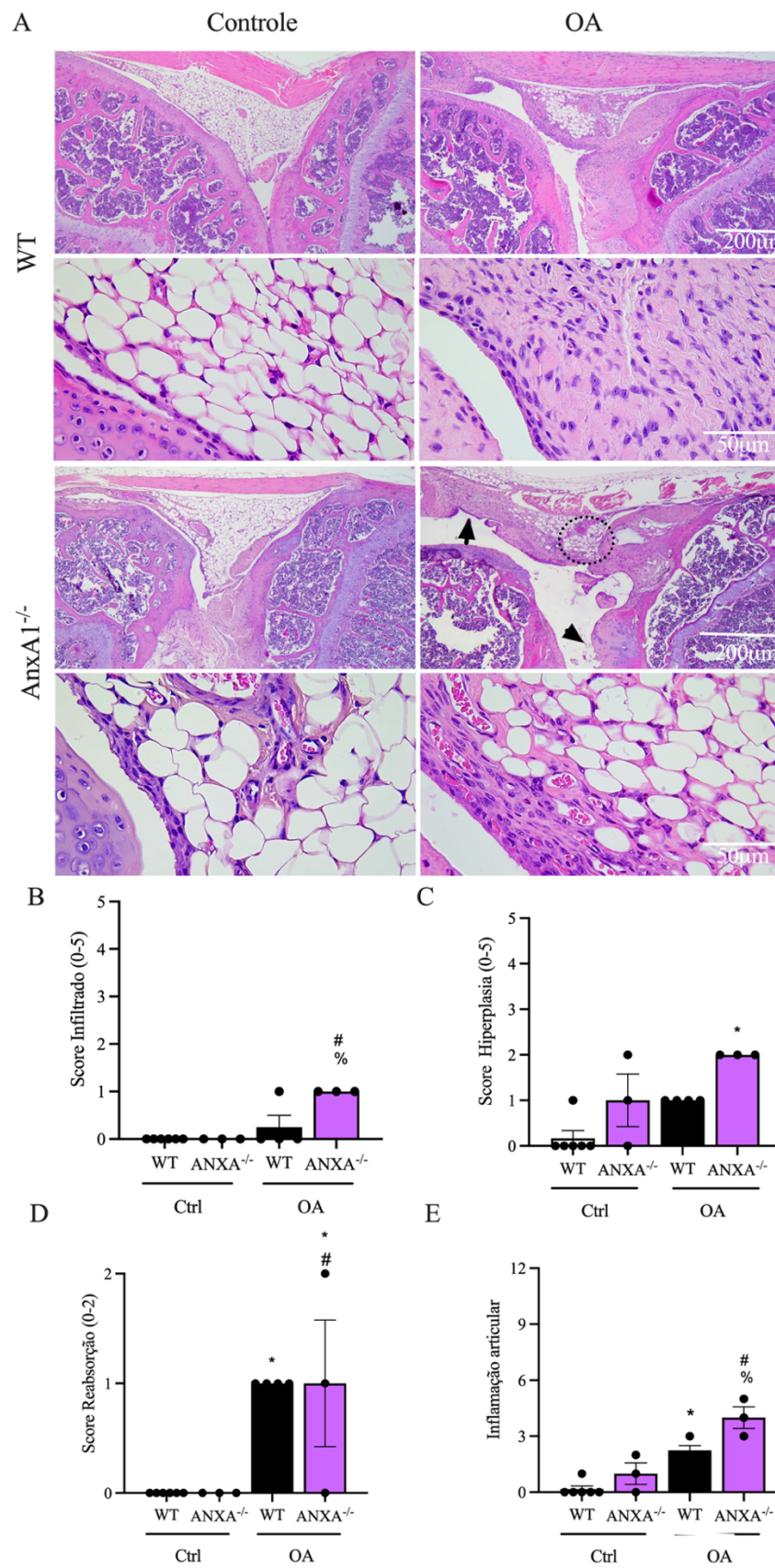


FIGURA 6. Animais deficientes para AnxaA1 e FPR2/3 apresentam aumento e persistência da nocicepção mecânica após injeção de colagenase. (A) Camundongos selvagens (WT) e deficientes para Anexina A1 (AnxA1^{-/-}) ou FPR2/3 (FPR2/3^{-/-}) foram desafiados com injeção intra-articular de colagenase VII nos dias 1 e 3 e a medida de nocicepção mecânica avaliada semanalmente até o dia 42. (B-C) Comparação da resposta nociceptiva entre animais selvagens (Balb/c) e AnxA1^{-/-} (D-E). Comparação da resposta nociceptiva entre animais selvagens (C57Bl/6) e FPR2^{-/-}. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. * representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais WT desafiados com colagenase e animais deficientes de anexina ou de seu receptor (AnxA1^{-/-} e FPR2/3^{-/-}), conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way seguido pelo pós teste Tukey.

A partir deste momento consideramos analisar as articulações tibiofemorais de animais selvagens e deficientes para AnxA1 no 42º dia de indução para análise histológica. Conseqüentemente, todos os animais selvagens utilizados nos próximos experimentos serão Balb/c e serão identificados apenas como WT. De acordo com a Figura 7, a indução de OA por collagenase VII induziu edema e infiltrado celular na articulação de ambos os grupos. Porém, estes parâmetros inflamatórios foram menores nos animais WT no 42º dia, mas mantendo importantes sinais de inflamação, como hiperproliferação da membrana sinovial (Figura 7A e B). Em relação aos animais deficientes de AnxA1, pode ser observado uma intensa perda da arquitetura tecidual e um importante infiltrado após o desafio com collagenase. Diferentemente dos animais selvagens, em animais deficientes de AnxA1 não foi observada uma melhora dos sinais inflamatórios no decorrer dos dias, sendo este fator perceptível com a presença de edema após 42 dias de indução.



Legenda na página 45.

FIGURA 7: Camundongos deficientes de Anexina A1 apresentam maior inflamação articular após indução de osteoartrite. Camundongos selvagens (WT – Balb/c) e deficientes para Anexina A1 ($AnxA1^{-/-}$) foram desafiados com injeção intra-articular de colagenase VII nos dias 1 e 3 e a análise histopatológica avaliada nos dias 7, 21 e 42. (A) Coloração de hematoxilina e eosina (H&E) de animais selvagens (Balb/c) e (B) $AnxA1^{-/-}$. B) Escore inflamatório. Todos os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (n = 5). Análise estatística: (*) Comparado ao Ctrl WT (#) Comparado ao Ctrl $AnxA1^{-/-}$, (%0) Comparado ao WT OA. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey).

Como a destruição da cartilagem é a principal característica histológica da OA, a gravidade dos danos da cartilagem foi avaliada usando a coloração de Safranina-O fast green no modelo de OA induzido por Colagenase. A gravidade da OA foi pontuada usando o sistema de pontuação de OARSI (Figura 8A,B). Foi possível observar a presença de fissuras e perda do proteoglicano na superfície. Portanto, quanto ao dano articular, áreas de perda óssea e de cartilagem foram observadas em ambos os grupos (Figura 8A). Após 42 dias, é possível observar alterações na superfície cartilaginosa sugerindo processo de degeneração articular com presença de fissuras. Em conjunto, um escore moderado total foi observado em ambos os grupos desafiados. Ainda, os animais deficientes de $AnxA1$ apresentaram maior dano quando comparado aos animais selvagens.

5.2 O aumento da expressão de AnxA1 no tecido sinovial é transiente após a injeção de collagenase

Após a indução da OA experimental em animais selvagens, o tecido articular foi removido para avaliar a expressão de AnxA1. Como observado na Figura 9, houve um aumento dos níveis de AnxA1 intacta, nos dias 7 e 21, com o retorno aos níveis basais no dia 42. Esse aumento nas fases inicial e intermediária da cinética de OA podem estar associados com a presença de infiltrado celular observado na Figura 7, pois os leucócitos são importantes células produtoras de AnxA1. Esta diminuição da expressão de AnxA1 está associada a um elevado escore inflamatório e maior dano na superfície articular.

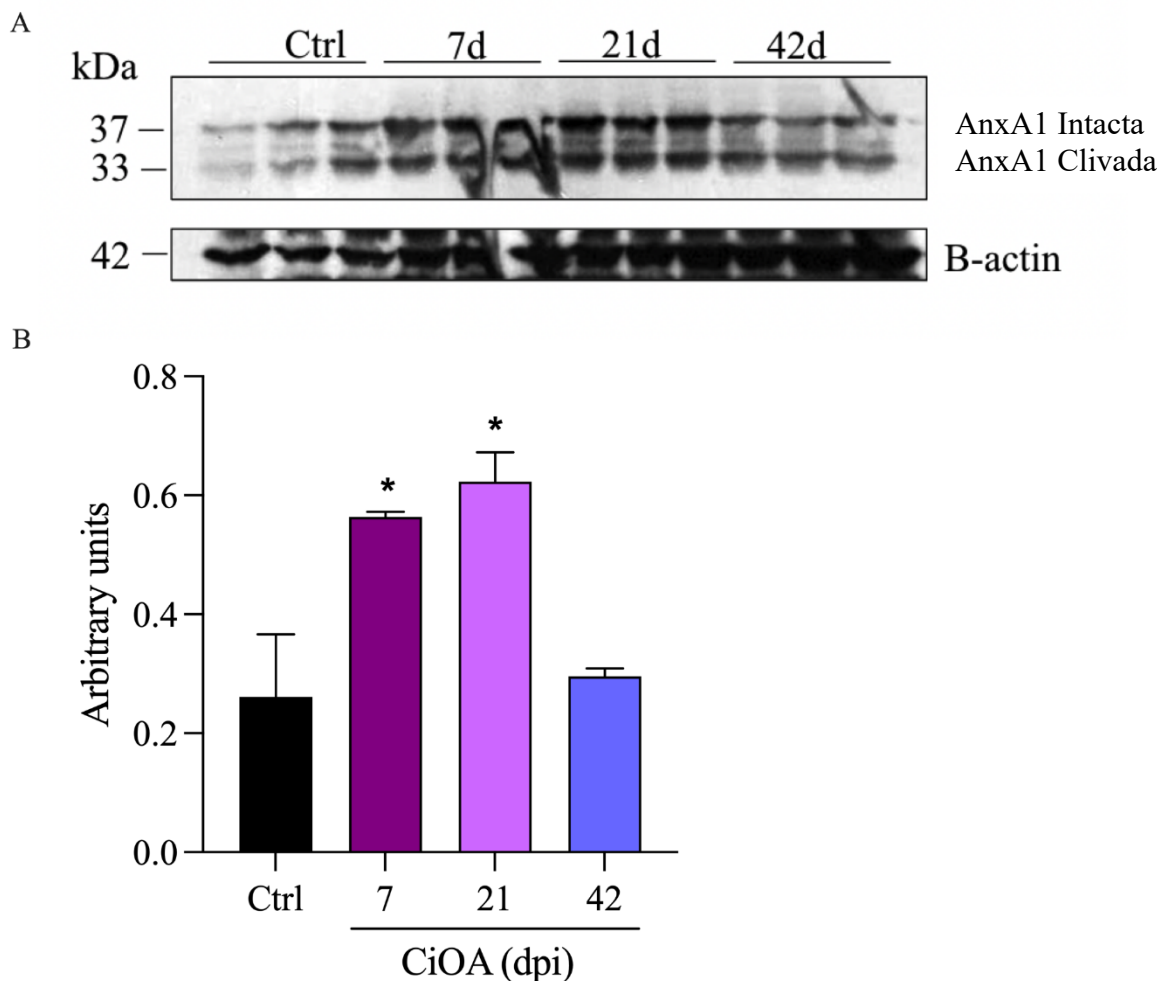


FIGURA 9: Expressão de AnxA1 no tecido articular no modelo de osteoartrite induzida por collagenase. Camundongos selvagens (Balb/c) foram desafiados com injeção intra-articular de collagenase VII nos dias 1 e 3 e o tecido peri-sinovial foi coletado nos dias 7, 21 e 42 para avaliação da expressão de AnxA1 por Western blot,

com análise de densitometria quando normalizado pela expressão de β -actina. (*) para $p < 0,05$ quando comparado a média do grupo controle. N=5. ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey.

5.3. O tratamento com o peptídeo mimético de AnxA1, Ac2-26, melhora a nocicepção e o dano articular na osteoartrite experimental

De acordo com os resultados anteriores, a ausência de AnxA1 resulta em uma piora de parâmetros comuns observados na OA experimental, como nocicepção mecânica e inflamação articular. Assim, o próximo passo foi avaliar se animais tratados com o peptídeo Ac2-26, derivado na porção N-terminal da AnxA1 e que mantém as ações anti-inflamatórias e pró-resolutivas da proteína intacta, poderia reverter ou reduzir os parâmetros até aqui analisados. Para isso, animais selvagens (Balb/c) foram desafiados com colagenase VII e receberam o tratamento com Ac2-26 intra-articular em diferentes momentos após a indução da OA (Figura 10A). De acordo com Figura 10B, uma semana após o início de cada tempo de tratamento, pode ser observada uma redução da resposta nociceptiva quando comparado com o grupo OA não tratado. Para uma melhor visualização desta resposta e também para ter uma análise continuada da resposta nociceptiva, foi calculada a área sob a curva do limiar de retirada de pata, baseando-se nas medidas de nocicepção avaliadas 7 dias após o início de cada tratamento e semanalmente até o último ponto analisado (42º dia). Conforme observado nas Figuras 10C-E, tanto o tratamento mais inicial quanto o mais tardio foram eficazes em reduzir a resposta nociceptiva em relação aos grupos não tratados nos respectivos tempos de análises.

Este resultado também se repetiu com os animais tratados a partir do 21º dia após indução por colagenase. Demonstrando que independente do tratamento iniciar em fase aguda ou crônica da doença, há melhora do perfil nociceptivo dos animais. (Figura 10E)

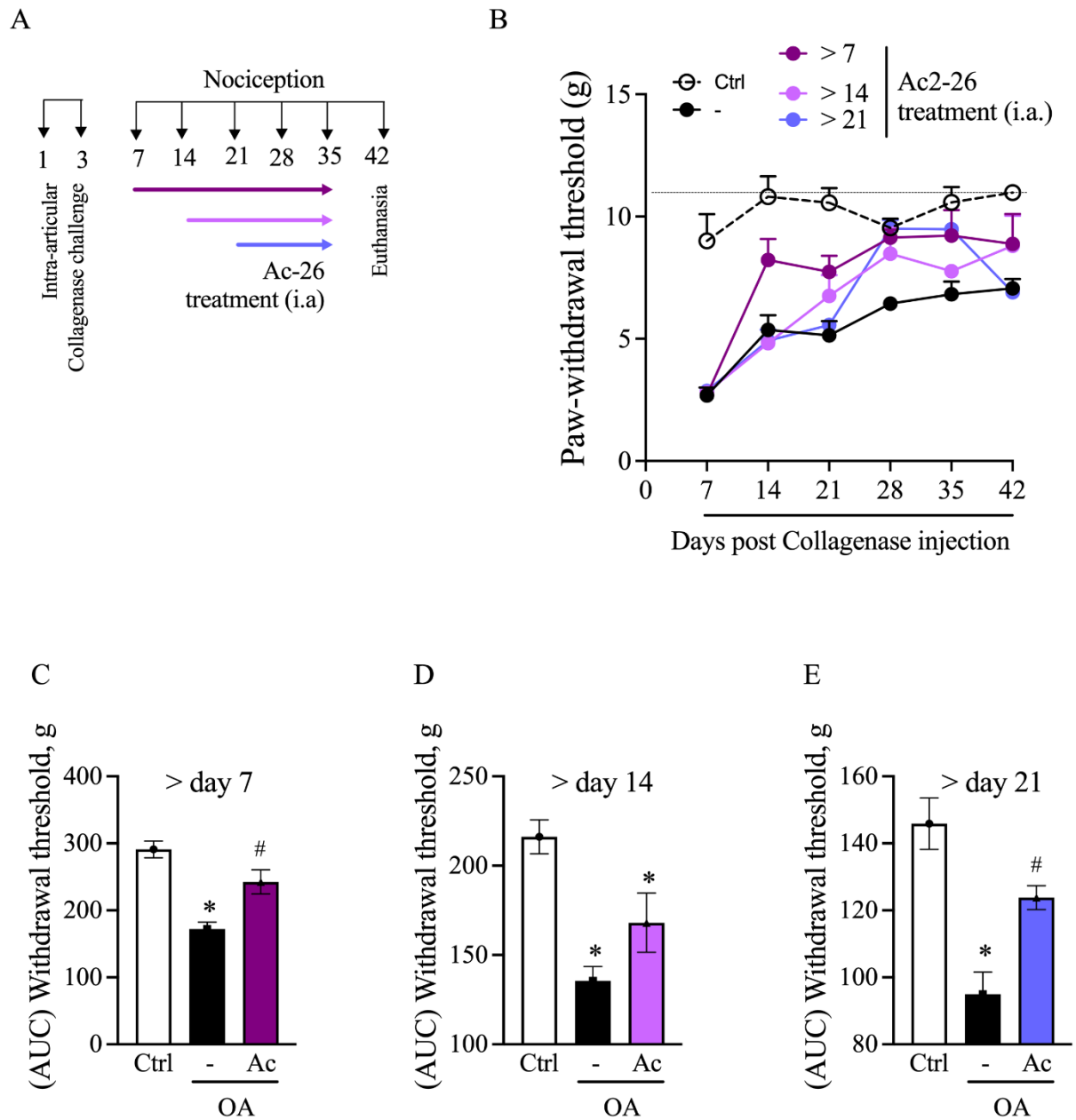


FIGURA 10: O tratamento com peptídeo mimético de AnxA1, Ac2-26, reduz a nocicepção mecânica induzida por collagenase. Camundongos selvagens (Balb/c) foram desafiados com injeção intra-articular de collagenase VII nos dias 1 e 3. (A) Grupos de animais receberam o tratamento com Ac2-26 (10 uM/10 µl/cavidade articular, 1x/semana) a partir do dia 7, 14 ou 21 após a 1ª injeção de collagenase. O último dia de tratamento foi no 35º dia, sendo a última medida de nocicepção no 42º dia. (B) Cinética do limiar de retirada de pata dos animais. (C-E) Área sob a curva do limiar de retirada de pata após o início de cada tratamento. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. * representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais controle, enquanto # representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais desafiados e tratados, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way (B) ou one-way (C-E) seguido pelo pós teste Tukey.

Ao final da última medida de nocicepção, os animais foram eutanasiados e as articulações removidas para análises histopatológicas. Primeiramente, foi avaliado o escore inflamatório através da coloração por HE. Como pode ser observado na Figura 11, a injeção de colagenase causou um aumento em todos os parâmetros inflamatórios infiltrado celular, hiperplasia, reabsorção além do escore total. Porém, o tratamento com Ac2-26 não reduziu nenhum desses parâmetros (Figura 11).

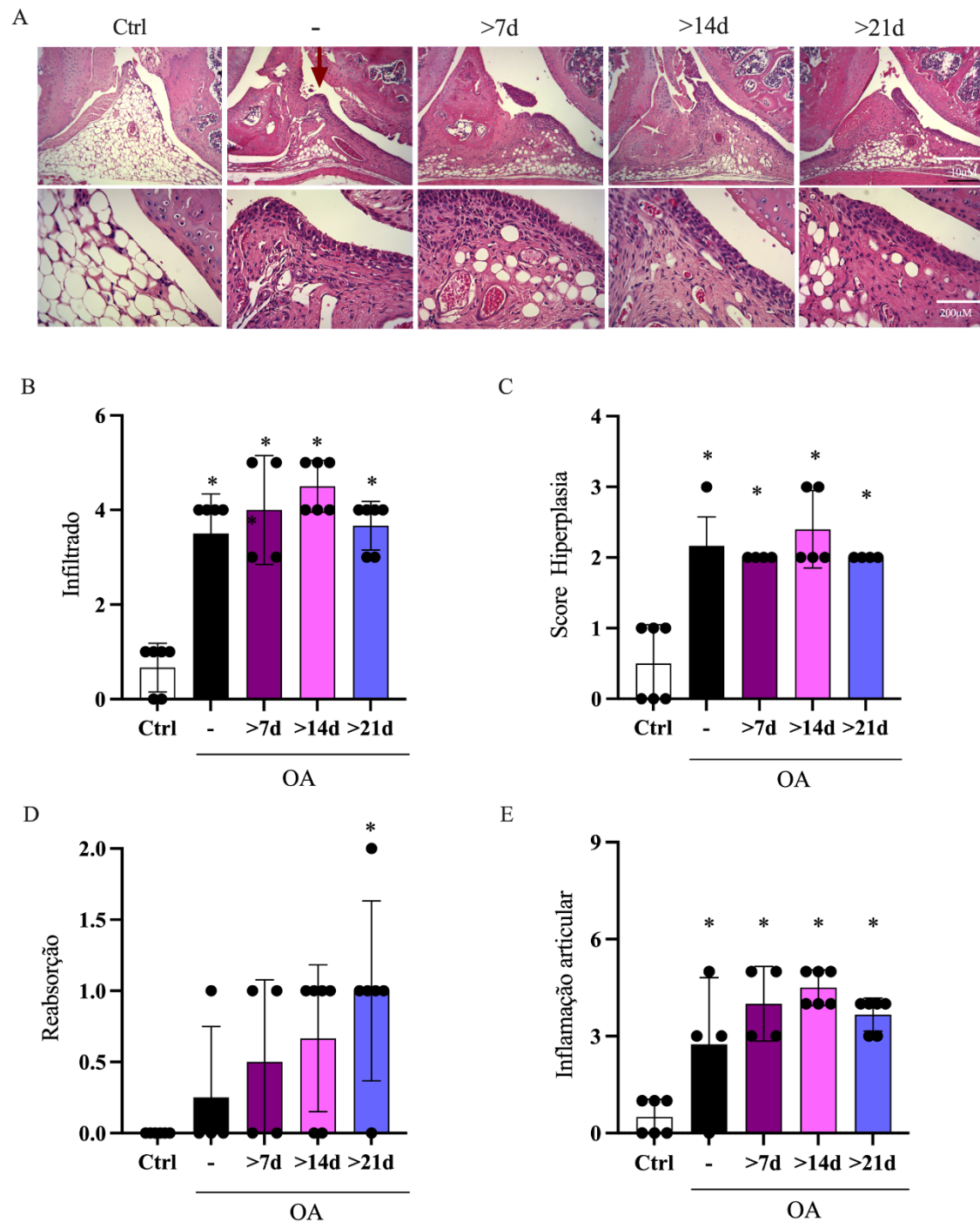


Figura 11: O tratamento com peptídeo mimético de AnxA1, não reduz marcadores de inflamação na osteoartrite experimental. Camundongos selvagens (Balb/c) foram desafiados com injeção intra-articular de collagenase VII nos dias 1 e 3. Grupos de animais receberam o tratamento com Ac2-26 (10 µM em 10 µl/cavidade articular, 1x/semana) a partir do dia 7º, 14º ou 21º após a 1ª injeção de collagenase. O último dia de tratamento foi no 35º dia, com a eutanásia e coleta da articulação no

42º dia. (A) Imagens representativas da coloração de H&E para os escores inflamatório. (B) Escore histopatológico inflamatório total. (C) Score de hiperplasia celular (D) Score de infiltrado. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. * representa $p < 0,05$ em relação aos animais controle (injeção de salina), conforme avaliado pelo teste estatístico One-way ANOVA seguido pelo pós teste Tukey.

Para realizar uma análise com foco nas alterações ósseas e cartilagueas, foi utilizada a coloração por Safranina-O *Fast green* e aplicação do escore OARSI. Após 42 dias da indução de OA por colagenase, as análises histológicas do grupo sem tratamento mostraram sinais graves de característicos da OA, como perda extensa de proteoglicano, fibrilação grave e erosão da cartilagem no osso subcondral em toda a parte da cartilagem articular. Em contrapartida, os grupos tratados com Ac2-26 apresentaram um menor escore OARSI independente da estratégia terapêutica utilizada quando comparado com o grupo OA não tratado (Figura 12A,B).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) desempenham um papel crucial na manipulação da cartilagem, especialmente na OA (42). A MMP3, também conhecida como estromelina-1, é uma das principais enzimas envolvidas na manipulação da matriz extracelular, impactando diretamente componentes como colágeno e proteoglicanos. Esse processo acelerado de manipulação influencia o comprometimento da integridade articular e pode afetar indiretamente o osso subcondral, contribuindo para a progressão da doença (143). Diante disso, foi avaliada a expressão da MMP3 em modelos experimentais de OA, comparando animais tratados e não tratados com o peptídeo Ac2-26. O resultado mostra os grupos tratados com Ac2-26 tiveram expressão de MMP3 em relação ao grupo OA não tratado, independente do momento em que o tratamento foi iniciado (Figura 12C), indicando um importante efeito do Ac2-26 mitigar a destruição tecidual e a progressão da OA

Com base nos resultados apresentados até aqui, pode-se sugerir duas possibilidades sobre o efeito terapêutico do Ac2-26 no modelo de OA induzido por colagenase: prevenção dos danos causados pela injeção de colagenase VII ou reparação desses danos, principalmente quando o tratamento se iniciou em tempos mais tardios, como no 21º dia.

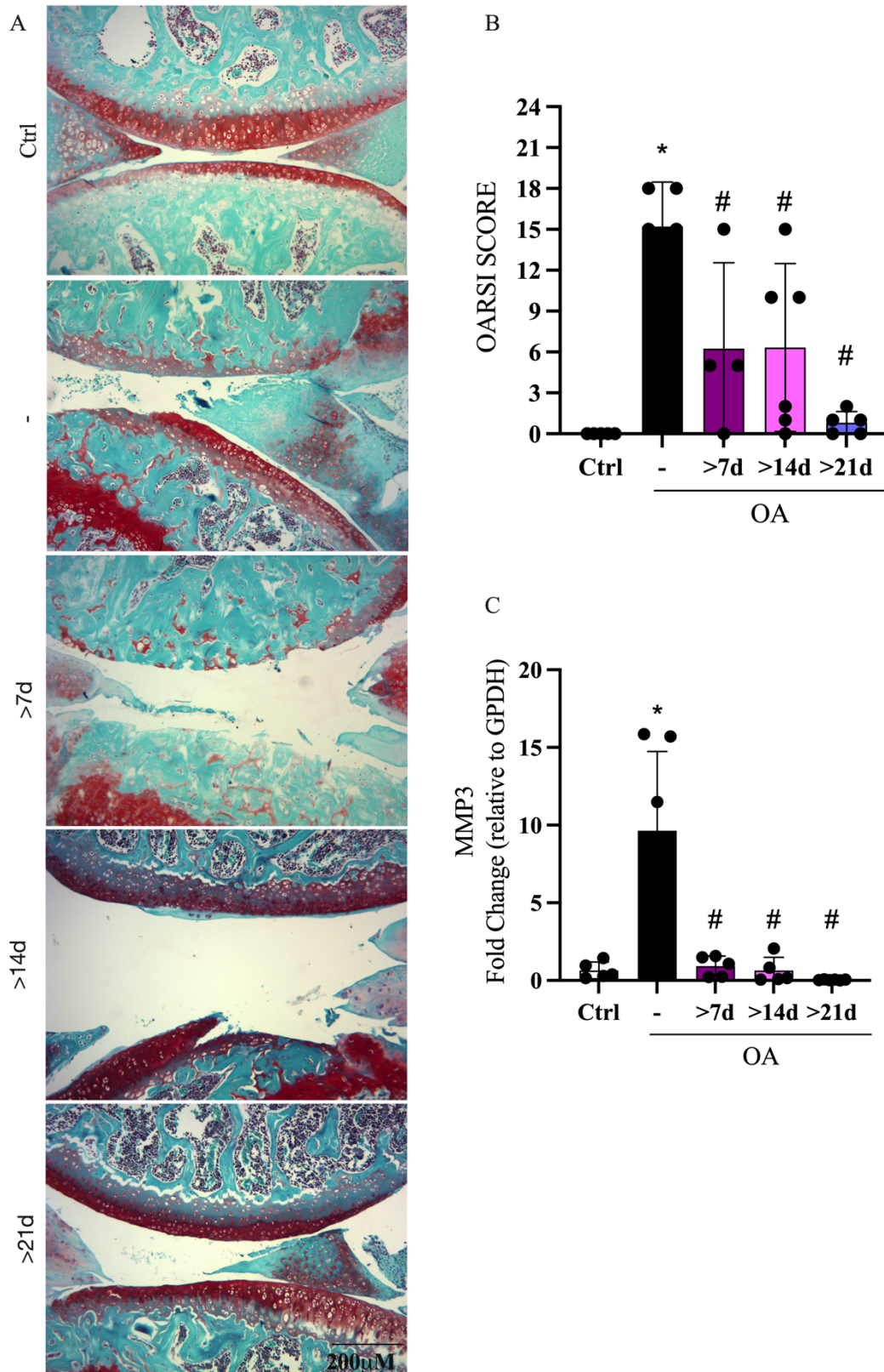


Figura 12: O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz o escore histopatológico OARSI na osteoartrite experimental. Camundongos selvagens (Balb/c) foram desafiados com injeção intra-articular de collagenase VII nos dias 1 e 3. Grupos de animais receberam o tratamento com Ac2-26 (10 μ M em 10

μ l/cavidade articular, 1x/semana) a partir do dia 7, 14 ou 21 após a 1ª injeção de colagenase. O último dia de tratamento foi no 35º dia, com a coleta da articulação no 42º dia. (A) Imagens representativas da coloração de Safranina-O-fast Green para os escores OARSI. (B) Escore histopatológico OARSI. (C) Expressão de MMP3 no tecido periarticular por qRT-PCR. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (sem OA); # $p < 0,05$ em comparação com o grupo OA sem tratamento, conforme avaliado pelo teste estatístico One-way ANOVA seguido pelo pós teste Tukey.

A inflamação da membrana sinovial (sinovite) está intimamente associada com a progressão da OA, com aumento da hiperplasia e atividade de seus constituintes, os sinoviócitos (144). Desta forma, foi analisado se o tratamento com Ac2-26 também interferiu na atividade de macrófagos e fibroblastos sinoviais presentes nesta região. Considerando que o tratamento com Ac2-26 iniciado após 21 dias da injeção de colagenase foi eficaz na redução dos principais parâmetros histopatológicos e da expressão de MMP3 no tecido sinovial, foi escolhido apenas este tempo de tratamento para a avaliação da atividade dos sinoviócitos. Como pode ser observado na Figura 13, houve um aumento do número de macrófagos totais ($CD45^+CD11b^+F4/80^+$) (Figura 13C) e sinoviais ($CD45^+CD11b^+F4/80^+CX3CR1^+$) (Figura 13D) após 42 dias da indução da injeção de colagenase em relação ao grupo controle. De maneira interessante, o grupo tratado com Ac2-26 apresentou menor número dessas células (Figura 13C, D). Além disso, a indução do modelo causou um aumento das células expressando RANKL, um importante regulador da osteoclastogênese (Figura 13E) (145,146). Novamente, o tratamento com Ac2-26 resultou em um menor número de macrófagos RANKL⁺ em relação ao grupo OA não tratado (Figura 13E).

De maneira similar, a indução da OA por colagenase causou um aumento do número de fibroblastos sinoviais em relação ao grupo controle bem como um maior número de células expressando RANKL (Figura 14). Novamente, o tratamento com Ac2-26 resultou em um menor número de fibroblastos sinoviais e expressão de RANKL quando comparado com o grupo OA não tratado.

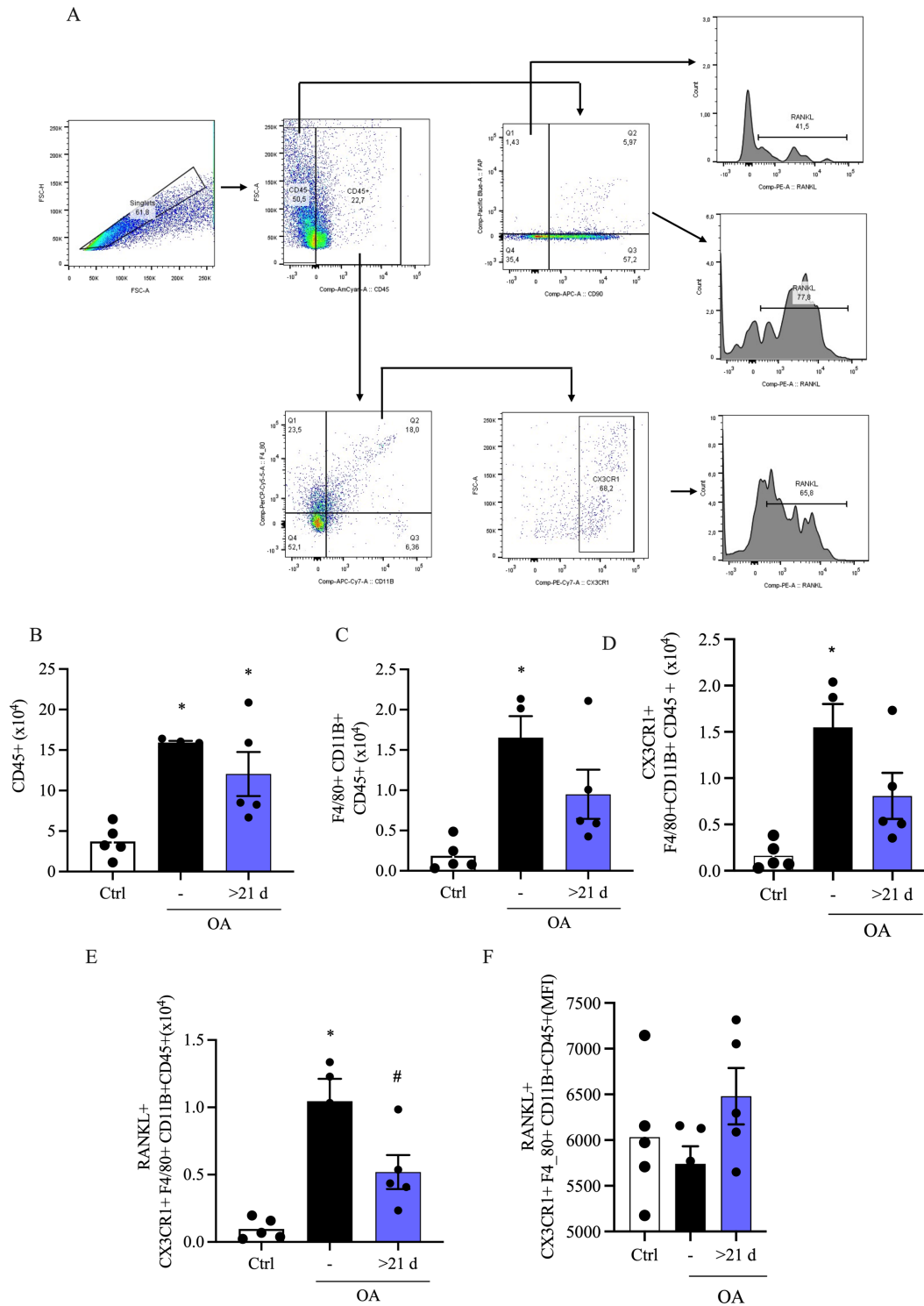


Figura 13: O tratamento com peptídeo mimético de Anx1, Ac2-26, reduz a quantidade e ativação de macrófagos sinoviais. Camundongos do tipo selvagem (Balb/c) foram desafiados com injeção intra-articular de colagenase VII nos dias 1 e 3. O grupo de animais tratado recebeu 10 μ M de Ac2-26 a 10 μ L/ cavidade articular, 1x/semana a partir do dia 21 após a 1^a injeção de colagenase, o grupo não tratado recebeu injeção com o diluente (salina). Os animais foram eutanasiados no 42^o dia para coleta de tecido sinovial para a marcação para citometria. (A) Análise de

citometria de fluxo (B) células CD45+ (C) células F4/80+ CD11b+ CD45+, (D) células CX3CR1+ F4/80+ CD11b+ CD45+, (E) células RankL+ CX3CR1+ F4/80+ CD11b+ CD45+ (F) MFI RankL+ CX3CR1+ F4/80+ CD11b+ CD45+. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 amostras por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (salina); # $p < 0,05$ em relação ao grupo OA sem tratamento conforme avaliado pelo teste estatístico One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de pós-teste Tukey.

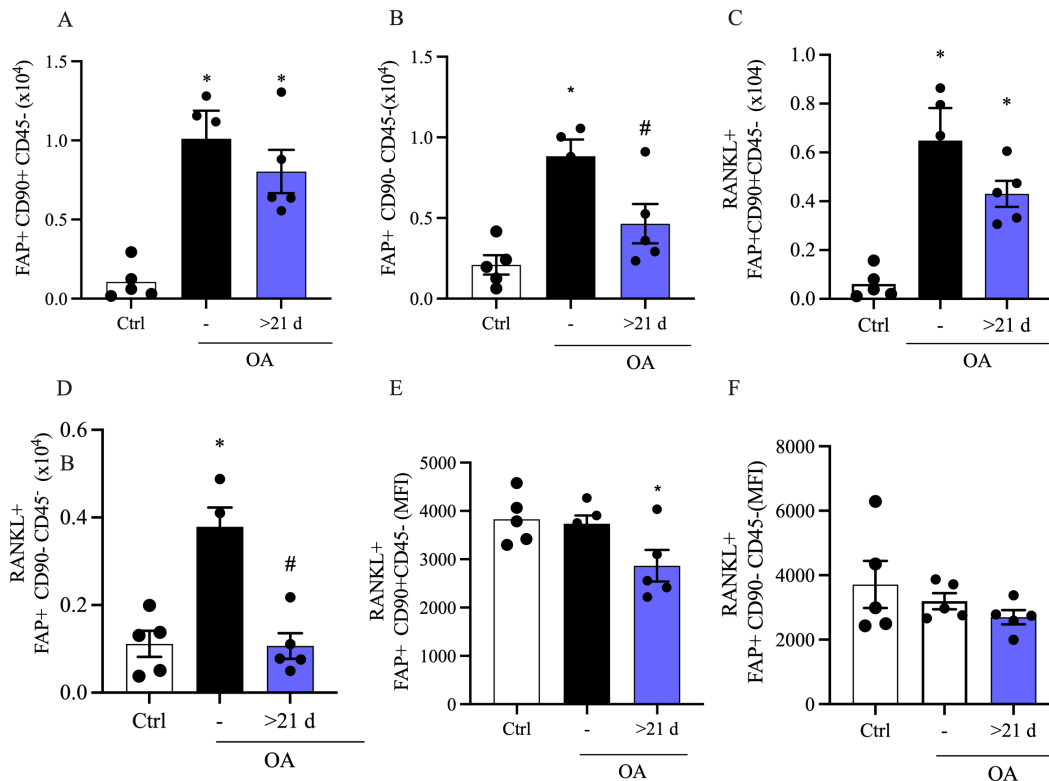


Figura 14: O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz a quantidade e ativação de fibroblastos sinoviais. Camundongos do tipo selvagem (Balb/c) foram desafiados com injeção intra-articular de colagenase VII nos dias 1 e 3. O grupo de animais tratado recebeu 10 μ M de Ac2-26 a 10 μ L/ cavidade articular, 1x/semana a partir do dia 21 após a 1ª injeção de colagenase, o grupo não tratado recebeu injeção com o diluente (salina). Os animais foram eutanasiados no 42º dia para coleta de tecido sinovial para a marcação para citometria. (A) células FAP+ e CD90+ C45- (B) células FAP+ CD90- CD45- (D) células RankL+ FAP+ e CD90+ CD45-. (E) RankL+ FAP+ e CD90- CD45, (F) MFI RankL+ FAP+ CD90+, (G) MFI RankL+ FAP+ CD90. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 amostras por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (salina); # $p < 0,05$ em relação ao grupo OA sem tratamento conforme avaliado pelo teste estatístico One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de pós-teste Tukey.

5.4 O tratamento Ac2-26, aumenta a expressão de IL-10 na osteoartrite experimental em períodos tardios.

Além de avaliar se o tratamento com Ac2-26 foi eficaz em reduzir fatores associados com o dano tecidual da OA (sinoviócitos, MMP3 e RANKL), também avaliamos se ele poderia aumentar a expressão de uma importante molécula que desempenha um papel central na regulação das respostas inflamatórias, a interleucina 10 (IL-10). No modelo utilizado, não houve uma diferença da expressão de IL-10 entre o grupo controle e OA não tratado. Por outro lado, o tratamento com Ac2-26 aumentou a expressão de IL-10 apenas no grupo onde o tratamento foi iniciado após 21 dias da indução da OA em relação ao grupo OA não tratado, não apresentando diferenças nos outros tempos de tratamento. (Figura 15).

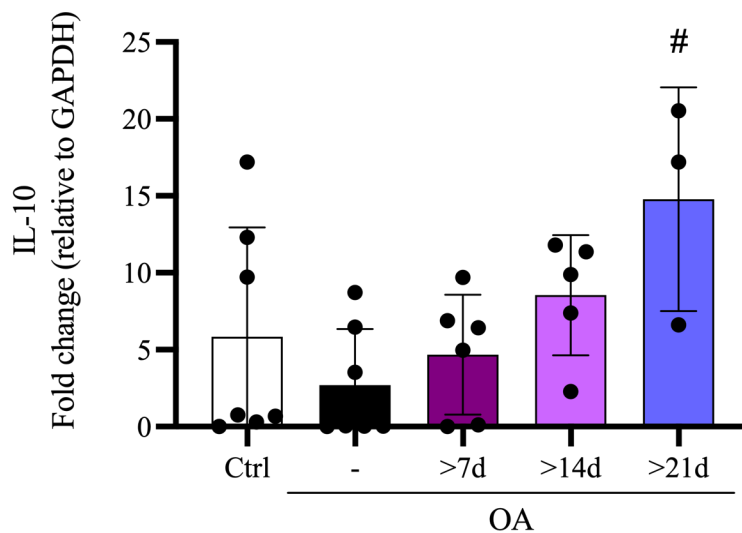


Figura 15 O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, aumenta a expressão de IL-10 na osteoartrite experimental. Os camundongos da linhagem Balb/c com 8 semanas de idade foram desafiados com injeção intra-articular de colagenase VII nos dias 1 e 3 (i.a). Grupos de animais receberam o tratamento com Ac2-26 (10 μ M em 10 μ L/cavidade articular, 1x/semana) a partir do dia 7, 14 ou 21 após a e os níveis de IL-10, no tecido periarticular foram analisados por qRT-PCR durante a cinética do tratamento. Os resultados foram expressos como fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os resultados foram expressos como média \pm SEM. * $p < 0,05$ quando comparado com camundongos controle, enquanto # representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais desafiados conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA one-way seguido pelo pós teste Tukey.

5.5 Tratamento oral com Ac2-26 reduziu parcialmente a nocicepção em OA experimental.

Considerando que o tratamento intra-articular com Ac2-26 apresentou uma importante redução dos parâmetros inflamatórios, nocicepção e dano articulares, foi utilizada uma estratégia de tratamento oral com o Ac2-26. Optamos pela estratégia de iniciar o tratamento após 21 dias da indução da OA, levando em consideração os resultados obtidos neste mesmo tempo de tratamento pela via intra-articular. A nocicepção mecânica foi avaliada de duas formas diferentes: após 1 hora (Figura 16A) e após 1 semana após o tratamento oral (Figura 17A).

Considerando a análise da resposta nociceptiva 1 h após o tratamento oral com Ac2-26, houve uma redução da nocicepção quando o tratamento foi realizado no dia 21 após o desafio com colagenase (Figura 16B). Porém, esta redução da nocicepção em relação ao grupo não tratado não foi diferente quando o tratamento ocorreu nos dias 28 (Figura 16C) ou 35 (Figura 16D)..

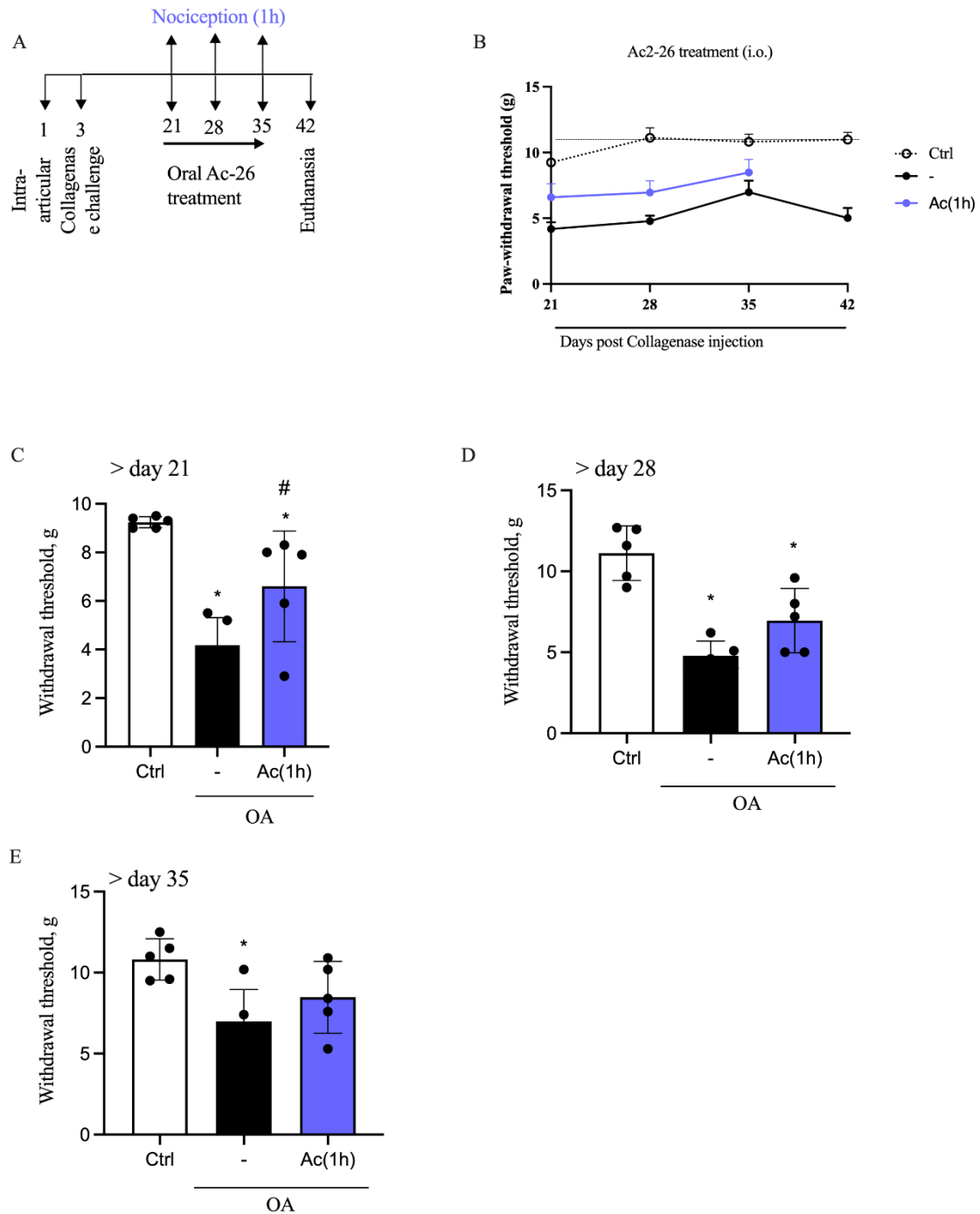


Figura 17 O tratamento oral com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduziu parcialmente a nocicepção mecânica induzida por collagenase após uma hora de tratamento. Camundongos selvagens (Balb/c) foram desafiados com injeção intra-articular de collagenase VII nos dias 1 e 3. (A) Grupos de animais receberam o tratamento i.o por gavagem com Ac2-26 150 µg/animal, 1x/semana) a partir do dia 21 após a 1ª injeção de collagenase. O último dia de tratamento foi no 35º dia, sendo a primeira medida de nocicepção no dia 21 e última medida no 35º dia. (B) Cinética do limiar de retirada de pata dos animais. (C) Análise do limiar de retirada de pata no 21º dia. (D) Análise do limiar de retirada de pata no 28º dia. (E) Análise do limiar de retirada

de pata no 35º dia. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. * representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais desafiados e controle, enquanto # representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais desafiados e tratados, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way (B) ou one-way (C-E) seguido pelo pós teste Tukey

Em relação à medida de nociceção realizada 1 semana após cada tratamento, mas antes dos animais serem tratados novamente, não houve diferença entre o grupo tratado em relação ao grupo OA não tratado (Figura 17).

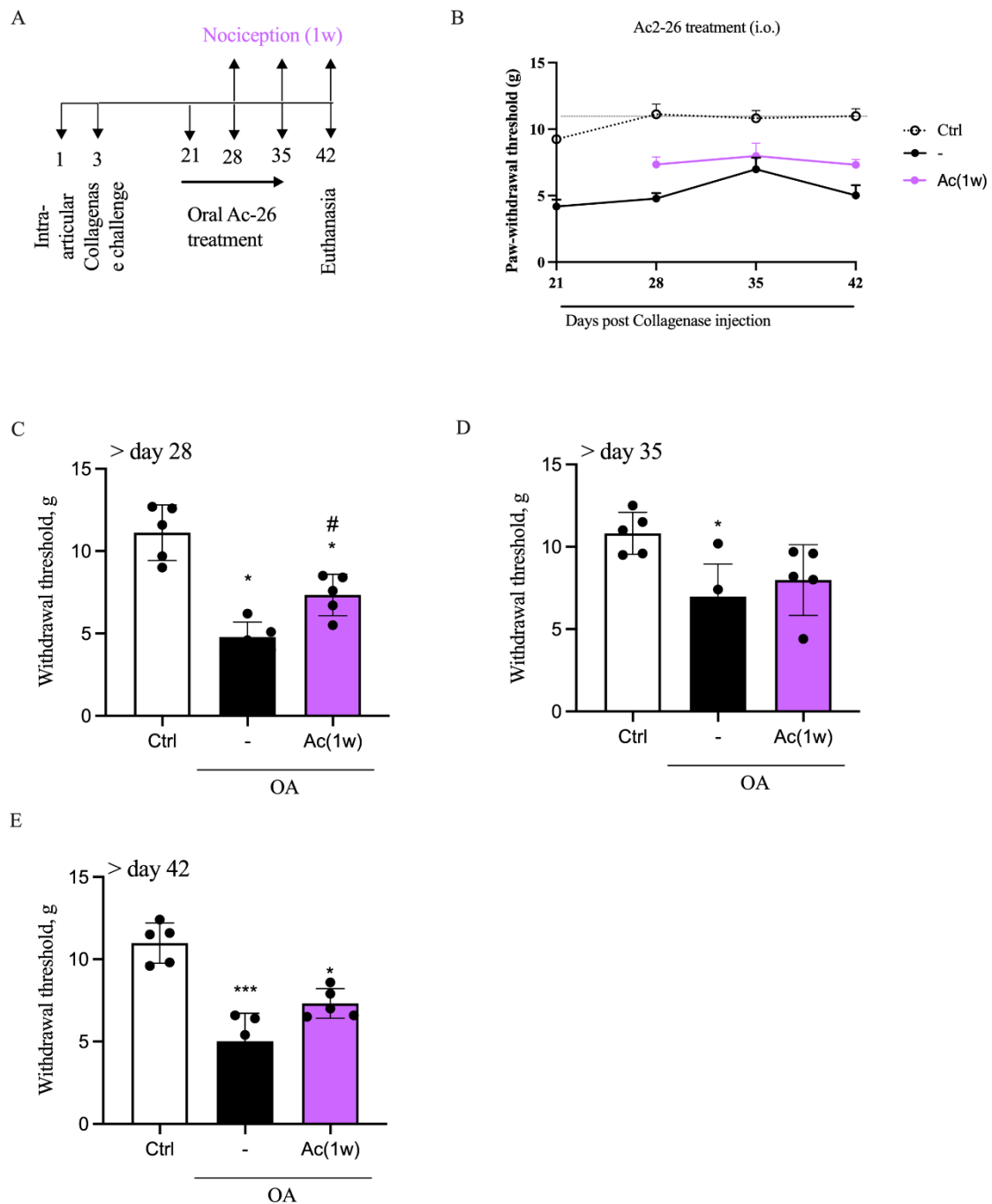


Figura 17: O tratamento oral com peptídeo derivado de ANXA1, Ac2-26, reduziu parcialmente a nocicepção mecânica induzida por colagenase após uma semana de tratamento. Camundongos selvagens (Balb/c) foram desafiados com injeção intra-articular de colagenase VII nos dias 1 e 3. (A) Grupos de animais receberam o tratamento i.o por gavagem com Ac2-26 150 uM, 1x/semana) a partir do dia 21, após a 1ª injeção de colagenase. O último dia de tratamento foi no 35º dia, sendo a primeira medida de nocicepção no dia 28 e última medida no 42º dia. (B) Cinética do limiar de retirada de pata dos animais. (C) Análise do limiar de retirada de pata no 28º dia. (D) Análise do limiar de retirada de pata no 35º dia. (E) Análise do limiar de retirada de pata no 42º dia. As barras representam a média \pm desvio padrão de 5 camundongos por grupo. * representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais desafiados e controle, enquanto # representa $p < 0,05$ para a comparação entre animais desafiados e tratados, conforme avaliado pelo teste estatístico ANOVA two-way (B) ou one-way (C-E) seguido pelo pós teste Tukey.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho explorou o papel da AnxA1 no tratamento da OA, destacando seu potencial para reduzir a inflamação e promover o reparo da cartilagem. A resolução da inflamação é um processo ativo que restaura a homeostase tecidual, mediado por moléculas como AnxA1, Lipoxina A4 e Resolvinas (147). A utilização de pró-resolutivos, no tratamento da OA oferece uma abordagem inovadora que se estende além das limitações das terapias tradicionais. Embora os tratamentos convencionais, como AINEs e corticosteroides, se concentrem em fornecer alívio sintomático, eles não conseguem abordar as causas subjacentes da OA ou promover o reparo da cartilagem (148). Além disso, estes medicamentos estão associados a vários efeitos adversos (125,149). Em muitos casos, principalmente para o tratamento de doenças crônicas, é necessário o uso prolongado deles e com dosagens altas o que pode resultar em intolerância, e, muitas vezes, é necessário o ajuste de doses (150).

Diferentes trabalhos mostram que terapias baseadas no peptídeo mimético da AnxA1, o Ac2-26, têm potencial regenerativo, pois são capazes de reduzir a inflamação e estimular a regeneração do tecido (131,133,151,152). Nossos principais achados foram: 1) Animais deficientes para AnxA1 ou FPR2/3 apresentaram aumento e persistência da nocicepção mecânica após injeção de colagenase; 2) Camundongos deficientes de AnxA1 apresentam maior inflamação articular após indução de osteoartrite; 3) Camundongos deficientes de AnxA1 tem piora progressiva do dano articular após indução de osteoartrite; 4) O tratamento com peptídeo derivado de AnxA1, Ac2-26, reduz a nocicepção mecânica induzida por colagenase; 5) O tratamento com o Ac2-26 reduziu o escore histopatológico OARSI na osteoartrite experimental; 6) O tratamento com o Ac2-26 reduziu a expressão de ativadores da reabsorção cartilágnea e óssea, como MMP-3 e RANKL e aumentou a citocina IL-10 no tecido articular. Esses resultados apontam um potencial efeito benéfico da AnxA1 para o controle da inflamação, lesão e nocicepção articulares característicos da OA.

Um esforço significativo tem sido feito no sentido de caracterizar modelos animais que mimetizem a doença humana. Partindo do conceito que o desenvolvimento da OA em humanos é lento, os outros modelos descritos na literatura têm a progressão da doença de forma rápida. No modelo OA induzida por colagenase (CiOA), o dano articular se desenvolve devido à desestabilização da articulação do joelho, com isso, este método induz alterações progressivas osteoartriticas desencadeadas pela luxação patelar, incluindo formação de osteófitos,

alterações estruturais trabeculares ósseas subcondrais e perda de cartilagem (142,153). Para isso utilizamos injeções intra-articulares com colagenase da *bactéria Clostridium histolyticum* (tipo I, II e VII) visando tecidos contendo colágeno tipo I, como tendões e ligamento. Embora um modelo que permita um rápido desenvolvimento de uma doença seja favorável para estudos experimentais, um equilíbrio entre um tempo experimental adequado e uma taxa de progressão da doença que permita uma reprodução mais próxima da progressão clínica da OA é desejável. Alterações significativas correspondentes à descrição da OA humana foram observadas após seis semanas (154).

Uma das características mais marcantes nos pacientes com OA é a presença de dor em todos os estágios da doença, o que acarreta diminuição da capacidade funcional e piora da qualidade de vida (155). A resposta nociceptiva também é comum em todos os modelos experimentais de OA, como detectada pela redução do limiar de retirada de pata após a estimulação da movimentação da articulação acometida através do uso do von Frey eletrônico (156). Embora a inflamação esteja fortemente associada à dor na OA, os mecanismos exatos ainda não são totalmente compreendidos. Alguns trabalhos já demonstraram efeitos antinociceptivos da AnxA1 ou do Ac2-26. Por exemplo, animais deficientes para AnxA1 apresentaram nocicepção exacerbada em um modelo murino de contorções abdominais induzidas por ácido acético em relação aos animais selvagens, com aumento da expressão de COX2 na medula espinal. Ainda neste trabalho, o tratamento intraperitoneal com Ac2-26 reduziu a nocicepção, associado com a redução de COX2 na medula espinal (157). Em outro trabalho, no qual foi utilizado um modelo de inflamação e nocicepção através da injeção de adjuvante completo de Freund (CFA) na pata de ratos, o tratamento intratecal com Ac2-26 reduziu a resposta nociceptiva avaliada por estímulos térmicos e mecânicos (filamentos de von Frey), fato revertido com o tratamento intratecal prévio de um antagonista do receptor FPR2/3, o N-t-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (Boc1) (158). Estes dados corroboram nossos dados, onde foi mostrado que a ausência da AnxA1 ou de seu receptor diminuem o limiar nociceptivos dos animais, enquanto o tratamento intra-articular de Ac2-26 reduziu a nocicepção mecânica.

Tradicionalmente, as terapias anti-inflamatórias concentraram-se em estratégias que inibem ou neutralizam mediadores pró-inflamatórios, bem como ativação e o recrutamento de leucócitos. Os anti-inflamatórios não esteroidais e os glicocorticoides sintéticos, os quais inibem a produção local de quimiocinas e moléculas de adesão,

resultam em uma diminuição do influxo de leucócitos para os tecidos (159) Em trabalho prévio, nosso grupo avaliou efeitos protetores da AnxA1 em modelo de artrite gotosa aguda induzida pela injeção de cristais de ácido úrico na articulação tibiofemoral de camundongos, quando a administração do Ac2-26 reduziu significativamente o influxo de neutrófilos, níveis de IL-1 β e nocicepção articular (130). Em um estudo mais recente em modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos, onde a inflamação foi mais persistente que o modelo de gota, o tratamento de nanopartículas carregadas com peptídeo Ac2-26 também foi eficaz de reduzir o escore histopatológico da articulação e outros parâmetros de inflamação, como edema e a citocina IL-17 (136). É importante ressaltar que no modelo de OA utilizado neste estudo, assim como na OA humana, a sinovite não é tão evidente e intensa quando outros tipos de artrite, como a Artrite Reumatoide e Gota (130). Um desses parâmetros que diferem a OA de outras artrites é a baixa frequência de neutrófilos no tecido articular. Além disso, muitas das ações de moléculas pró-resolutivas para o controle da inflamação se baseiam na redução migração, ativação e viabilidade de neutrófilos (117,159). Porém, há outras funções importantes desta classe de moléculas, como a modificação do perfil de ativação de macrófagos, o que poderia controlar a inflamação da OA e promover o reparo tecidual e controle da disfunção tecidual. Aqui, a AnxA1 e especialmente o Ac2-26 demonstram um grande potencial para tratamento de doenças crônicas, mesmo com o tratamento sendo realizado localmente, em concentrações baixas e com baixa frequência, oferecendo benefícios com menor risco de efeitos colaterais em comparação aos anti-inflamatórios tradicionais(147).

O peptídeo Ac2-26, tem demonstrado benefícios significativos em diversos modelos experimentais de doenças inflamatórias agudas. Porém, são poucos estudos que discutem seu papel terapêutico para condições em que a inflamação crônica desempenha um papel central. Um estudo em modelos de indução de diabetes, o tratamento com Ac2-26 acelerou o reparo de feridas diabéticas, favorecendo a regeneração tecidual. O uso deste peptídeo promoveu a cicatrização ao reduzir a inflamação e estimular a polarização de macrófagos para um perfil anti-inflamatório (M2) (152). Outra importante evidência é a ação do Ac2-26 no reparo de lesão muscular, que foi eficaz em aumentar significativamente os níveis de CD206, marcador de macrófagos M2, destacando o potencial regenerativo desse peptídeo. Esses achados reforçam o papel da AnxA1 como uma estratégia terapêutica promissora para a regeneração e recuperação de tecidos lesionados (160).

Atualmente, a literatura científica tem se concentrado no desenvolvimento de estratégias para regeneração da cartilagem, um tecido notoriamente difícil de cicatrizar e para o qual ainda não existem tratamentos efetivos na prática clínica. No contexto da osteoartrite, a cartilagem articular sofre danos contínuos devido a fatores intrínsecos, como sobrepeso e envelhecimento, agravando sua degradação progressiva (6,17). Tradicionalmente, o manejo clínico inclui injeções intra-articulares de ácido hialurônico, destinadas a melhorar a lubrificação da articulação e reduzir o atrito entre as superfícies ósseas. No entanto, além de ser um tratamento oneroso, essa intervenção tem demonstrado eficácia limitada e, em alguns casos, pode até agravar a degeneração articular. Um estudo de Woo et al. (2020) destacou que, em vez de promover a regeneração da cartilagem, o ácido hialurônico pode contribuir para o aumento do desgaste, especialmente em quadros mais avançados de osteoartrite (161). Esses dados reforçam a necessidade de novas abordagens terapêuticas, voltadas não apenas para o alívio sintomático, mas para estimular a regeneração tecidual e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com OA.

Entre as novas abordagens para regeneração da cartilagem destacam-se a terapia com exossomas, o uso de células-tronco mesenquimais alogênicas e biomateriais híbridos. Essas estratégias representam avanços importantes, pois visam superar os desafios da cicatrização natural da cartilagem e minimizar os efeitos adversos dos tratamentos convencionais, como as injeções de ácido hialurônico. A terapia com exossomas, por exemplo, utiliza vesículas extracelulares para entregar sinais bioativos e promover a regeneração tecidual. Paralelamente, biomateriais híbridos estão sendo projetados para mimetizar a estrutura da matriz extracelular e criar ambientes propícios à regeneração celular. Já as células-tronco mesenquimais alogênicas, por sua vez, combinam propriedades imunomoduladoras e regenerativas, facilitando a formação de novo tecido cartilaginoso com menor risco de rejeição e inflamação (161–163). No nosso estudo, o tratamento com Ac2-26 reduziu consideravelmente o dano da cartilagem. Embora o tratamento tenha sido iniciado em fases mais avançadas da doença, especialmente após 21 dias da injeção de colagenase, ainda não é possível afirmar se os efeitos do Ac2-26 estão associados em evitar a progressão da doença ou promover o reparo da cartilagem lesada.

Diferentes citocinas pró-inflamatórias são detectadas na articulação com OA, as quais têm ações prejudiciais na progressão da doença, como a IL-1 β e a IL-6, que atuam, por exemplo, em sinoviócitos, os quais secretam enzimas que causam danos

da cartilagem e ósseos (124). Por outro lado, algumas citocinas podem apresentar efeitos benéficos para a articulação com OA, como as citocinas IL-4 e IL-10. A IL-4 atua inibindo a atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs), enzimas que degradam componentes da matriz extracelular (MEC), e previne a apoptose de condrócitos e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (164). Já a IL-10 tem um papel fundamental na manutenção da cartilagem, estimulando a produção de colágeno tipo II e agrecano, componentes essenciais da MEC, além de reduzir a atividade das MMPs e prevenir a morte celular dos condrócitos. (34). Estudos sugerem que níveis aumentados de IL-10 podem modular a resposta imune em articulações afetadas por OA, reduzindo a inflamação e a degradação da cartilagem (145,146,165). Nossos dados sugerem que o tratamento com Ac2-26 foi capaz de aumentar a expressão de IL-10, reforçando seus efeitos condroprotetores.

A MMP3 desempenha um papel fundamental na OA, contribuindo para a degradação da matriz extracelular da cartilagem e facilitando a progressão da doença. Seus níveis aumentam tanto nos estágios iniciais quanto avançados da OA, degradando a cartilagem e promovendo inflamação sinovial. Além disso, a MMP3 pode ativar outras enzimas degenerativas e inibir a diferenciação de células-tronco mesenquimais em condrócitos, dificultando a regeneração tecidual. Isso destaca a importância de abordagens terapêuticas visando controlar sua expressão para evitar a progressão da OA(42). Além da MMP3, enzimas como MMP1, MMP9 e MMP13 também participam desse processo, mas a MMP3 se destaca como a mais potente no contexto da OA, desempenhando um papel central na destruição da matriz cartilaginosa (42,166). Em nossos experimentos, observamos uma redução significativa na expressão da MMP3 em camundongos tratados com o peptídeo Ac2-26, independente do início do tratamento.

Atualmente, muitas pesquisas apontam que o controle da atividade de sinoviócitos, como fibroblastos e macrófagos, pode ser uma nova abordagem terapêutica para o controle da OA. Nossos dados mostraram que há um aumento do número e atividade dessas células e que o tratamento com o Ac2-26 foi eficaz em reverter este fenótipo. Além disso, o aumento do número de sinoviócitos positivos para RANKL neste modelo foi revertido com o Ac2-26. O sistema RANK/RANKL/OPG desempenha um papel essencial na patogênese da OA ao regular o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. Esse eixo está envolvido na ativação de osteoclastos e contribui para alterações patológicas, como manipulação da cartilagem e esclerose

do osso subcondral. Nos modelos de OA, o aumento dos níveis de RANKL promove a perda de estrutura óssea e a inflamação articular, piorando a degeneração articular (145,146). Novamente, a AnxA1 e especialmente o Ac2-26 podem ser consideradas importantes moléculas que controlam a atividade pró-osteoartrítica dos sinoviócitos.

7.CONCLUSÃO

Nossos estudos demonstraram que a ausência da AnxA1 ou de seu receptor FPR2 acarretam piora do quadro de dano, lesão e nocicepção em animais com OA induzida por colagenase. Ainda, o tratamento local com Ac2-26 foi bastante eficaz em controlar esses parâmetros, mostrando-se um grande potencial para controlar os danos da OA. Esses achados indicam que a AnxA1 ou o Ac2-26 também exercem importante atividade em modelo de inflamação crônica, em um modelo que não possui participação efetiva de neutrófilos no curso da doença. Ainda não é possível estabelecer que a AnxA1 ou o Ac2-26 exerçam as potentes atividades pró-resolutivas neste modelo, como bem estabelecido em outras inflamações, principalmente agudas e dependentes do papel de células polimorfonucleares. Porém nossos resultados indicaram uma significativa melhora na degeneração articular em animais tratados com Ac2-26, evidenciando o importante papel da AnxA1 na preservação da inflamação, dano e nocicepção características da OA.

8.REFERÊNCIAS

1. David J Hunter SBZ. Osteoarthritis | 10. The Lancet. 2019;393(10182):1745–59.
2. King LK. Osteoarthritis and comorbidity: time for action. *Osteoarthritis Cartilage*. abril de 2023;31(4):423–4.
3. Sherwood J. Osteoarthritis year in review 2018: biology. *Osteoarthritis Cartilage* [Internet]. 2019;27(3):365–70. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.10.005>
4. Qiao L, Li M, Deng F, Wen X, Deng H, Xue Z, et al. Epidemiological trends of osteoarthritis at the global, regional, and national levels from 1990 to 2021 and projections to 2050. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2024.06.30.24309697>
5. Long H, Liu Q, Yin H, Wang K, Diao N, Zhang Y, et al. Prevalence Trends of Site-Specific Osteoarthritis From 1990 to 2019: Findings From the Global Burden of Disease Study 2019. *Arthritis and Rheumatology*. 1º de julho de 2022;74(7):1172–83.
6. Steinmetz JD, Culbreth GT, Haile LM, Rafferty Q, Lo J, Fukutaki KG, et al. Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990-2020 and projections to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet Rheumatol*. 1º de setembro de 2023;5(9):e508–22.
7. Eyles JP, Sharma S, Telles RW, Namane M, Hunter DJ, Bowden JL. Implementation of Best-Evidence Osteoarthritis Care: Perspectives on Challenges for, and Opportunities From, Low and Middle-Income Countries. Vol. 2, *Frontiers in Rehabilitation Sciences*. Frontiers Media SA; 2021.
8. Scheuing WJ, Reginato AM, Deeb M, Acer Kasman S. The burden of osteoarthritis: Is it a rising problem? Vol. 37, *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. Bailliere Tindall Ltd; 2023.
9. Zhao X, Shah D, Gandhi K, Wei W, Dwibedi N, Webster L, et al. Clinical, humanistic, and economic burden of osteoarthritis among noninstitutionalized adults in the United States. *Osteoarthritis Cartilage*. 1º de novembro de 2019;27(11):1618–26.
10. Salmon JH, Rat AC, Sellam J, Michel M, Eschard JP, Guillemin F, et al. Economic impact of lower-limb osteoarthritis worldwide: a systematic review of cost-of-illness studies. Vol. 24, *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd; 2016. p. 1500–8.
11. Leifer VP, Katz JN, Losina E. The burden of OA-health services and economics. *Osteoarthritis Cartilage*. 1º de janeiro de 2022;30(1):10–6.
12. Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of Osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2013;39(1):1–19.
13. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* [Internet]. novembro de 2018;392(10159):1789–858. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618322797>
14. Motta F, Barone E, Sica A, Selmi C. Inflammaging and Osteoarthritis. Vol. 64, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. Springer; 2023. p. 222–38.
15. Jang S, Lee K, Ju JH. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021. p. 1–15.

16. Primorac D, Molnar V, Rod E, Jeleč Ž, Čukelj F, Matišić V, et al. Knee osteoarthritis: A review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations. Vol. 11, *Genes*. MDPI AG; 2020. p. 1–35.
17. Vina ER, Kwok CK. Epidemiology of osteoarthritis: Literature update. Vol. 30, *Current Opinion in Rheumatology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018. p. 160–7.
18. Berenbaum F, Wallace IJ, Lieberman DE, Felson DT. Modern-day environmental factors in the pathogenesis of osteoarthritis. Vol. 14, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 674–81.
19. Driban JB, Hootman JM, Sitler MR, Harris K, Cattano NM. Is Participation in Certain Sports Associated With Knee Osteoarthritis? A Systematic Review. *J Athl Train* [Internet]. 2015;150219105224004. Disponível em: <https://scihub.mksa.top/>
20. Georgiev T, Angelov AK. Modifiable risk factors in knee osteoarthritis: treatment implications. *Rheumatology International*. Springer Verlag; 2019.
21. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. Vol. 64, *Arthritis and Rheumatism*. 2012. p. 1697–707.
22. Price LL, Harkey MS, Ward RJ, MacKay JW, Zhang M, Pang J, et al. Role of Magnetic Resonance Imaging in Classifying Individuals Who Will Develop Accelerated Radiographic Knee Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*. 1º de novembro de 2019;37(11):2420–8.
23. Driban JB, Stout AC, Duryea J, Lo GH, Harvey WF, Price LL, et al. Coronal tibial slope is associated with accelerated knee osteoarthritis: Data from the Osteoarthritis Initiative. *BMC Musculoskelet Disord*. 19 de julho de 2016;17(1).
24. Driban JB, Eaton CB, Amin M, Stout AC, Price LL, Lu B, et al. Glucose homeostasis influences the risk of incident knee osteoarthritis: Data from the osteoarthritis initiative. *Journal of Orthopaedic Research*. 1º de outubro de 2017;35(10):2282–7.
25. Driban JB, McAlindon TE, Amin M, Price LL, Eaton CB, Davis JE, et al. Risk factors can classify individuals who develop accelerated knee osteoarthritis: Data from the osteoarthritis initiative. *Journal of Orthopaedic Research*. 1º de março de 2018;36(3):876–80.
26. Fan Z, Yan L, Liu H, Li X, Fan K, Liu Q, et al. The prevalence of hip osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 1º de dezembro de 2023;25(1):51.
27. Foster NE, L E, L D, M H. Osteoarthritis year in review 2022: epidemiology & therapy. *Osteoarthritis Cartilage* [Internet]. março de 2023; Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458423007306>
28. Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. *The Lancet*. 2019;393(10182):1745–59.
29. Di J, Bai J, Zhang J, Chen J, Hao Y, Bai J, et al. Regional disparities, age-related changes and sex-related differences in knee osteoarthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 1º de dezembro de 2024;25(1).
30. Saberi Hosnijeh F, Runhaar J, Van Meurs JBJ, Bierma-Zeinstra SM. Biomarkers for osteoarthritis: Can they be used for risk assessment? A systematic review. *Maturitas*. 2015;82(1):36–49.
31. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. Vol. 2, *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Publishing Group; 2016.

32. Goldring SR, Goldring MB. Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: Structure, function and cartilage bone crosstalk. Vol. 12, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 632–44.
33. Armiento AR, Stoddart MJ, Alini M, Eglin D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. Vol. 65, *Acta Biomaterialia*. 2018.
34. Goldring MB, Goldring SR. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:230–7.
35. Carballo CB, NY, SI, & RSA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in Sports Medicine*, 36(3), 413–425 | 10. Clin Sports Med. 2017;36(3):413–25.
36. Mansfield JC, Bell JS, Winlove CP. The micromechanics of the superficial zone of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 1º de outubro de 2015;23(10):1806–16.
37. Mansfield JC, Mandalia V, Toms A, Peter Winlove C, Brasselet S. Collagen reorganization in cartilage under strain probed by polarization sensitive second harmonic generation microscopy. *J R Soc Interface*. 1º de janeiro de 2019;16(150).
38. Mansfield JC, Peter Winlove C. A multi-modal multiphoton investigation of microstructure in the deep zone and calcified cartilage. *J Anat*. abril de 2012;220(4):405–16.
39. Xia B, Di Chen, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P. Osteoarthritis Pathogenesis: A Review of Molecular Mechanisms. Vol. 95, *Calcified Tissue International*. Springer Science and Business Media, LLC; 2014. p. 495–505.
40. Jiang L, Lin J, Zhao S, Wu J, Jin Y, Yu L, et al. ADAMTS5 in Osteoarthritis: Biological Functions, Regulatory Network, and Potential Targeting Therapies. Vol. 8, *Frontiers in Molecular Biosciences*. Frontiers Media S.A.; 2021.
41. Nunes R de M, Girão VCC, Cunha PLR, Feitosa JPA, Pinto ACMD, Rocha FAC. Decreased Sulfate Content and Zeta Potential Distinguish Glycosaminoglycans of the Extracellular Matrix of Osteoarthritis Cartilage. *Front Med (Lausanne)*. 29 de abril de 2021;8.
42. Hu Q, Ecker M. Overview of MMP-13 as a promising target for the treatment of osteoarthritis. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021. p. 1–22.
43. Parrish A.R. Matrix Metalloproteinases and Tissue Remodeling in Health and Disease: Target Tissues and Therapy, V. *Molecular Biology and Translational Science*. 2017;15.
44. Finnilä MA, Das Gupta S, Turunen MJ, Kestilä I, Turkiewicz A, Lutz-Bueno V, et al. Mineral crystal thickness in calcified cartilage and subchondral bone in healthy and osteoarthritic knees. *bioRxiv* [Internet]. 2021; Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2021.06.15.448181>
45. Li X, Chen W, Liu D, Chen P, Wang S, Li F, et al. Pathological progression of osteoarthritis: a perspective on subchondral bone. Vol. 18, *Frontiers of Medicine*. Higher Education Press Limited Company; 2024. p. 237–57.
46. Funck-Brentano T, Cohen-Solal M. Subchondral bone and osteoarthritis. Vol. 27, *Current Opinion in Rheumatology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 420–6.
47. Donell S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. *EFORT Open Rev*. 1º de junho de 2019;4(6):221–9.
48. Hu Y, Chen X, Wang S, Jing Y, Su J. Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. Vol. 9, *Bone Research*. Springer Nature; 2021.

49. Walsh DA, Sofat N, Guermazi A, Hunter DJ. Osteoarthritis Bone Marrow Lesions. Vol. 31, Osteoarthritis and Cartilage. W.B. Saunders Ltd; 2023. p. 11–7.
50. Donell S. Subchondral bone remodelling in osteoarthritis. EFORT Open Rev. 1º de junho de 2019;4(6):221–9.
51. Alliston T, Hernandez CJ, Findlay DM, Felson DT, Kennedy OD. Bone marrow lesions in osteoarthritis: What lies beneath. Vol. 36, Journal of Orthopaedic Research. John Wiley and Sons Inc.; 2018. p. 1818–25.
52. Zeng N, Yan ZP, Chen XY, Ni GX. Infrapatellar fat pad and knee osteoarthritis. Vol. 11, Aging and Disease. International Society on Aging and Disease; 2020. p. 1317–28.
53. Jiang LF, Fang JH, Wu LD. Role of infrapatellar fat pad in pathological process of knee osteoarthritis: Future applications in treatment. Vol. 7, World Journal of Clinical Cases. Baishideng Publishing Group Co; 2019. p. 2134–42.
54. Barboza E, Hudson J, Chang WP, Kovats S, Towner RA, Silasi-Mansat R, et al. Profibrotic Infrapatellar Fat Pad Remodeling Without M1 Macrophage Polarization Precedes Knee Osteoarthritis in Mice With Diet-Induced Obesity. Arthritis and Rheumatology. 1º de junho de 2017;69(6):1221–32.
55. Wu CL, Harasymowicz NS, Klimak MA, Collins KH, Guilak F. The role of macrophages in osteoarthritis and cartilage repair. Vol. 28, Osteoarthritis and Cartilage. W.B. Saunders Ltd; 2020. p. 544–54.
56. Van Le TH, Kwon SM. Vascular endothelial growth factor biology and its potential as a therapeutic target in rheumatic diseases. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2021.
57. Greif DN, Kouroupis D, Murdock CJ, Griswold AJ, Kaplan LD, Best TM, et al. Infrapatellar Fat Pad/Synovium Complex in Early-Stage Knee Osteoarthritis: Potential New Target and Source of Therapeutic Mesenchymal Stem/Stromal Cells. Vol. 8, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. Frontiers Media S.A.; 2020.
58. Mustonen AM, Käkelä R, Lehenkari P, Huhtakangas J, Turunen S, Joukainen A, et al. Distinct fatty acid signatures in infrapatellar fat pad and synovial fluid of patients with osteoarthritis versus rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 22 de maio de 2019;21(1).
59. Ozeki N, Koga H, Sekiya I. Degenerative Meniscus in Knee Osteoarthritis: From Pathology to Treatment. Vol. 12, Life. MDPI; 2022.
60. Ghouri A, Muzumdar S, Barr AJ, Robinson E, Murdoch C, Kingsbury SR, et al. The relationship between meniscal pathologies, cartilage loss, joint replacement and pain in knee osteoarthritis: a systematic review. Vol. 30, Osteoarthritis and Cartilage. W.B. Saunders Ltd; 2022. p. 1287–327.
61. Antony B, Driban JB, Price LL, Lo GH, Ward RJ, Nevitt M, et al. The relationship between meniscal pathology and osteoarthritis depends on the type of meniscal damage visible on magnetic resonance images: data from the Osteoarthritis Initiative. Osteoarthritis Cartilage. 1º de janeiro de 2017;25(1):76–84.
62. Alnahdi AH, Zeni JA, Snyder-Mackler L. Muscle Impairments in Patients With Knee Osteoarthritis. Sports Health. julho de 2012;4(4):284–92.
63. Raghava Neelapala Y V., Bhagat M, Shah P. Hip Muscle Strengthening for Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Literature. Vol. 43, Journal of Geriatric Physical Therapy. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 89–98.
64. Øiestad BE JCCA et al. Knee extensor muscle weakness is a risk factor for the development of knee osteoarthritis: an update. 2022;

65. Sanchez-Lopez E, Coras R, Torres A, Lane NE, Guma M. Synovial inflammation in osteoarthritis progression. Vol. 18, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Research; 2022. p. 258–75.
66. Thomson A, Hilkens CMU. Synovial Macrophages in Osteoarthritis: The Key to Understanding Pathogenesis? Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
67. Belluzzi E, Stocco E, Pozzuoli A, Granzotto M, Porzionato A, Vettor R, et al. Contribution of Infrapatellar Fat Pad and Synovial Membrane to Knee Osteoarthritis Pain. Vol. 2019, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2019.
68. Griffin TM, Scanzello CR. *Innate Inflammation and Synovial Macrophages in Osteoarthritis Pathophysiology*. 2019.
69. Xie J, Huang Z, Yu X, Zhou L, Pei F. Cytokine and Growth Factor Reviews Clinical implications of macrophage dysfunction in the development of osteoarthritis of the knee. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2019;46(January):36–44. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.03.004>
70. Hügler T, Geurts J. What drives osteoarthritis?-Synovial versus subchondral bone pathology. Vol. 56, *Rheumatology (United Kingdom)*. Oxford University Press; 2017. p. 1461–71.
71. Thomson A, Hilkens CMU. Synovial Macrophages in Osteoarthritis: The Key to Understanding Pathogenesis? Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
72. Rosshirt N, Trauth R, Platzer H, Tripel E, Nees TA, Lorenz HM, et al. Proinflammatory T cell polarization is already present in patients with early knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 1º de dezembro de 2021;23(1).
73. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*. 24 de janeiro de 2013;38(1):79–91.
74. Sheng J, Ruedl C, Karjalainen K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity*. 18 de agosto de 2015;43(2):382–93.
75. Fan Z, Yan L, Liu H, Li X, Fan K, Liu Q, et al. The prevalence of hip osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 1º de dezembro de 2023;25(1):51.
76. Hagemeyer N, Kierdorf K, Frenzel K, Xue J, Ringelhan M, Abdullah Z, et al. Transcriptome-based profiling of yolk sac-derived macrophages reveals a role for *Irf8* in macrophage maturation. *EMBO J*. 15 de agosto de 2016;35(16):1730–44.
77. Culemann S, Grüneboom A, Nicolás-Ávila JÁ, Weidner D, Lämmle KF, Rothe T, et al. Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature*. 29 de agosto de 2019;572(7771):670–5.
78. Wang D, Chai XQ, Hu SS, Pan F. Joint synovial macrophages as a potential target for intra-articular treatment of osteoarthritis-related pain. Vol. 30, *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd; 2022. p. 406–15.
79. Van Den Bosch MH, Blom AB, Schelbergen RF, Koenders MI, Van De Loo FA, Van Den Berg WB, et al. Alarmin S100A9 induces proinflammatory and catabolic effects predominantly in the M1 macrophages of human osteoarthritic synovium. *Journal of Rheumatology*. 1º de outubro de 2016;43(10):1874–84.

80. Thomson A, Hilkens CMU. Synovial Macrophages in Osteoarthritis: The Key to Understanding Pathogenesis? Vol. 12, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
81. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):1–12.
82. Sun ARJ, Panchal SK, Friis T, Sekar S, Crawford R, Brown L, et al. Obesity-associated metabolic syndrome spontaneously induces infiltration of pro-inflammatory macrophage in synovium and promotes osteoarthritis. *PLoS One*. 1º de agosto de 2017;12(8).
83. Rosshirt N, Trauth R, Platzner H, Tripel E, Nees TA, Lorenz HM, et al. Proinflammatory T cell polarization is already present in patients with early knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 1º de dezembro de 2021;23(1).
84. van den Bosch MHJ, Blom AB, van der Kraan PM. Inflammation in osteoarthritis: Our view on its presence and involvement in disease development over the years. Vol. 32, *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd; 2024. p. 355–64.
85. Liu Y, Peng H, Meng Z, Wei M. Correlation of IL-17 level in synovia and severity of knee osteoarthritis. *Medical Science Monitor*. 15 de junho de 2015;21:1732–6.
86. Molnar V, Matišić V, Kodvanj I, Bjelica R, Jeleč Ž, Hudetz D, et al. Cytokines and Chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
87. van Helvoort EM, van der Heijden E, van Roon JAG, Eijkelkamp N, Mastbergen SC. The Role of Interleukin-4 and Interleukin-10 in Osteoarthritic Joint Disease: A Systematic Narrative Review. *Cartilage*. 1º de abril de 2022;13(2).
88. Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: Latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013;5(2):77–94.
89. Jenei-Lanzl Z, Meurer A, Zaucke F. Interleukin-1 β signaling in osteoarthritis – chondrocytes in focus. Vol. 53, *Cellular Signalling*. Elsevier Inc.; 2019. p. 212–23.
90. Leivonen SK, Chantry A, Häkkinen L, Han J, Kähäri VM. Smad3 mediates transforming growth factor- β -induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts: Evidence for cross-talk between Smad3 and p38 signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(48):46338–46.
91. Zhai G, Doré J, Rahman P. TGF- β signal transduction pathways and osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2015;35(8):1283–92.
92. Vogl T, Stratis A, Wixler V, Völler T, Thurainayagam S, Jorch SK, et al. Autoinhibitory regulation of S100A8/S100A9 alarmin activity locally restricts sterile inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(5):1852–66.
93. van den Bosch MHJ, van Lent PLEM, van der Kraan PM. Identifying effector molecules, cells, and cytokines of innate immunity in OA. *Osteoarthritis Cartilage*. 2020;28(5):532–43.
94. Pap T, Dankbar B, Wehmeyer C, Korb-Pap A, Sherwood J. Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: Role and mechanisms. Vol. 101, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 140–5.

95. Maglaviceanu A, Wu B, Kapoor M. Fibroblast-like synoviocytes: Role in synovial fibrosis associated with osteoarthritis. *Wound Repair and Regeneration*. 1º de julho de 2021;29(4):642–9.
96. O'Neill TW, Felson DT. Mechanisms of Osteoarthritis (OA) Pain. Vol. 16, *Current Osteoporosis Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2018. p. 611–6.
97. Vincent TL. Of mice and men: converging on a common molecular understanding of osteoarthritis [Internet]. Vol. 2, *Review Lancet Rheumatol*. 2020. Disponível em: www.thelancet.com/rheumatology
98. Millerand M, Berenbaum F, Jacques C. Danger signals and inflammaging in osteoarthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(5):48–56.
99. Syx D, Tran PB, Miller RE, Malfait AM. Peripheral Mechanisms Contributing to Osteoarthritis Pain. Vol. 20, *Current Rheumatology Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2018.
100. Thakur M, Dickenson AH, Baron R. Osteoarthritis pain: Nociceptive or neuropathic? Vol. 10, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2014. p. 374–80.
101. Dimitroulas T, Duarte R V., Behura A, Kitas GD, Raphael JH. Neuropathic pain in osteoarthritis: A review of pathophysiological mechanisms and implications for treatment. Vol. 44, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. W.B. Saunders; 2014. p. 145–54.
102. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. *Nat Rev Dis Primers*. 16 de fevereiro de 2017;3.
103. Dimitroulas T, Duarte R V., Behura A, Kitas GD, Raphael JH. Neuropathic pain in osteoarthritis: A review of pathophysiological mechanisms and implications for treatment. Vol. 44, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. W.B. Saunders; 2014. p. 145–54.
104. Fu K, Robbins SR, McDougall JJ. Osteoarthritis: The genesis of pain. *Rheumatology (United Kingdom)*. 1º de maio de 2018;57:iv43–50.
105. Obeidat AM, Miller RE, Miller RJ, Malfait AM. The nociceptive innervation of the normal and osteoarthritic mouse knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 1º de novembro de 2019;27(11):1669–79.
106. Miller RE, Tran PB, Ishihara S, Syx D, Ren D, Miller RJ, et al. Microarray analyses of the dorsal root ganglia support a role for innate neuro-immune pathways in persistent pain in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 1º de maio de 2020;28(5):581–92.
107. Lee MC, Saleh R, Achuthan A, Fleetwood AJ, Förster I, Hamilton JA, et al. CCL17 blockade as a therapy for osteoarthritis pain and disease. *Arthritis Res Ther*. 5 de abril de 2018;20(1).
108. Dawes JM, Kiesewetter H, Perkins JR, Bennett DLH, McMahon SB. Chemokine expression in peripheral tissues from the monosodium iodoacetate model of chronic joint pain. *Mol Pain*. 8 de novembro de 2013;9(1).
109. Medzhitov R. Overview Essay Inflammation 2010 : New Adventures of an Old Flame. 2010;771–6.
110. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. Vol. 128, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2018. p. 2657–69.
111. Glyn-Jones, Palmer S, Agricola AJR, Price R, Vincent AJ, Carr TL. Osteoarthritis. *The Lancet*. 2015;386(9991):376–87.

112. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators. Vol. 3, Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2008. 279–312 p.
113. Patrignani P, Tacconelli S, Bruno A, Sostres C, Lanas A. Managing the adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Vol. 4, Expert Review of Clinical Pharmacology. 2011. p. 605–21.
114. ar4686.
115. Fukunaga K, Kohli P, Bonnans C, Fredenburgh LE, Levy BD. Cyclooxygenase 2 Plays a Pivotal Role in the Resolution of Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology*. 15 de abril de 2005;174(8):5033–9.
116. Perretti M, Cooper D, Dalli J, Norling L V. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. Vol. 13, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 87–99.
117. Sugimoto MA, Vago JP, Perretti M, Teixeira MM. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. 2019;40(3).
118. Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Perretti M, Teixeira MM. Resolution of inflammation: What controls its onset? Vol. 7, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2016.
119. Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: Linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. Vol. 6, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2005. p. 449–61.
120. Perretti M, Cooper D, Dalli J, Norling L V. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. Vol. 13, *Nature Reviews Rheumatology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 87–99.
121. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(16):1711–23.
122. Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiol Rev*. 2002;82(2):331–71.
123. Ronchetti S, Migliorati G, Bruscoli S, Riccardi C. Defining the role of glucocorticoids in inflammation. *Clin Sci*. 2018;132(14):1529–43.
124. Yang YH, Aeberli D, Dacumos A, Xue JR, Morand EF. Annexin-1 Regulates Macrophage IL-6 and TNF via Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper. *The Journal of Immunology*. 2009;183(2):1435–45.
125. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(1):62–70.
126. Vago JP, Nogueira CRC, Tavares LP, Soriani FM, Lopes F, Russo RC, et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2012;92(2):249–58.
127. Oliani SM, Gil CD. Proteína antiinflamatória anexina 1 : mecanismos celulares e relevância clínica Anti-inflammatory protein annexin 1 : cellular mechanisms and clinical relevance. 2006;13(4):186–91.
128. Tavares LP, Negreiros-Lima GL, Lima KM, E Silva PMR, Pinho V, Teixeira MM, et al. Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation. Vol. 159, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2020.
129. Yang YH, Morand EF, Getting SJ, Paul-Clark M, Liu DL, Yona S, et al. Modulation of Inflammation and Response to Dexamethasone by Annexin 1 in Antigen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheum*. março de 2004;50(3):976–84.

130. Galvão I, Vago JP, Barroso LC, Tavares LP, Queiroz-Junior CM, Costa V V., et al. Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. *Eur J Immunol.* 1º de março de 2017;47(3):585–96.
131. Yu C, Chen H, Qi X, Chen P, Di G. Annexin A1 mimetic peptide Ac2-26 attenuates mechanical injury induced corneal scarring and inflammation. 2019.
132. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. Vol. 15, *Nature Reviews Drug Discovery.* Nature Publishing Group; 2016. p. 551–67.
133. Rüger M, Kipp E, Schubert N, Schröder N, Pufe T, Stope MB, et al. The formyl peptide receptor agonist Ac2-26 alleviates neuroinflammation in a mouse model of pneumococcal meningitis. *J Neuroinflammation.* 1º de dezembro de 2020;17(1).
134. Luo Z, Wang H, Fang S, Li L, Li X, Shi J, et al. Annexin-1 Mimetic Peptide Ac2-26 Suppresses Inflammatory Mediators in LPS-Induced Astrocytes and Ameliorates Pain Hypersensitivity in a Rat Model of Inflammatory Pain. *Cell Mol Neurobiol.* 1º de maio de 2020;40(4):569–85.
135. Qin X, He L, Fan D, Liang W, Wang Q, Fang J. Targeting the resolution pathway of inflammation using Ac2–26 peptide-loaded PEGylated lipid nanoparticles for the remission of rheumatoid arthritis. *Asian J Pharm Sci.* 1º de julho de 2021;16(4):483–93.
136. Qin X, He L, Fan D, Liang W, Wang Q, Fang J. Targeting the resolution pathway of inflammation using Ac2–26 peptide-loaded PEGylated lipid nanoparticles for the remission of rheumatoid arthritis. *Asian J Pharm Sci.* 1º de julho de 2021;16(4):483–93.
137. Luo Z, Wang H, Fang S, Li L, Li X, Shi J, et al. Annexin-1 Mimetic Peptide Ac2-26 Suppresses Inflammatory Mediators in LPS-Induced Astrocytes and Ameliorates Pain Hypersensitivity in a Rat Model of Inflammatory Pain. *Cell Mol Neurobiol.* 1º de maio de 2020;40(4):569–85.
138. Zhang Y, Ma S, Ke X, Yi Y, Yu H, Yu D, et al. The mechanism of Annexin A1 to modulate TRPV1 and nociception in dorsal root ganglion neurons. *Cell Biosci.* 1º de dezembro de 2021;11(1).
139. Van Der Kraan PM, Vitters EL, Van Beuningen HM, Van De Putte LBA, Van Den Berg WB. Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *J Exp Pathol.* 1990;71(1):19–31.
140. Sachs D, Coelho FM, Costa V V., Lopes F, Pinho V, Amaral FA, et al. Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *Br J Pharmacol.* janeiro de 2011;162(1):72–83.
141. Suokas AK, Walsh DA, McWilliams DF, Condon L, Moreton B, Wylde V, et al. Quantitative sensory testing in painful osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* [Internet]. 2012;20(10):1075–85. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.06.009>
142. van der Kraan PM. Collagenase-Induced Osteoarthritis in Mice. Em: *Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc.; 2023. p. 375–9.
143. Chen JJ, Huang JF, Du WX, Tong PJ. Expression and significance of MMP3 in synovium of knee joint at different stage in osteoarthritis patients. *Asian Pac J Trop Med.* abril de 2014;7(4):297–300.
144. Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. Vol. 51, *Bone.* 2012. p. 249–57.

145. Muratovic D, Atkins GJ, Findlay DM. Is RANKL a potential molecular target in osteoarthritis? Vol. 32, *Osteoarthritis and Cartilage*. W.B. Saunders Ltd; 2024. p. 493–500.
146. Liang J, Liu L, Feng H, Yue Y, Zhang Y, Wang Q, et al. Therapeutics of osteoarthritis and pharmacological mechanisms: A focus on RANK/RANKL signaling. Vol. 167, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l.; 2023.
147. Perretti M, Dalli J. Resolution Pharmacology: Focus on Pro-Resolving Annexin A1 and Lipid Mediators for Therapeutic Innovation in Inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2023 [Internet]. 2024;63:59. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051821->
148. Bannuru RSCKDVEWJ& M TE. Eficácia comparativa de intervenções farmacológicas para osteoartrite do joelho. [Internet]. 2015. Disponível em: <http://annals.org/>
149. Alessandri AL, Sousa LP, Lucas CD, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM. Pharmacology & Therapeutics Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2013; Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.006>
150. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids – an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation - CORE Reader.
151. Fredman G; KN; SS; M; GD; CR; K; PM; FO; TI. Targeted nanoparticles containing the proresolving peptide Ac2-26 protect against advanced. 2015;
152. Huang JJ, Xia CJ, Wei Y, Yao Y, Dong MW, Lin KZ, et al. Annexin A1-derived peptide Ac2-26 facilitates wound healing in diabetic mice. *Wound Repair and Regeneration*. 1º de novembro de 2020;28(6):772–9.
153. van der Kraan PM, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Putte LB, van den Berg WB. Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. Vol. 71, *J. Exp. Path.* 1990.
154. Adães S, Mendonça M, Santos TN, Castro-Lopes JM, Ferreira-Gomes J, Neto FL. Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 15 de janeiro de 2014;16(1).
155. Yu H, Huang T, Lu WW, Tong L, Chen D. Osteoarthritis Pain. *Int J Mol Sci*. 1º de maio de 2022;23(9).
156. Hsu H, Siwiec RM. Knee Osteoarthritis Continuing Education Activity. 2024.
157. Ayoub SS, Yazid S, Flower RJ. Increased susceptibility of annexin-A1 null mice to nociceptive pain is indicative of a spinal antinociceptive action of annexin-A1. *Br J Pharmacol*. julho de 2008;154(5):1135–42.
158. Pei L, Zhang J, Zhao F, Su T, Wei H, Tian J, et al. Annexin 1 exerts antinociceptive effects after peripheral inflammatory pain through formyl-peptide-receptor-like 1 in rat dorsal root ganglion. *Br J Anaesth*. 2011;107(6):948–58.
159. Vago JP, Nogueira CRC, Tavares LP, Soriani FM, Lopes F, Russo RC, et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *J Leukoc Biol*. 1º de agosto de 2012;92(2):249–58.
160. McArthur S, Juban G, Gobbetti T, Desgeorges T, Theret M, Gondin J, et al. Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration

- through AMPK activation. *Journal of Clinical Investigation*. 2 de março de 2020;130(3):1156–67.
161. Woo CH, Kim HK, Jung GY, Jung YJ, Lee KS, Yun YE, et al. Small extracellular vesicles from human adipose-derived stem cells attenuate cartilage degeneration. *J Extracell Vesicles*. 1º de janeiro de 2020;9(1).
 162. Hanai H, Hart DA, Jacob G, Shimomura K, Ando W, Yoshioka Y, et al. Small extracellular vesicles derived from human adipose-derived mesenchymal stromal cells cultured in a new chemically-defined contaminate-free media exhibit enhanced biological and therapeutic effects on human chondrocytes in vitro and in a mouse osteoarthritis model. *J Extracell Vesicles*. 1º de julho de 2023;12(7).
 163. Lewis JA, Nemke B, Lu Y, Sather NA, McClendon MT, Mullen M, et al. Supporting Information for A Bioactive Supramolecular and Covalent Polymer Scaffold for Cartilage Repair in a Sheep Model Supporting text Figures S1 to S17 Tables S1 to S3.
 164. Chambers M, Kirkpatrick G, Evans M, Gorski G, Foster S, Borghaei RC. IL-4 inhibition of IL-1 induced Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3) expression in human fibroblasts involves decreased AP-1 activation via negative crosstalk involving of Jun N-terminal Kinase (JNK). *Exp Cell Res*. 10 de junho de 2013;319(10):1398–408.
 165. Ge J, Yan Q, Wang Y, Cheng X, Song D, Wu C, et al. IL-10 delays the degeneration of intervertebral discs by suppressing the p38 MAPK signaling pathway. *Free Radic Biol Med*. 1º de fevereiro de 2020;147:262–70.
 166. Li H, Wang D, Yuan Y, Min J. New insights on the MMP-13 regulatory network in the pathogenesis of early osteoarthritis. Vol. 19, *Arthritis Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2017.

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo do CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do papel da proteína anexina A1 e do seu receptor AXL/FPR2 na inflamação, lesão e disfunção tecidual da osteoartrite", protocolo do CEUA: 240/2020 sob a responsabilidade de Flavio Almeida Amaral que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 11/01/2021.

Considerações posteriores:

30/08/2023	Adendo Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 28/08/2023. Adendo Aprovado: para a inclusão de dois grupos experimentais, contendo 32 animais (camundongos isogênico- macho) cada, para a realização de ensaios de imunofluorescência da articulação e PCR para identificação de fatores inflamatórios e lesão tecidual.
11/01/2021	Aprovado na reunião on-line do dia 11/01/2021. Validade: 11/01/2021 à 10/01/2026

Belo Horizonte, 14/10/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo 2: Descrição do processo de por HE

1. Xilol 5 min.
2. Xilol 5 min.
3. Álcool 100% 5 min.
4. Álcool 96% 5 min.
5. Álcool 70% 5 min.
6. Hematoxilina 10 min.
7. Lavar em água corrente 10 min.
8. Eosina 45 sec.
9. Mergulhar em álcool 70%
10. Álcool 96% 5 min.
11. Álcool 100% 5 min.
12. Xilol 5 min.
13. Xilol 5 min.
14. Montar a lâmina com bálsamo de fischer

Anexo 3: Descrição do processo de coloração por Safranina o- fast green

Preparo das soluções

- Ácido acético 1%

1 ml – ácido acético glacial

99 ml – água destilada

- Fast green 0,01%

0,1 g – fast green

100 ml – água destilada.

Dissolver sob agitação. Deixar agitando por 1 hora. Filtrar com 2 papeis de filtro. Armazenar em frasco âmbar.

- Safranina o 0,01%

0,1g – Safranina o

100 ml – água destilada

Dissolver sob agitação. Deixar agitando por 1 hora. Filtrar com 2 papeis de filtro. Armazenar em frasco âmbar.

Processo de coloração:

1. Xilol i – 10 passagens
2. Xilol ii – 10 passagens
4. Álcool absoluto i - 10 passagens
5. Álcool absoluto ii – 10 passagens
6. Álcool 90% - 10 passagens

7. Álcool 70% - 10 passagens
8. Água ultrapura – 10 passagens
9. Escorrer a lâmina
10. Fast green – 3min
11. Ácido acético 1% - passagem rápida – 10 a 15 segundos
12. Safranina o – 5 min
13. Álcool 70% - 10 passagens
14. Álcool 90% - 10 passagens
15. Álcool absoluto i – 10 passagens
16. Álcool absoluto ii -10 passagens
17. Xilol – 10 passagens
18. Xilol – 10 passagens
19. Montar a lâmina