



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

MICHELINE JOANA TENÓRIO ALBUQUERQUE MADRUGA MESQUITA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO AMBROXOL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATO**

São Luís

2026

MICHELINE JOANA TENÓRIO ALBUQUERQUE MADRUGA MESQUITA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO AMBROXOL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Santos Garcia

Co-Orientadora: Prof^ª Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes

São Luís

2026

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Mesquita, Micheline Joana Tenório Albuquerque Madruga

Avaliação do efeito analgésico e anti-inflamatório do ambroxol em modelo experimental de osteoartrite em rato / Micheline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita. - 2026.

98 f.: il.

Orientador: João Batista Santos Garcia

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2026.

1. Ambroxol. 2. Reposicionamento de fármacos. 3. Osteoartrite experimental. 4. Inflamação. 5. Dor crônica. I. Garcia, João Batista Santos. II. Cartágenes, Maria do Socorro de Sousa. III. Título

MICHELINE JOANA TENÓRIO ALBUQUERQUE MADRUGA MESQUITA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANALGÉSICO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DO AMBROXOL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Santos Garcia (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

1º Examinador Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Universidade Federal do Maranhão/PPGCS

2º Examinador Prof. José Osvaldo Barbosa Neto
Universidade Estadual do Maranhão

3º Examinador Profa. Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral
Universidade Federal do Maranhão/PPGCS

4º Examinador Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva
Universidade Federal do Maranhão

*“A ciência nunca resolve um problema sem
criar pelo menos outros dez.”*

George Bernard Shaw

Dedico

Primeiramente a Deus, por me conceder forças
nos momentos de fraqueza e iluminar meu
caminho.

À minha mãe, que sempre me incentivou nos
estudos e sonhou junto comigo a conquista
deste doutorado.

Ao meu pai, pelo exemplo de força e valores
que me acompanham em cada passo.

Ao meu marido e aos meus filhos, pelo amor,
paciência e compreensão diante das ausências
e desafios desta caminhada.

Ao meu irmão, que mesmo à distância sempre
esteve presente com palavras de
encorajamento.

Aos meus orientadores, Prof. João Batista e
Profa. Socorro Cartagens, pela dedicação,
apoio e ensinamentos ao longo desta trajetória.

E, por fim, aos ratos de laboratório, cuja
contribuição silenciosa tornou possível a
realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda sabedoria e vida, agradeço a força que me sustentou quando as minhas próprias se esgotaram. Quando as lágrimas turvaram meus olhos, tua mão as enxugou. Quando a incerteza me cercou, tua luz iluminou o caminho. Quando o medo tentou me calar, ouvi tua voz silenciosa a sussurrar: *Não temas, eu estou contigo. Se* hoje chego até aqui, é porque tua presença nunca me abandonou e, em cada passo, senti o cuidado do teu amor.

Aos meus pais, Mesquita e Joberlita, por todo o amor, dedicação e valores que me foram transmitidos ao longo da vida. Em especial, à minha mãe, que sempre esteve ao meu lado incentivando meus estudos, acreditando no meu potencial e sendo meu maior suporte em todos os momentos. Sua presença, força e cuidado foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. A vocês, minha eterna gratidão.

Ao meu esposo, Jorge, companheiro de vida, por estar ao meu lado em todos os momentos, oferecendo suporte, paciência e incentivo.

Ao meu irmão, Wagner, pelo apoio constante e por sempre torcer pelas minhas conquistas.

Aos meus filhos, Joana e Jorge Wagner, por serem minha maior fonte de amor, inspiração e força. Vocês são a razão de cada esforço e a motivação que me impulsiona a seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores. Obrigada pela compreensão nas ausências, pelo carinho constante e por tornarem minha vida mais leve e cheia de significado. Tudo isso é por vocês.

Ao meu orientador, Prof.^a Dr. João Batista Santos Garcia pela confiança, orientação segura e incentivo contínuo. Sua dedicação e compromisso com a ciência foram essenciais para a construção deste trabalho.

À minha coorientadora, Prof.^a Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, por todo o apoio ao longo desta trajetória, pela disponibilidade constante, generosidade e olhar atento em cada etapa deste trabalho. Sua contribuição foi essencial não apenas para o desenvolvimento desta pesquisa, mas também para meu crescimento pessoal e profissional. Mais do que uma parceria acadêmica, construímos uma amizade que levarei para a vida, e por isso, deixo aqui minha profunda gratidão.

Ao Prof. Rafael Cardoso Carvalho, pelo apoio fundamental na condução da fase experimental, especialmente no manejo dos animais, orientação prática e disponibilidade constante para esclarecimento de dúvidas. Sua contribuição foi essencial para a execução deste estudo.

Aos professores e colaboradores que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa, pelos ensinamentos, sugestões e apoio ao longo do desenvolvimento deste estudo. Em especial, aos professores Eduardo Martins de Sousa, Sebastiao Vieira de Moraes, Rafael de Abreu Lima, Marcelo Souza de Andrade e Joicy Cortez de Sá Sousa pela disponibilidade, contribuição valiosa e parceria ao longo desta trajetória.

À equipe do laboratório e aos colegas de pesquisa, pela parceria, troca de conhecimentos e ajuda nos momentos mais desafiadores. Em especial, à Anne Caroline Silva Nogueira da Cruz, com quem compartilhei toda a execução dos experimentos, pela dedicação, companheirismo e apoio constante ao longo desta jornada. O trabalho em equipe tornou essa caminhada mais leve e enriquecedora.

Aos técnicos de laboratório, pela colaboração fundamental na execução deste trabalho. Em especial, à Mayra, do laboratório de histologia, pela dedicação e cuidado na confecção das lâminas, e à Soninha, pelo apoio constante, sensibilidade e incentivo, nos momentos mais desafiadores desta jornada.

Aos alunos envolvidos neste projeto, tanto meus quanto de outros professores, em especial a Eduardo Rodrigues Silva e José Renzo Costa Garcês, pela colaboração, dedicação e apoio na execução da pesquisa experimental. A participação de cada um foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À instituição Universidade Federal do Maranhão/LEED, por proporcionar a estrutura e o ambiente necessários para a realização deste projeto.

Aos animais utilizados neste estudo, cuja contribuição foi fundamental para o avanço do conhecimento científico, com o compromisso de que este trabalho possa gerar benefícios futuros.

A todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa trajetória e contribuíram para a concretização deste sonho, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1	Osteoartrite (OA)	3
2.1.1	Anatomia e fisiologia da articulação sinovial	5
2.1.2	Fisiopatologia da osteoartrite	9
2.1.3	Diagnóstico da osteoartrite	15
2.1.4	Tratamento da osteoartrite	17
2.2	Modelo de osteoartrite induzida por monoiodoacetato (MIA)	20
2.3	Ambroxol (ABX).....	20
2.3.1	Mecanismo de Ação do Ambroxol.....	21
2.3.1.1	<i>Propriedades mucolíticas, mucocinéticas e surfactantes do ambroxol</i>	<i>22</i>
2.3.1.2	<i>Propriedade antioxidante</i>	<i>22</i>
2.3.1.3	<i>Efeito Anti-inflamatório</i>	<i>24</i>
2.3.1.4	<i>Efeito analgésico</i>	<i>25</i>
2.3.1.5	<i>Dose e toxicidade de ambroxol</i>	<i>26</i>
3	OBJETIVOS	30
3.1	Geral	30
3.2	Específicos	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Capítulo 1	31
4.2	Capítulo 2	44
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO A	
	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)	82
	ANEXO B – USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ABX	Ambroxol
ADAMTs	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs
ADAMTs-4	Agrecanase-1
ADAMTs-5	Agrecanase-2
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
BAL	<i>Bronchoalveolar Lavage</i>
CAT	Catalase
Cmax	Concentração plasmática máxima
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase-2
CTRL-	Controle negativo
CU	Colite ulcerativa
D0	Dia zero
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutathiona reduzida
HO-1	Heme Oxigenase-1
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-1Ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23

IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LPVI	Lesões Pulmonares Induzidas por Ventilação Mecânica
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz Extracelular
MIA	Monoiodoacetato de sódio
MMP-1	Matrix Metaloproteinase-1
MMP-13	Matrix Metaloproteinase-13
MMP-3	Matrix Metaloproteinase-3
MMPs	Metaloproteinases da matriz
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
OA	Osteoartrite
OH	Hidroxila
PGE2	Prostaglandina E2
PIB	Produto Interno Bruto
PLA2	Fosfolipase A2
PMN	Polimorfonucleares
PRAC	Comitê de Avaliação de Risco em Farmacovigilância
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SCARs	Reações adversas cutâneas graves
SOD	Superóxido dismutase
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TGF- β 1	<i>Transforming Growth Factor-beta 1</i>
TIMPs	Inibidores teciduais das metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TTX	Tetrodotoxina

TTX-r	Tetrodotoxina resistente
TTX-s	Tetrodotoxina sensível
UE	União Europeia
VGSCs	Canais de sódio dependentes de voltagem

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+}	Cálcio
kg	Kilograma
mg	Miligrama
$\text{Na}_v1.1$	Canal de sódio dependente de voltagem 1.1
$\text{Na}_v1.5$	Canal de sódio dependente de voltagem 1.5
$\text{Na}_v1.6$	Canal de sódio dependente de voltagem 1.6
$\text{Na}_v1.7$	Canal de sódio dependente de voltagem 1.7
$\text{Na}_v1.8$	Canal de sódio dependente de voltagem 1.8
$\text{Na}_v1.9$	Canal de sódio dependente de voltagem 1.9
O_2^-	Radicais superóxido
ONOO^-	Peroxinitrito

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Representação esquemática de uma articulação sinovial	6
Figura 2	–	Representação esquemática do balanço anabólico e catabólico da cartilagem articular.....	8
Figura 3	–	Mecanismos Anabólicos e Catabólicos na osteoartrite	12
Figura 4	–	Alterações estruturais da osteoartrite	14
Quadro 1	–	Mediadores e vias neurais envolvidos na dor osteoartrítica.....	15
Figura 5	–	Classificação radiográfica da osteoartrite segundo a escala de Kellgren e Lawrence	17

RESUMO

O ambroxol é um agente mucolítico amplamente empregado no tratamento de doenças respiratórias, entretanto, evidências na literatura indicam propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e imunomoduladoras, sugerindo potencial para reposicionamento terapêutico. Nesse contexto, esta tese integrou uma revisão sistemática da literatura e um estudo experimental com o objetivo de investigar os mecanismos de ação e os efeitos terapêuticos do ambroxol em modelos experimentais de doenças não pulmonares, com ênfase na osteoartrite (OA). Inicialmente, foi realizada uma revisão sistemática registrada na Open Science Framework (OSF), conduzida conforme a estratégia PICO e as recomendações PRISMA, incluindo buscas nas bases PubMed/MEDLINE, Embase e Scopus. Dos 353 estudos identificados, oito preencheram os critérios de elegibilidade. A revisão evidenciou que o ambroxol exerce efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antinociceptivos em diferentes modelos experimentais não pulmonares, promovendo redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), aumento da atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutatona), diminuição do estresse oxidativo, melhora de alterações histológicas e atenuação da dor por mecanismos relacionados, entre outros, ao bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, reforçando seu potencial para o reposicionamento terapêutico. Em seguida, foi desenvolvido um estudo experimental QUE avaliou os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios do ambroxol em um modelo experimental de osteoartrite. Ratos Wistar machos adultos tiveram a OA induzida no dia zero (D0) por monoiodoacetato de sódio (MIA) e foram distribuídos nos seguintes grupos: Sadio, Controle negativo (CTRL-) e tratados com meloxicam (2mg/kg) ou ambroxol (10, 50 e 100 mg/kg). Os tratamentos foram administrados por via oral (gavagem) uma vez ao dia durante 28 dias. Foram realizados testes comportamentais, incluindo Rotarod, Análise da Marcha em Passarela, Weight Bearing, Von Frey, Rat Grimace Scale e análise radiográfica, histopatológica e quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-10). O tratamento com ambroxol promoveu melhora dos parâmetros nociceptivos e da função motora, além de reduzir os escores radiográficos e histopatológicos com desempenho comparável ao meloxicam em diversos testes. Houve redução expressiva de IL-1 β e IL-6, enquanto a IL-10 apresentou níveis menores nos grupos tratados com ambroxol, sugerindo controle precoce da resposta inflamatória. Em conjunto, os achados da revisão sistemática e do estudo experimental demonstram que o ambroxol apresenta ações anti-inflamatórias, antioxidantes e antinociceptivas consistentes, além de atenuar alterações estruturais articulares associadas à osteoartrite. Esses resultados reforçam o potencial do ambroxol como candidato ao reposicionamento terapêutico na osteoartrite. Estudos adicionais são necessários para esclarecer com maior precisão seus mecanismos de ação, definir as melhores doses e o tempo de uso, bem como viabilizar a translação para modelos clínicos.

Palavras-chave: Ambroxol; Reposicionamento de fármacos; Osteoartrite experimental; Inflamação; Dor crônica.

ABSTRACT

Ambroxol is a mucolytic agent widely used in the treatment of respiratory diseases; however, evidence from the literature has demonstrated its anti-inflammatory, analgesic, and immunomodulatory properties, suggesting its potential for drug repurposing. In this context, this thesis integrated a systematic review and an experimental study to investigate the mechanisms of action and therapeutic effects of ambroxol in experimental models of non-pulmonary diseases, with an emphasis on osteoarthritis (OA). Initially, a systematic review was conducted, registered in the Open Science Framework (OSF), following the PICO strategy and PRISMA guidelines, with searches performed in the PubMed/MEDLINE, Embase, and Scopus databases. Of the 353 studies identified, eight met the eligibility criteria. The review demonstrated that ambroxol exerts anti-inflammatory, antioxidant, and antinociceptive effects in different non-pulmonary experimental models by reducing pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6), increasing the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, and glutathione), decreasing oxidative stress, improving histopathological changes, and attenuating pain through mechanisms related, among others, to the blockade of voltage-gated sodium channels, thereby reinforcing its potential for drug repurposing. Subsequently, an experimental study was conducted to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effects of ambroxol in an experimental model of osteoarthritis. Adult male Wistar rats underwent OA induction on day zero (D0) by intra-articular injection of monosodium iodoacetate (MIA) and were allocated into the following groups: Healthy, Negative Control (CTRL-), Meloxicam (2 mg/kg), and Ambroxol (10, 50, and 100 mg/kg). Treatments were administered orally by gavage once daily for 28 days. Behavioral assessments included the Rotarod test, Gait Analysis, Weight Bearing test, Von Frey test, and Rat Grimace Scale, in addition to radiographic and histopathological evaluations and quantification of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and IL-10). Ambroxol treatment significantly improved nociceptive parameters and motor function, while reducing radiographic and histopathological scores, showing performance comparable to meloxicam in several outcomes. Marked reductions in IL-1 β and IL-6 levels were observed, whereas IL-10 levels were lower in the ambroxol-treated groups, suggesting an earlier resolution of the inflammatory response. Taken together, the findings from the systematic review and the experimental study demonstrate that ambroxol exhibits consistent anti-inflammatory, antioxidant, and antinociceptive properties, in addition to attenuating structural joint damage associated with osteoarthritis. These findings reinforce the potential of ambroxol as a candidate for drug repurposing in osteoarthritis. Further studies are required to better elucidate its mechanisms of action, establish the optimal dosage regimen and treatment duration, and support the translation of these findings into clinical studies.

Keywords: Ambroxol; Drug repositioning; Experimental osteoarthritis; Inflammation; Chronic pain.

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) caracteriza-se principalmente pela perda progressiva da mobilidade e aumento da incapacidade física, decorrentes da dor crônica associada aos processos inflamatórios de baixo grau e à degeneração da cartilagem articular. Essa doença atinge especialmente articulações que suportam maior carga mecânica, como joelhos e quadris, impactando diretamente a qualidade de vida dos pacientes (Kolasinski *et al.*, 2020; Pires *et al.*, 2024).

O manejo terapêutico da OA tem como objetivos fundamentais o alívio da dor, o controle da inflamação de baixo grau e a prevenção de alterações estruturais que resultem no surgimento da OA radiográfica. Nesse contexto, utilizam-se intervenções não farmacológicas incluindo fisioterapia, terapia ocupacional, perda de peso e exercícios, além de abordagens cirúrgicas e farmacológicas, que incluem analgésicos, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), esteroides e ácido hialurônico. Entre essas opções, os AINEs e os inibidores seletivos da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), são os mais frequentemente empregados devido à sua ação na redução das prostaglandinas inflamatórias. No entanto, esses medicamentos são frequentemente associados a efeitos adversos significativos, incluindo complicações cardiovasculares e gastrointestinais (Bannuru *et al.*, 2019; Kolasinski *et al.*, 2020).

O ambroxol (ABX), também denominado trans-4-(2-amino-3,5-dibromobenzilamino)-cicloexanol, é um composto orgânico que corresponde ao principal metabólito ativo da bromexina. Inicialmente registrado e utilizado em 1978 por um dos Estados-Membros da União Europeia, para o tratamento de infecções agudas e distúrbios crônicos do trato respiratório. Devido às suas reconhecidas propriedades mucoativas e secretolíticas, o ambroxol tem sido amplamente empregado na prática clínica no manejo de doenças respiratórias. Mais recentemente, surgiu como candidato promissor ao reposicionamento farmacológico, visando novas aplicações terapêuticas além de seu uso convencional (Cazan *et al.*, 2018; Russo *et al.*, 2023).

A modificação estrutural do ambroxol, com a adição de um grupo hidroxila em posição para-trans do anel ciclohexil e a retirada de um grupo metil conferiram propriedades farmacológicas adicionais em relação a bromexina, incluindo ação anti-inflamatória, analgésica local, antioxidante, antimicrobiana e efeitos estimulantes do surfactante. Mesmo em altas doses, o ambroxol apresenta um perfil de segurança bem estabelecido e baixo risco de efeitos adversos, fato refletido em sua ampla utilização clínica e disponibilidade como medicamento isento de

prescrição em diferentes países, inclusive no Brasil (Barbosa *et al.*, 2023; Bouscary *et al.*, 2020; Brasil, 2021; Calefi *et al.*, 2022; Gupta, 2010; Mullin *et al.*, 2020; Russo *et al.*, 2023).

Diante das limitações terapêuticas atuais, há necessidade de alternativas farmacológicas mais eficazes e seguras, capazes de modificar a evolução natural da osteoartrite. No entanto, o desenvolvimento de novos fármacos é um processo complexo, oneroso e demorado, apresentando uma taxa extremamente baixa de sucesso. Estima-se que a cada 100 medicamentos que ingressam a fase I dos ensaios clínicos, apenas cerca de 11% chegam à aprovação para uso terapêutico. Assim, o reposicionamento de medicamentos desponta como uma estratégia promissora, ágil e economicamente viável para o desenvolvimento de novas terapias (Kuswanto; Baker, 2024; Pinzi; Bisi; Rastelli, 2024; Pushpakom *et al.*, 2018).

Esse processo, também conhecido como reutilização medicamentosa, busca identificar novas finalidades clínicas para um medicamento previamente aprovado, para além da sua indicação original, diminuindo assim os custos e riscos associados ao desenvolvimento de novas terapias. Por conta disso, essa abordagem tem despertado crescente interesse tanto da indústria farmacêutica quanto da comunidade científica (Pinzi; Bisi; Rastelli, 2024; Pushpakom *et al.*, 2018).

Considerando a crescente demanda por alternativas terapêuticas no tratamento da osteoartrite, este estudo propõe investigar o amboxol como alternativa ao reposicionamento medicamentoso. Para isso, foram avaliadas suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas em um modelo experimental de osteoartrite induzida por monoiodoacetato de sódio em ratos, por meio de testes comportamentais, análises radiográficas, histológicas e avaliação imunológica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Osteoartrite (OA)

A OA é uma doença articular crônica e heterogênea, caracterizada por dor, rigidez e perda progressiva da função articular, resultado da degeneração das estruturas articulares. Essas alterações incluem comprometimento da integridade da cartilagem articular, com perda focal nas articulações sinoviais, associada a modificações no osso subcondral, como esclerose, hipertrofia com formação de osteófitos e espessamento da cápsula articular (Abramoff; Caldera, 2020; Coaccioli *et al.*, 2022; Mobasher; Batt, 2016).

Considerada a forma mais comum de doença articular crônica, sua prevalência tem aumentado globalmente, impulsionada pelo aumento da longevidade populacional e obesidade em escala global. Em 2017, estimou-se que aproximadamente 303,1 milhões de pessoas no mundo apresentavam osteoartrite sintomática de joelho e quadril, radiologicamente confirmada, o que representa uma prevalência global de cerca de 4,0% da população mundial. Essa condição foi mais prevalente entre as mulheres e aumentou progressivamente com a idade, atingindo seu pico na faixa etária acima de 95 anos (Coimbra; Plapler; Campos, 2019; Safiri *et al.*, 2020).

Além de sua elevada prevalência, a OA representa um importante desafio para os sistemas de saúde pública, sendo classificada como a segunda doença que mais causa incapacidade entre os indivíduos acometidos (Mandl, 2019; Sun *et al.*, 2019). Embora mais comum em pessoas de meia-idade e idosos, estudos recentes evidenciam um aumento significativo de casos entre adultos jovens em idade economicamente ativa. Entre 1990 e 2021, houve um crescimento de 116,16% do número de casos de OA nessa população, com impacto econômico significativo: em 2021, os custos globais atribuídos à OA totalizaram aproximadamente US\$ 350 bilhões, dos quais US\$ 165 bilhões corresponderam a custos médicos diretos e US\$ 185 bilhões a perdas de produtividade, representando 0,32% do Produto Interno Bruto (PIB) global (Luo *et al.*, 2024; Ma *et al.*, 2025).

Essa tendência amplia ainda mais o impacto socioeconômico da doença, devido sua evolução crônica e progressiva, que pode culminar na necessidade de substituição da articulação afetada, tal desfecho implica em altos custos ao sistema de saúde. Além disso, impõe significativa sobrecarga aos sistemas de seguridade social, com impacto direto na capacidade de trabalho, levando a afastamentos prolongados, perda do emprego e aposentadoria precoce (Abramoff; Caldera, 2020; Ma *et al.*, 2025; Safiri *et al.*, 2020).

Com o envelhecimento populacional e o aumento da expectativa de vida, estima-se que a prevalência da OA continue a crescer significativamente nas próximas décadas, com projeções que apontam para cerca de 1 bilhão de casos até 2050, consolidando-se como uma endemia global (Ma *et al.*, 2025; Mandl, 2019; Safiri *et al.*, 2020; Steinmetz *et al.*, 2023). Entre as articulações mais acometidas estão os joelhos, coluna lombar e coluna cervical, mãos e quadris. Dentre essas, os quadris e os joelhos são considerados os principais locais de acometimento em articulações de carga, sendo responsáveis pelos quadros mais expressivos de limitação funcional (Safiri *et al.*, 2020).

A osteoartrite de joelho figura entre as formas mais prevalentes de OA em todo o mundo, o que é atribuído à alta exposição dessa articulação a traumas diretos e indiretos, ao suporte de carga corporal e ao crescente sedentarismo e obesidade populacional. Em 2021, estimaram-se aproximadamente 374,74 milhões de casos globais, evidenciando o impacto epidemiológico da condição (Ren; Yang; Hu, 2025; Savvari *et al.*, 2024).

Estudos populacionais corroboram essa tendência. Nos Estados Unidos, dados do *National Health Interview Survey* estimaram cerca de 14 milhões de pessoas com OA de joelho, sendo a maior incidência na faixa etária entre 45 e 64 anos, embora a prevalência absoluta seja mais elevada entre pessoas acima de 64 anos (Deshpande *et al.*, 2016). Em ex-atletas, a prevalência pode chegar a 30%, sugerindo que a prática esportiva intensa e crônica representa um fator de risco relevante (Madaleno *et al.*, 2018).

No contexto europeu-asiático, levantamento da Sociedade Espanhola de Reumatologia revelou que 29,35% dos indivíduos acima de 40 anos apresentavam OA sintomática, sendo a coluna lombar (15,52%) e o joelho (13,83%) as localizações mais acometidas, com predomínio entre as mulheres (Blanco *et al.*, 2021). De forma semelhante, em uma metanálise conduzida na China, incluindo 21 estudos publicados entre 2000 e 2018, os resultados apontaram uma prevalência semelhante à do estudo espanhol, com maior ocorrência de OA lombar (25,03%), seguida do joelho (21,51%), afetando predominantemente o sexo feminino (Sun *et al.*, 2019).

No Brasil, a osteoartrite (OA) ocupa a terceira posição entre as doenças mais frequentemente relacionadas à concessão de benefícios pela Previdência Social, sendo responsável por aproximadamente 65% das aposentadorias por invalidez. Estudo nacional conduzido com indivíduos acima de 25 anos revelou uma prevalência de OA de 33%, com predomínio de acometimento na articulação do joelho (45%), especialmente entre mulheres (59,8%). Também evidenciou que 63,7% dos participantes tinham mais de 60 anos, 46% eram obesos (índice de massa corporal $> 30 \text{ kg/m}^2$) e, de forma significativa, três quartos da amostra

apresentavam excesso de peso, enquanto quase metade eram sedentários (Coimbra; Plapler; Campos, 2019).

A literatura evidencia que o envelhecimento populacional está fortemente associado ao desenvolvimento e à progressão da osteoartrite, tanto nas formas radiológicas quanto sintomáticas. Além disso, fatores como obesidade, traumas prévios e atividades que impõem sobrecarga ao sistema musculoesquelético são reconhecidos como elementos de risco para a doença. Com o aumento da expectativa de vida, projeta-se um crescimento expressivo na incidência de osteoartrite, especialmente em países em desenvolvimento, onde o impacto sobre os sistemas de saúde tende a ser ainda mais significativo. Cabe destacar que intervenções terapêuticas como a artroplastia total apresentam custos elevados, o que limita o acesso em contextos de maior vulnerabilidade socioeconômica. Ademais, por sua natureza progressiva e potencial incapacitante, a osteoartrite configura-se como um relevante problema de saúde pública (Kloppenburg; Namane; Cicuttini, 2025; Steinmetz *et al.*, 2023).

2.1.1 Anatomia e fisiologia da articulação sinovial

A osteoartrite é uma doença multifatorial cuja etiologia ainda não está completamente definida. No entanto, sabe-se que diversos fatores de risco contribuem para sua patogênese, incluindo idade, predisposição genética, obesidade, gênero, distúrbios biomecânicos (como genu varo e genu valgo), traumas articulares, artrites inflamatórias e estresse articular crônico, entre outros (Kloppenburg; Namane; Cicuttini, 2025; Steinmetz *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2019).

Essa condição acomete preferencialmente as articulações sinoviais ou diartrodiais, que são estruturas altamente móveis, localizadas entre os ossos, e responsáveis por sua mobilidade e flexibilidade. São formadas por osso subcondral, cartilagem articular, membrana sinovial e líquido sinovial, sendo todas envolvidas por uma cápsula articular (Figura 1). Dependendo de sua função e localização, algumas ainda possuem estruturas adicionais, como tecido labral, ligamentos interósseos, meniscos e coxins adiposos (Juneja; Munjal; Hubbard, 2025).

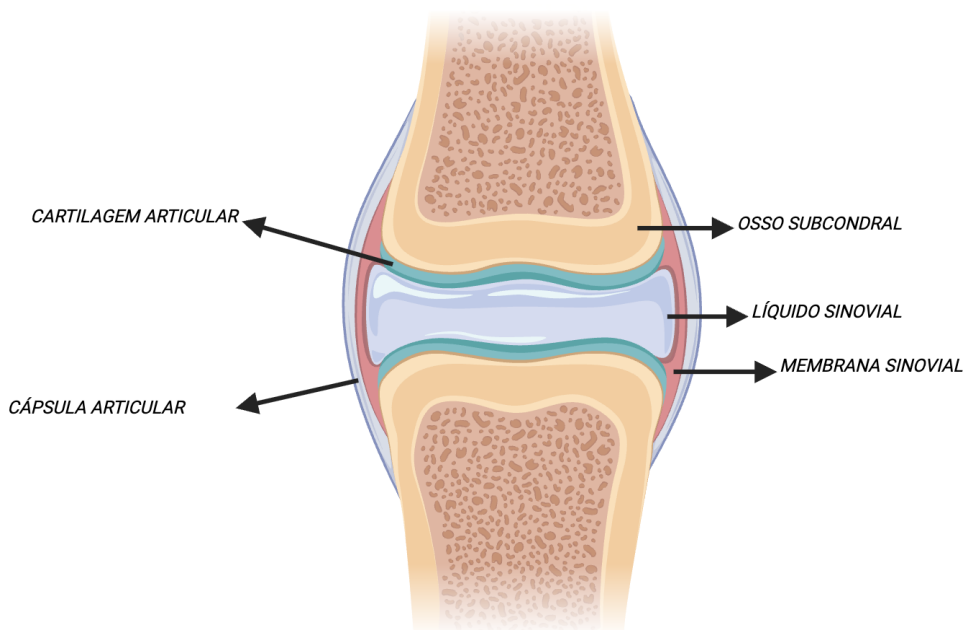


Figura 1 – Representação esquemática de uma articulação sinovial

Nota: Evidenciando cápsula articular, cartilagem hialina, osso subcondral, líquido sinovial e membrana sinovial.

Fonte: Autoria própria, em 2025.

A cartilagem articular é um tipo especializado de tecido conjuntivo presente nas superfícies articulares, composta principalmente por cartilagem hialina. Este tecido se caracteriza por ser avascular, aneural e alinfático, o que contribui para sua baixa capacidade regenerativa. É constituída por cerca de 5% de condrócitos, células responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular (MEC), e por 95% de água e MEC, desempenhando a função de mola biológica aos resistir e distribuir cargas mecânicas (Juneja; Munjal; Hubbard, 2025; Junqueira; Carneiro, 2017).

A matriz extracelular é composta predominantemente por colágeno tipo II, responsável pela resistência à tração, e por proteoglicanos, sendo o mais importante o agregano, que se liga ao ácido hialurônico conferindo resistência à compressão. Em menores quantidades, estão presentes ao menos dez colágenos adicionais, como os tipos III, VI, IX, X, XI e XIII, que atuam na estabilização da matriz e na conexão das fibrilas entre si (Juneja; Munjal; Hubbard, 2025; Junqueira; Carneiro, 2017; Velosa; Teodoro; Yoshinari, 2003).

Além disso, há presença de glicosaminoglicanos (GAGs), como sulfato de condroitina e queratan sulfato, que atuam na retenção de água, conferindo hidratação, elasticidade e capacidade de absorção de impactos. Entre 65 a 80% do peso da cartilagem corresponde à água, essencial para a nutrição dos condrócitos, uma vez que a cartilagem é avascular, e para a resistência mecânica, atuando como meio de transmissão de carga. Por fim, as glicoproteínas multiadesivas, como fibronectina, tenascina e osteonectina desempenham

papel importante na adesão celular e na regulação de processos como migração celular (Juneja; Munjal; Hubbard 2025; Junqueira; Carneiro, 2017; Velosa; Teodoro; Yoshinari, 2003).

O osso subcondral localiza-se imediatamente abaixo da cartilagem articular e é composto por duas estruturas principais: a placa óssea subcondral, compacta, calcificada e porosa, rica em vasos sanguíneos e terminações nervosas, que separa a cartilagem do osso trabecular; e a região trabecular subcondral, de natureza esponjosa, altamente vascularizada e innervado, que passa por remodelação contínua em resposta às cargas mecânicas articulares. Essa estrutura exerce funções fundamentais de suporte biomecânico da articulação e na nutrição indireta da cartilagem. Alterações microambientais no osso subcondral podem comprometer de forma significativa o metabolismo e a integridade estrutural da cartilagem sobrejacente (Hu *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2021).

A membrana sinovial reveste internamente a cápsula articular e atua como principal barreira de transporte de moléculas entre o líquido sinovial e o plasma, desempenhando um papel essencial na homeostase do microambiente articular. É composta por sinoviócitos do tipo A, semelhantes a macrófagos, responsáveis pela fagocitose de detritos celulares e elementos apoptóticos e imunovigilância; e os do tipo B, semelhantes a fibroblastos, responsáveis pela síntese de componentes da matriz extracelular e pela secreção de elementos fundamentais do líquido sinovial, como o ácido hialurônico e a lubrificina. Além de promoverem a lubrificação e manutenção da viscosidade do líquido sinovial, os sinoviócitos tipo B participam ativamente na remodelação e sustentação do tecido conjuntivo intra-articular, produzindo moléculas como fibronectina, proteoglicanos e metaloproteinases da matriz (MMPs) (Iwanaga *et al.*, 2000; Junqueira; Carneiro, 2017; Pellicore *et al.*, 2023).

O líquido sinovial, por sua vez, é indispensável à biomecânica articular, atuando na lubrificação, na nutrição dos condrócitos e no transporte de metabólitos e mediadores bioativos, ele é composto de plasma ultrafiltrado enriquecido com ácido hialurônico, lubrificina, citocinas, enzimas, proteínas plasmáticas e leucócitos em baixa quantidade (Junqueira; Carneiro, 2017; Pellicore *et al.*, 2023; Seidman; Limaem, 2023).

Na cartilagem normal, os condrócitos são as únicas células residentes e desempenham papel essencial na homeostase tecidual, coordenando a síntese e a degradação dos componentes da MEC, como colágeno tipo II e agrecano. Essa reciclagem ocorre por mediação enzimática, envolvendo proteases como as MMPs, sendo elas colagenase, gelatinase e estromelina, e as *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs* (ADAMTs) como as agrecanases, reguladas por seus inibidores endógenos *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs), de forma a evitar perda ou acúmulo excessivo de tecido. A manutenção do equilíbrio da MEC depende da ação de fatores de crescimento, como o Fator de

Crescimento transformador Beta (*Transforming Growth Factor-beta* – TGF- β) e o Fator de Crescimento Análogo a Insulina tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor 1* – IGF-1), que promovem a anabolia cartilaginosa. Por outro lado, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), favorecem o catabolismo e a degradação tecidual, contribuindo para processos degenerativos como a osteoartrite (Figura 2) (Chen *et al.*, 2021; Du *et al.*, 2023; Nahian; Sapra, 2023).

Os fatores de crescimento, como o IGF-1 e o TGF- β , estimulam a síntese de agregano, rico em proteoglicanos, e de colágeno. A degradação dos proteoglicanos é mediada por enzimas celulares autolíticas, incluindo proteases ácidas, glicosidases e sulfatases. A IL-1, uma proteína produzida pelas células mononucleares da sinóvia e pelo condrócito, media a liberação de collagenase e proteases que degradam proteoglicanos. O TNF possui uma atividade semelhante, mas tem um efeito sobre os condrócitos menos potente que o da IL-1. O papel da IL-6 na OA ainda é incerto. *In vivo*, essas citocinas ativam linfócitos B e T, o que pode contribuir para as alterações sinoviais observadas na OA. Vale ressaltar que a cartilagem contém inibidores teciduais de metaloproteases, que inibem as atividades da collagenase e estromelisina (Figura 2) (Chen *et al.*, 2021; Cruz *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2023; Nahian; Sapra, 2023; Rezende *et al.*, 2000).

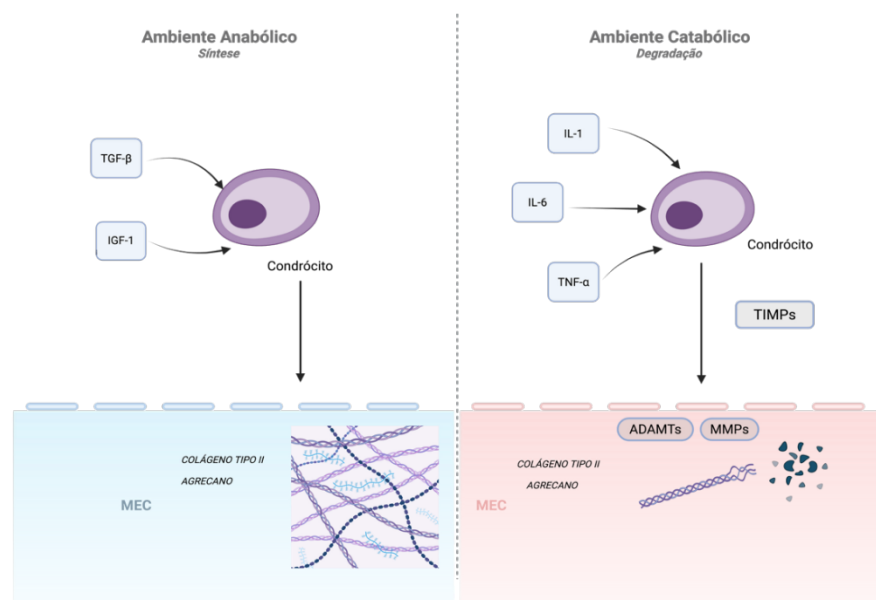


Figura 2 – Representação esquemática do balanço anabólico e catabólico da cartilagem articular
 Nota: Evidenciando fatores de crescimento (TGF- β , IGF-1) e citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α) na regulação da matriz extracelular
 Fonte: Autoria própria, em 2025.

2.1.2 Fisiopatologia da osteoartrite

Como mencionado, a osteoartrite é uma condição multifatorial que resulta do desequilíbrio entre os processos de degradação e regeneração da cartilagem, sendo influenciada por fatores biomecânicos, inflamatórios, genéticos e metabólicos. Caracteriza-se pela deterioração progressiva da cartilagem articular, remodelação do osso subcondral, inflamação da membrana sinovial e alterações nos tecidos periarticulares. Dentre essas estruturas, a cartilagem articular é a mais acometida, desempenhando papel central na fisiopatologia da doença (Mobasheri; Batt, 2016; Nahian; Sapra, 2023).

Embora o evento inicial da degradação cartilaginosa ainda não esteja claramente estabelecido, sabe-se que a cartilagem articular possui baixa capacidade regenerativa por ser avascular, aneural e alinfática. Nesse contexto, traumas articulares ou sobrecargas mecânicas repetitivas podem induzir microfraturas no osso subcondral, promovendo instabilidade articular. Outro fator relevante é o envelhecimento tecidual, que favorece a instalação da senescência celular, caracterizada pela interrupção permanente do ciclo celular de condrócitos e sinoviócitos, que deixam de proliferar em resposta a estresses mecânicos, inflamatórios e oxidativos, mantendo-se metabolicamente ativos e secretando mediadores inflamatórios e enzimas degradativas, o que reduz a capacidade regenerativa e compromete a integridade da matriz extracelular. Essas alterações estruturais culminam na ativação de condrócitos e sinoviócitos, intensificando a liberação de interleucinas e proteases, o que contribui para a progressão do processo degenerativo articular (Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019; Mobasheri; Batt, 2016; Nahian; Sapra, 2023).

A resposta inflamatória na OA é amplamente impulsionada por três citocinas pró-inflamatória: a interleucina-1 beta (IL-1 β), o TNF- α e a IL-6. Essas moléculas são produzidas principalmente por condrócitos e sinoviócitos ativados em resposta a microlesões da cartilagem e do osso subcondral, mas podem também ser produzidas por macrófagos e osteoblastos. Além delas, outras interleucinas como IL-5, IL-17, IL-18 e IL-21 também participam da cascata inflamatória, embora com menor protagonismo. Em contraposição, citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13 são expressas como mecanismos compensatórios na tentativa de modular essa inflamação crônica, ainda que, na maioria dos casos, sua atuação seja insuficiente para reverter o processo degenerativo (Kapoor *et al.*, 2010; Wojdasiewicz; Poniatowski; Szukiewicz, 2014).

Após a ativação inicial, os condrócitos passam a exibir um fenótipo catabólico, marcado pela produção contínua de citocinas pró-inflamatórias, especialmente Interleucina-1

beta (IL-1 β), TNF- α e, subsequentemente, IL-6. As citocinas IL-1 β e TNF- α exercem papel central na fisiopatologia da osteoartrite ao estimularem a expressão de enzimas proteolíticas, como as MMPs: colagenase-1 (Matrix Metaloproteinase-1 – MMP-1), que degrada o colágeno tipo II; estromelisina-1 (Matrix Metaloproteinase-3 – MMP-3), que cliva proteoglicanos e ativa outras MMPs; colagenase-3 (Matrix Metaloproteinase-13 – MMP-13), considerada a principal responsável pela degradação do colágeno tipo II na cartilagem hialina. Paralelamente, as agrecanases do grupo ADAMTs, em especial ADAMTs-4 (agrecanase-1) e ADAMTs-5 (agrecanase-2), atuam na clivagem do agrecano, principal proteoglicano da cartilagem. A ação combinada de MMPs e ADAMTs compromete diretamente a integridade da matriz extracelular, comprometendo suas propriedades biomecânicas e acelerando o processo degenerativo articular (Figura 3) (Goldring; Otero, 2011; Kapoor *et al.*, 2010; Mobasheri *et al.*, 2017; Qian *et al.*, 2024; Wojdasiewicz; Poniatowski; Szukiewicz, 2014).

Além disso, IL-1 β e TNF- α perpetuam o estado inflamatório ao induzirem a produção de IL-6 pelos próprios condrócitos. Embora a IL-6 não esteja diretamente implicada na degradação estrutural da cartilagem, ela participa ativamente da manutenção da inflamação crônica, modulando o desequilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos e contribuindo para o desenvolvimento de sinovite, principalmente pela indução de MMPs e ADAMTs. A interação dessas citocinas cria um microambiente intra-articular hostil, marcado por degradação progressiva da cartilagem, inflamação persistente e falência dos mecanismos de reparo tecidual, favorecendo a cronicidade do processo degenerativo (Figura 3) (Goldring; Otero, 2011; Kapoor *et al.*, 2010; Mobasheri *et al.*, 2017; Qian *et al.*, 2024; Wojdasiewicz; Poniatowski; Szukiewicz, 2014).

Além da ação direta das citocinas pró-inflamatórias sobre os condrócitos e da indução de enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular, a osteoartrite é marcada por um desequilíbrio entre os mecanismos redox intracelulares, caracterizando um quadro de estresse oxidativo. Condrócitos estimulados por IL-1 β e TNF- α aumentam a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e enzimas da família nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) oxidase, responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas moléculas, quando produzidas em excesso, promovem dano mitocondrial, peroxidação lipídica, apoptose condrocitária e intensificam a expressão IL-1 β e TNF- α , agravando a destruição da cartilagem articular, assim, os condrócitos são a fonte e alvo das citocinas pró-inflamatórias na OA. Além disso, o acúmulo de ROS e NO prejudica a síntese de colágeno tipo II e agrecano, comprometendo a manutenção da matriz extracelular (Figura 3) (Ansari; Ahmad; Haqqi, 2020).

Paralelamente, a estimulação inflamatória induzida por IL-1 β e TNF- α promove a ativação da via do ácido araquidônico, através da ativação da fosfolipase A2 (PLA2), responsável por clivar os fosfolipídios da membrana celular dos condrócitos e sinoviócitos, liberando assim o ácido araquidônico (AA). Uma vez liberado o AA pode ser metabolizado por duas vias principais: a ciclooxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX) (Figura 3) (Choi *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021).

Na OA, os condrócitos, sinoviócitos e células da membrana sinovial estimulam a expressão da COX-2. Esta enzima catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandina E2 (PGE2). Esta, por sua vez, atua localmente promovendo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos e sensibilização de terminações nervosas, contribuindo para a dor articular crônica, além de prejudicar o metabolismo condral, ao inibir a síntese de colágeno tipo II e agrecano, ao estimular a produção de MMPs e ADAMTs (Figura 3) (Choi *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2022; Min *et al.*, 2021).

Adicionalmente, na membrana sinovial, a COX-2 induzida favorece a produção contínua de PGE2, contribuindo para manutenção da sinovite crônica, dor articular persistente e degradação progressiva da matriz extracelular. Por fim, no osso subcondral, a via do ácido araquidônico através da PGE2 age na diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos funcionais levando a um aumento da reabsorção óssea que colaboram com a progressão da doença (Figura 3) (Jiang *et al.*, 2022; Pelletier; Martel-Pelletier; Abramson, 2001).

Embora a OA seja predominantemente caracterizada por processos catabólicos e inflamatórios, mecanismos anabólicos também atuam na tentativa de preservar a homeostase articular. Esse eixo anabólico envolve a atuação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o antagonista do receptor de IL-1 β (Antagonista do receptor de interleucina 1 – IL-1Ra), que limitam os efeitos das citocinas pró-inflamatórias e inibem a expressão de MMPs, ADAMTs, síntese de PGE2 e NO pelos condrócitos, minimizando a degradação da matriz da cartilagem. Além disso, enzimas antioxidativas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase, desempenham papel fundamental na neutralização das ROS, reduzindo o estresse oxidativo protegendo a integridade da matriz extracelular. Complementando esse sistema de defesa, os inibidores da via do ácido araquidônico, como as resolvinas, atuam na resolução da inflamação ao bloquear a expressão da COX-2 atenuando a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias como a PGE2. Dessa forma, a ativação do eixo anabólico representa uma resposta compensatória essencial para conter os danos teciduais e favorecer a integridade estrutural da cartilagem articular (Figura 3) (Ansari; Ahmad; Haqqi, 2020; Pelletier; Martel-Pelletier; Abramson, 2001; Sordi; Lima Júnior; Assreuy, 2012).

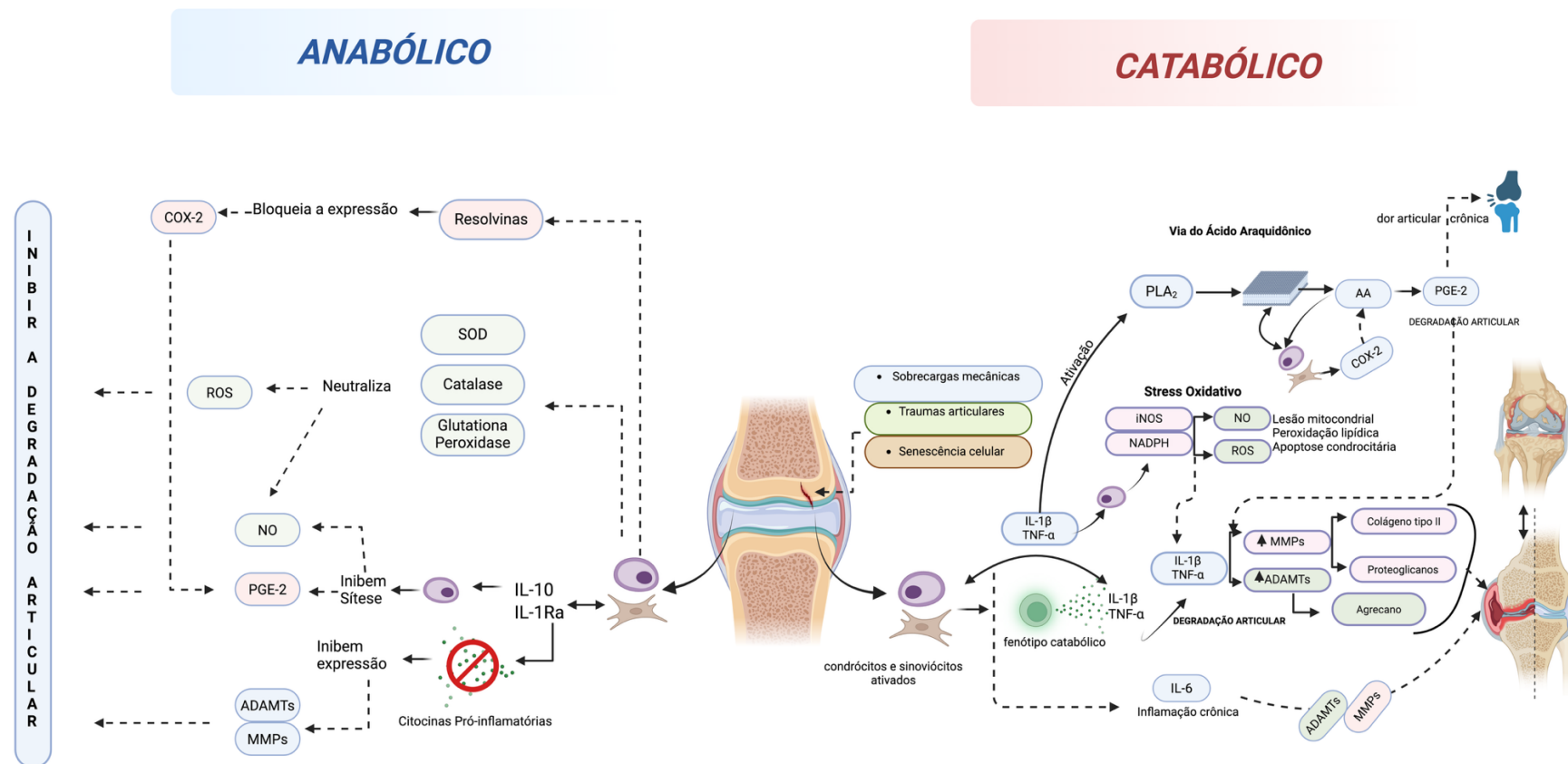


Figura 3 – Mecanismos Anabólicos e Catabólicos na osteoartrite

Nota: Destacando o papel de citocinas, enzimas degradativas, estresse oxidativo e mediadores anti-inflamatórios na regulação da degradação e preservação da cartilagem articular.

Fonte: Autoria própria, em 2025.

No entanto, à medida que a doença progride e esses mecanismos reparadores tornam-se insuficientes, alterações na composição e estrutura da cartilagem articular levam à ativação dos condrócitos em um perfil predominantemente catabólico. Esses condrócitos passam a produzir fatores catabólicos, incluindo enzimas que degradam os proteoglicanos, seguidos pela desorganização da rede de colágeno, o que culmina em fissuras e comprometimento da integridade da cartilagem. Além disso, muitos desses estímulos catabólicos induzem a apoptose condrocitária. Nos estágios avançados da osteoartrite, o aumento expressivo de condrócitos apoptóticos contribui para a intensificação da resposta inflamatória local, agravando a degeneração da cartilagem articular (Mei *et al.*, 2025; Xia *et al.*, 2014).

Diante dessa progressão, é possível categorizar a osteoartrite em três estágios principais, que refletem os eventos estruturais e inflamatórios característicos da evolução da doença. No Estágio I, ocorre a degradação inicial da matriz cartilaginosa por ação proteolítica; no Estágio II, observam-se fibrilação e erosão da superfície da cartilagem, com liberação de fragmentos no líquido sinovial; e, no Estágio III, inicia-se uma resposta inflamatória sinovial mediada pela fagocitose desses produtos pelas células sinoviais, que passam a secretar citocinas pró-inflamatórias e proteases (Martel-Pelletier, 2004).

A OA afeta tanto os tecidos articulares quanto os periarticulares. O osso subcondral torna-se mais rígido, evoluindo para o infarto e levando ao desenvolvimento de cistos subcondrais. As tentativas do corpo de regenerar esse osso resultam em esclerose subcondral e na formação de osteófitos nas margens das articulações, como uma maneira de estabilizar a articulação afetada. A sinovite se manifesta, caracterizando-se por um líquido sinovial mais espesso, de menor viscosidade e em maior volume. Os tendões e ligamentos ao redor das articulações podem desenvolver contraturas e tendinites. Com a redução da mobilidade articular, os músculos ao redor tornam-se mais fracos e oferecem menos suporte. Além disso, meniscos fissurados podem se fragmentar (Figura 4) (Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019; Xia *et al.*, 2014).

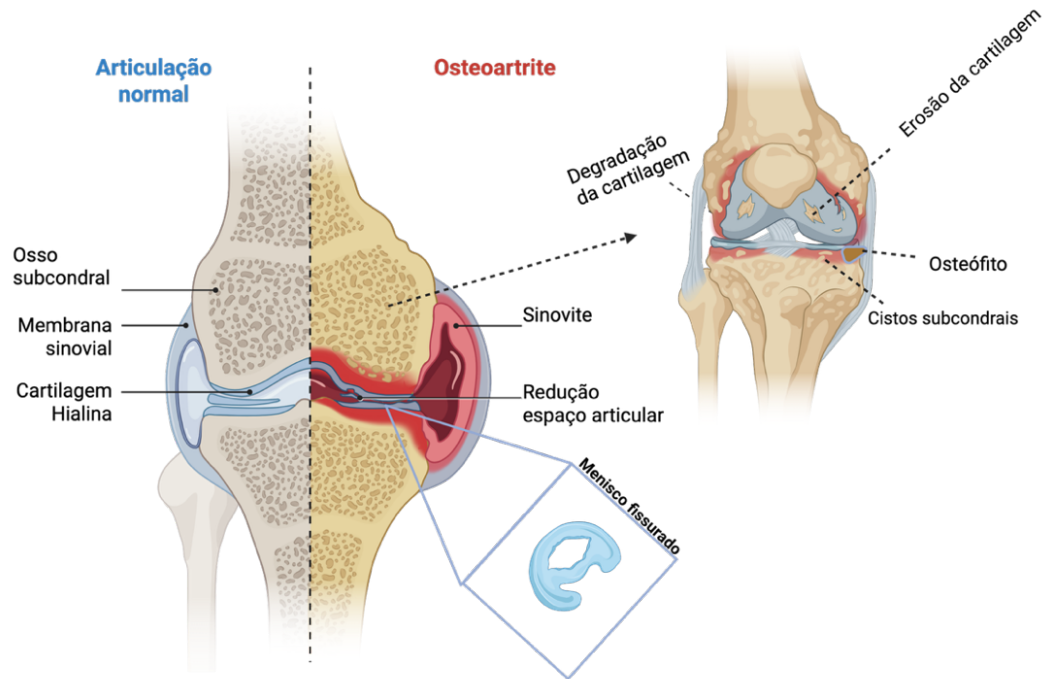


Figura 4 – Alterações estruturais da osteoartrite

Nota: Esclerose e cistos subcondrais, formação de osteófitos, sinovite com alterações do líquido sinovial, comprometimento de tendões, ligamentos e músculos periarticulares, além de degeneração meniscal.

Fonte: Autoria própria, em 2025.

A dor na osteoartrite é resultado de um processo multifatorial que abrange desde mecanismos periféricos até alterações centrais e neuropáticas. Embora a cartilagem articular não seja innervada, estruturas adjacentes como a membrana sinovial, o osso subcondral e os ligamentos são ricamente innervados e constituem importantes fontes de dor. O processo degenerativo articular leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α , PGE2 e bradicinina, os quais ativam nociceptores presentes nas fibras A δ e C, contribuindo para a sensibilização periférica dos neurônios sensoriais (Tabela 1) (Dimitroulas *et al.*, 2014; Ohashi *et al.*, 2023; Vincent; Miller, 2024).

A persistência da estimulação nociceptiva favorece a ativação de mecanismos de sensibilização central. Nesse contexto, ocorre uma plasticidade do sistema nervoso central, caracterizada pela ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e de células da micróglia. Estas, por sua vez, promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias centrais, como IL-6 e TNF- α (Dimitroulas *et al.*, 2014; Ohashi *et al.*, 2023; Vincent; Miller, 2024).

Os receptores NMDA desempenham papel crucial no processo de sensibilização central da dor, ao permitem o influxo de cálcio (Ca²⁺) nos neurônios pós-sinápticos, resultando hiperexcitabilidade neuronal e contribuindo para a manutenção da dor crônica. Essas alterações levam à uma redução do limiar de dor e favorecem o surgimento de manifestações clínicas como alodínia, percepção dolorosa diante de estímulos normalmente indolores, e a hiperalgesia,

resposta exagerada a estímulos nocivos (Tabela 1) (Dimitroulas *et al.*, 2014; Ohashi *et al.*, 2023; Vincent; Miller, 2024).

Com a progressão da doença, pode ocorrer o desenvolvimento da neuropatia secundária à dor. Esse processo está associado à remodelação das terminações nervosas e ao aumento da expressão de canais de sódio dependentes de voltagem, como $\text{Na}_v1.7$ e $\text{Na}_v1.8$, nos neurônios sensoriais do gânglio da raiz dorsal (*Dorsal Root Ganglion* – DRG). Essas alterações indicam o envolvimento de mecanismos neuropáticos na dor osteoartrítica, conferindo-lhe maior complexidade clínica e terapêutica (Quadro 1) (Rahman; Dickenson, 2015).

Fonte da dor	Mediadores envolvidos	Via neural
Membrana sinovial, osso subcondral, cápsula	$\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, PGE_2 , bradicinina	Sensibilização periférica Fibras C e A δ
Estímulo contínuo	Ativação de NMDA, microglia (IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$)	Sensibilização central
Remodelação nervosa	$\text{Na}_v1.7$, $\text{Na}_v1.8$	Neuropatia secundária

Quadro 1 – Mediadores e vias neurais envolvidos na dor osteoartrítica

Nota: Canal de sódio dependente de voltagem 1.7 ($\text{Na}_v1.7$); Canal de sódio dependente de voltagem 1.8 ($\text{Na}_v1.8$).
Fonte: Elaborada pela autora, com base em Dimitroulas *et al.* (2014), Ohashi *et al.*, (2023) e Vincent e Miller, 2024.

Diante das alterações estruturais e inflamatórias que caracterizam a progressão da osteoartrite, torna-se essencial a utilização de métodos diagnósticos que possibilitem a identificação precoce e precisa da doença. A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos orienta a escolha das ferramentas diagnósticas mais adequadas, permitindo a elaboração de um protocolo terapêutico individualizado, centrado nas necessidades específicas de cada paciente (Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019).

2.1.3 Diagnóstico da osteoartrite

O diagnóstico da osteoartrite é baseado primariamente na anamnese e no exame físico. As principais queixas referidas pelos pacientes incluem dor articular, rigidez matinal de curta duração e limitação funcional progressiva. No exame físico, observam-se sinais característicos como crepitação, restrição ou dor à mobilização articular, sensibilidade à palpação e, em alguns casos, derrame articular (Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019; Sen; Hurley, 2023).

A dor é o sintoma predominante da OA, geralmente caracterizada como protocinética, ou seja, dor que surge com o movimento. Costuma ter início insidioso e, nas fases iniciais, tende a melhorar com o repouso. Contudo, em estágios mais avançados, pode persistir mesmo em repouso, tornando-se contínua. A rigidez articular é de curta duração, geralmente aparece após períodos prolongados de repouso e é comumente referida como gelificação. Outros sinais e sintomas incluem crepitação, diminuição da flexibilidade com consequente redução da amplitude dos movimentos articulares, edema (secundário à sinovite ou ao derrame articular) e inflamação dos tecidos moles periarticulares (Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019; Sen; Hurley, 2023).

Embora os exames de imagem sejam úteis para confirmar a hipótese de OA e descartar outras doenças, é importante enfatizar que, nos estágios iniciais da OA, pode não haver alterações visíveis na radiografia. Isso não exclui o diagnóstico da doença. Da mesma forma, a presença de alterações radiológicas não necessariamente confirma que os sintomas relatados pelo paciente sejam devido à OA. Como diagnósticos diferenciais, deve-se considerar outras condições, como bursites e tendinites, entre outras (Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019; Sinusas, 2012).

A radiografia, apesar de suas limitações, especialmente nas fases iniciais da osteoartrite, em que pode apresentar resultados normais mesmo na presença de sintomas, continua sendo o exame de imagem mais frequentemente solicitado na prática clínica. Essa preferência se deve ao seu baixo custo, ampla disponibilidade e simplicidade na execução. Sua principal utilidade é estadiar os danos tardios já estabelecidos na articulação pela osteoartrite (Sinusas, 2012; Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019; Sen; Hurley, 2023).

Os principais sinais radiográficos incluem estreitamento do espaço articular, osteófitos marginais, esclerose subcondral e formação de cistos. A ressonância magnética, embora não seja amplamente utilizada como ferramenta diagnóstica de rotina, é capaz de identificar alterações precoces da OA. A ultrassonografia, por sua vez, pode evidenciar inflamação sinovial, derrame articular e osteófitos, sendo útil na avaliação de aspectos inflamatórios associados à doença (Sinusas, 2012; Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019; Sen; Hurley, 2023).

A classificação mais amplamente usada na avaliação radiográfica da osteoartrite é a escala de Kellgren e Lawrence, que gradua a gravidade das alterações estruturais em cinco níveis, de 0 a 4. O grau 0 indica ausência de sinais radiográficos da doença. O grau 1 corresponde a possíveis osteófitos mínimos, sem alterações visíveis no espaço articular. O grau 2 caracteriza-se por osteófitos bem definidos e possível estreitamento incipiente do espaço

articular. No grau 3, observam-se múltiplos osteófitos, estreitamento moderado do espaço articular, esclerose subcondral e possível deformidade óssea. Já o grau 4 representa osteoartrite severa, com estreitamento acentuado do espaço articular, grandes osteófitos, esclerose subcondral evidente e deformidade óssea significativa. Essa classificação fornece um parâmetro objetivo para o estadiamento da doença, sendo amplamente utilizada tanto na prática clínica quanto em estudos epidemiológicos (Figura 5) (Kohn; Sassoon; Fernando, 2016).

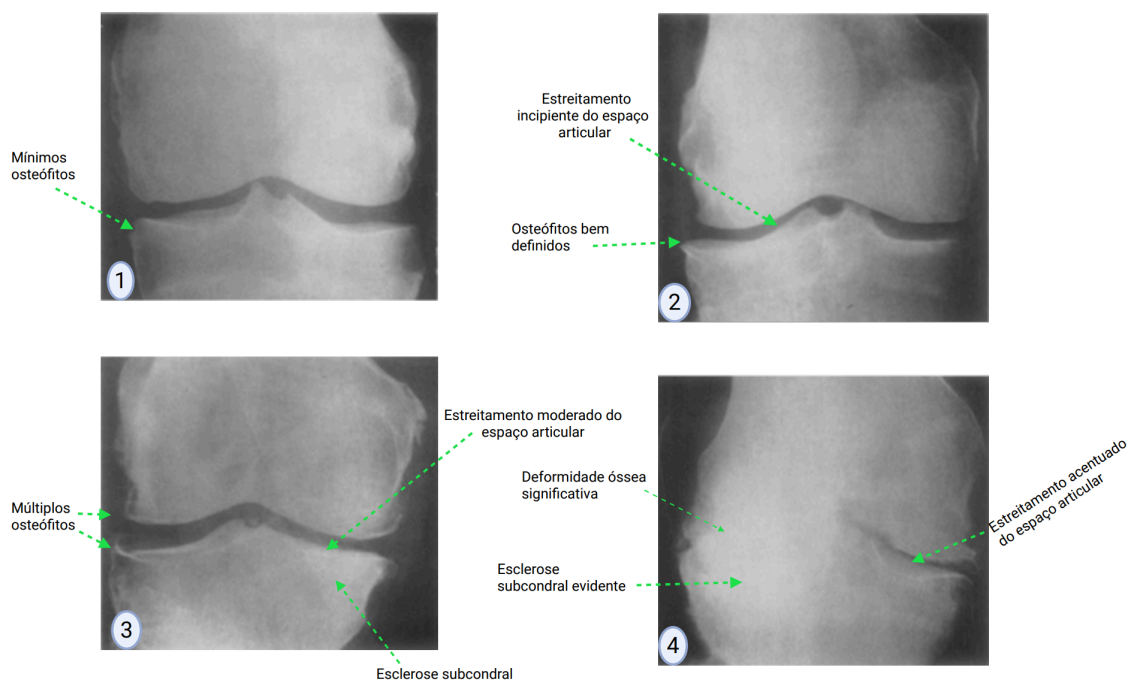


Figura 5 – Classificação radiográfica da osteoartrite segundo a escala de Kellgren e Lawrence
 Nota: Avalia progressivamente a presença de osteófitos, estreitamento do espaço articular, esclerose subcondral e deformidade óssea.

Fonte: Adaptado de Kohn, Sassoon e Fernando (2016).

Dessa forma, a identificação precisa do grau de comprometimento articular, por meio da avaliação clínica e radiográfica, é essencial não apenas para o diagnóstico, mas também para nortear a escolha das estratégias terapêuticas mais adequadas a cada estágio da doença (Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019; Sen; Hurley, 2023).

2.1.4 Tratamento da osteoartrite

O tratamento da OA, por se tratar de uma doença multifatorial com sintomatologia individualizada e originada de diferentes estruturas articulares, apresenta-se como um desafio para o médico. O tratamento adotado visa à melhora da condição clínica, uma vez que, até o

momento, não existem fármacos capazes de curá-la. Os tratamentos disponíveis buscam aliviar a dor, melhorar a qualidade de vida e a mobilidade, além de tentar retardar a progressão da doença (Hunter; Bierma-Zeinstra, 2019; Sen; Hurley, 2023).

O tratamento deve ter uma abordagem escalonada e abrangente, fundamentado em terapias não farmacológicas, farmacológicas e cirúrgicas. Deve-se começar sempre pelas terapias mais seguras e menos invasivas. Os procedimentos cirúrgicos devem ser considerados nos casos refratários ao tratamento conservador (Pires *et al.*, 2024).

Na terapia não farmacológica da OA, é importante abordar o aspecto psicológico, estimular a prática regular de exercícios físicos, promover a perda de peso e encorajar a fisioterapia. Entre as principais estratégias, destacam-se a restrição de atividades que intensifiquem a dor ou sobrecarreguem as articulações, o fortalecimento muscular e o uso de recursos de terapia ocupacional, como órteses, talas, bengalas ou muletas, com o objetivo de redistribuir a carga articular. O uso de bengalas, em especial, tem se mostrado eficaz na osteoartrite de joelho e quadril, ao reduzir o estresse mecânico sobre essas articulações (Kolasinski *et al.*, 2020; Pires *et al.*, 2024).

O tratamento farmacológico da osteoartrite deve ser individualizado, considerando as comorbidades do paciente e priorizando intervenções menos invasivas. As opções terapêuticas incluem formulações orais, tópicas e intra-articulares. A fim de reduzir os efeitos adversos sistêmicos, recomenda-se iniciar a terapia com AINEs de uso tópico. No entanto, a eficácia desses medicamentos pode ser limitada em determinadas regiões anatômicas, como nas mãos, devido à lavagem frequente, e no quadril, em virtude da profundidade da articulação e nem sempre apresentam os mesmos resultados das medicações orais (Kolasinski *et al.*, 2020; Sen; Hurley, 2023).

A terapia medicamentosa oral na osteoartrite inclui analgésicos, AINEs e inibidores seletivos da COX-2. Estes últimos, considerados de primeira escolha no início do tratamento, promovem alívio sintomático de curto prazo, independentemente da localização da doença. Contudo, devido ao risco de efeitos adversos gastrointestinais, renais e cardiovasculares, seu uso deve ser cauteloso, em doses mínimas eficazes e por curtos períodos. Ressalta-se que tais fármacos não modificam a progressão da osteoartrite, atuando apenas no controle da dor (Kolasinski *et al.*, 2020).

Entre as opções farmacológicas adjuvantes para o manejo da osteoartrite, destacam-se as injeções intra-articulares de glicocorticoides. Embora amplamente utilizadas para alívio sintomático, estudos indicam que seu uso repetido pode acelerar a degradação da cartilagem, além de haver incertezas quanto à dose ideal e à duração do efeito terapêutico. O ácido

hialurônico apresenta indicação condicional, reservado a pacientes que não responderam adequadamente às abordagens não farmacológicas, aos AINEs tópicos e orais, ou aos esteroides intra-articulares. No entanto, sua eficácia em comparação ao placebo permanece controversa (Kolasinski *et al.*, 2020; Sen; Hurley, 2023).

O uso de opioides é reservado a casos refratários, em que não há resposta adequada às terapias convencionais e quando a cirurgia não é indicada ou é recusada. Ainda assim, seu uso deve ser criterioso, dado o risco de efeitos adversos significativos, como toxicidade e dependência. Outras intervenções medicamentosas, como a suplementação com vitamina D, têm eficácia limitada, com estudos demonstrando efeitos discretos ou mesmo ausência de benefício clínico na osteoartrite (Kolasinski *et al.*, 2020; Sen; Hurley, 2023).

A combinação de glicosamina e condroitina tem se mostrado segura e moderadamente eficaz no alívio da dor e melhora da função em pacientes com osteoartrite, especialmente em casos leves a moderados. Embora a eficácia da glicosamina isolada ainda seja controversa, a condroitina, isolada ou associada, apresenta respaldo na literatura para uso como adjuvante terapêutico. Considerando a crescente prevalência da doença e seu impacto funcional, essa associação representa uma alternativa promissora, embora ainda demande estudos de maior robustez metodológica (Kolasinski *et al.*, 2020; Velasco; Bioiberica, 2020).

O tratamento cirúrgico da osteoartrite é indicado como última opção terapêutica, para pacientes que não obtiveram sucesso com os tratamentos conservadores, especialmente quando há comprometimento da funcionalidade e perda de independência nas atividades diárias. Entre os procedimentos disponíveis, destacam-se a artroscopia, atualmente desaconselhada devido à ausência de benefícios clínicos superiores ao tratamento conservador; a artroplastia total, indicada em estágios avançados, sendo o padrão-ouro em idosos. Já a artroplastia unicompartimental é recomendada em pacientes jovens e ativos devido aos riscos e à durabilidade limitada da artroplastia total. As osteotomias, como a tibial alta e a fibular proximal, preferidas em pacientes jovens com cartilagem preservada, com o objetivo de realinhar o eixo mecânico e postergar a necessidade de substituição articular (Pires *et al.*, 2024).

Apesar das diversas abordagens disponíveis, o tratamento da osteoartrite permanece centrado no controle da dor e inflamação. Além disso, os fármacos atualmente utilizados apresentam limitações importantes, como efeitos adversos significativos e baixa segurança a longo prazo. Nesse contexto, torna-se essencial explorar novas alternativas terapêuticas (Hunter; Bierma-Zeinstr, 2019; Sen; Hurley, 2023).

2.2 Modelo de osteoartrite induzida por monoiodoacetato (MIA)

O modelo de osteoartrite induzida por MIA é amplamente utilizado em estudos experimentais para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos da OA e a avaliação da eficácia de potenciais agentes terapêuticos. O MIA é um inibidor irreversível da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), essencial para a via glicolítica nos condrócitos. A inibição desta enzima resulta em colapso do metabolismo energético celular, levando à morte dos condrócitos, e posterior degeneração progressiva da cartilagem articular (Morais *et al.*, 2016).

A aplicação intra-articular de MIA, comumente no joelho de ratos ou camundongos, induz alterações estruturais e funcionais compatíveis com as manifestações observadas na OA humana, incluindo perda de matriz cartilaginosa, esclerose óssea subcondral, formação de osteófitos, inflamação sinovial e dor articular persistente (Combe; Bramwell; Field, 2004). Este modelo é particularmente útil por sua reprodutibilidade, simplicidade técnica, baixo custo e capacidade de simular tanto os componentes estruturais quanto os sintomas dolorosos da OA. Além disso, permite estudar com acurácia os mecanismos de dor crônica, incluindo alodínia mecânica e hiperalgesia (Combe; Bramwell; Field, 2004; Horváth *et al.* 2024; Stevenson *et al.*, 2011).

2.3 Ambroxol (ABX)

O cloridrato de ambroxol (2-amino-3,5-dibromo-N-[trans-4-hydroxycyclohexyl] benzylamine) tem sido reconhecido na literatura mundial como um promissor candidato ao reposicionamento medicamentoso. Classificado como uma benzilamina substituída, é o metabólito N-desmetil ativo da bromexina, outro medicamento mucolítico amplamente utilizado e deriva-se sinteticamente da vasicina, composto bioativo da planta *Adhatoda vasica* (Gupta, 2010; Malerba; Ragnoli, 2008; Ullah *et al.*, 2025).

A *Adhatoda vasica* (Adulsa, Malabar Nut), planta de origem asiática, é utilizada na medicina Ayurvédica indiana há séculos para o tratamento de doenças pulmonares. Ela possui uma variedade de alcaloides em suas folhas, sendo o principal a vasicina. Este composto serviu de base para a criação da bromexina, da qual o ambroxol é um metabólito ativo. No entanto, o ABX se destaca por sua superior farmacocinética, eficácia, perfil de segurança e menor incidência de efeitos adversos (Disse; Ziegler, 1987; Malerba; Ragnoli, 2008).

A modificação estrutural da bromexina, com a substituição de um grupo metil por uma hidroxila na posição para-trans do anel cicloexílico, conferiu ao ambroxol uma ampla gama de propriedades farmacológicas. Além de manter seus efeitos mucocinético e mucociliar, o Ambroxol passou a apresentar também potenciais ações antioxidantes, anti-inflamatórias, anestésicas locais, além de efeitos antivirais, antibacterianos e na estimulação de surfactante pulmonar (Gupta, 2010; Kantar *et al.*, 2020; Malerba; Ragnoli, 2008).

A bromexina e o ambroxol foram inicialmente registrados como agentes secretolíticos em Estados-Membros da União Europeia (UE) em 1963 e 1978, respectivamente. Atualmente, esses medicamentos estão autorizados para uso em todos os Estados-Membros da UE, bem como na Noruega e na Islândia, com exceção do Reino Unido. Além disso, estão disponíveis em mais de 50 países ao redor do mundo (European Medicines Agency, 2015; Gupta, 2010).

O ambroxol, quando administrado por via oral, apresenta rápida absorção, com biodisponibilidade aproximada de 80% e concentração plasmática máxima em cerca de duas horas. Está disponível no mercado em múltiplas formulações terapêuticas, incluindo pastilhas, sprays orais, soluções intravenosas, supositórios, xaropes, grânulos, comprimidos, cápsulas, formulações orais de liberação lenta e soluções para nebulização (European Medicines Agency, 2015; Mey *et al.*, 2015; Ollier *et al.*, 2020).

Em 2014, o Comitê de Avaliação de Risco em Farmacovigilância (PRAC) da União Europeia conduziu uma análise de segurança dos medicamentos contendo ambroxol e bromexina, motivada por notificações de reações anafiláticas e reações adversas cutâneas graves (SCARs). Como resultado, as informações de bula foram atualizadas para incluir o risco, ainda que pequeno, de reações alérgicas e SCARs. No entanto, o PRAC concluiu que o perfil risco-benefício do Ambroxol permanece favorável, considerando sua baixa toxicidade e raridade de efeitos adversos. Assim, o fármaco é considerado seguro para uso em humanos, inclusive em crianças, e pode ser adquirido sem prescrição médica (Cazan *et al.*, 2018; European Medicines Agency, 2015).

Diante de sua ampla distribuição, segurança comprovada e diversidade de aplicações, torna-se relevante compreender os mecanismos moleculares que sustentam os efeitos terapêuticos do ambroxol.

2.3.1 Mecanismo de Ação do Ambroxol

O ambroxol, apesar de amplamente utilizado há décadas, ainda apresenta mecanismos de ação pouco explorados. Essa lacuna se deve à complexidade de suas múltiplas interações farmacodinâmicas, o que abre possibilidades promissoras para novos estudos e seu reposicionamento terapêutico (Cazan *et al.*, 2018; Ullah *et al.*, 2025).

Quando administrado de forma oral, o ABX apresenta uma rápida absorção apresentando biodisponibilidade de aproximadamente 79% e alta ligação às proteínas plasmáticas. Os níveis plasmáticos máximos são atingidos entre 1 e 6,5 horas, a depender da formulação, e o fármaco atinge concentrações pulmonares significativamente superiores às plasmáticas. Sua meia-vida de eliminação é de cerca de 10 horas, sendo metabolizado no fígado e excretado por biotransformação oxidativa bifásica em ácido dibromoantranílico e glicuronídeos mediada pelo citocromo P450 3A4 (Disse; Ziegler, 1987; Gupta, 2010; Ponugoti *et al.*, 2024).

Diante de suas múltiplas propriedades farmacológicas e ampla aplicabilidade terapêutica, torna-se pertinente a descrição detalhada dos principais mecanismos de ação atribuídos ao ambroxol.

2.3.1.1 Propriedades mucolíticas, mucocinéticas e surfactantes do ambroxol

O principal efeito farmacológico do ambroxol, e sua principal indicação terapêutica atual, relaciona-se à estimulação da produção de surfactante pulmonar, associada às suas atividades mucocinética e secretolítica (mucolítica). Sua ação secretolítica está vinculada à redução da viscosidade do muco, por meio da despolimerização de fibras polissacarídicas ácidas presentes na secreção brônquica, além da indução à produção de polissacarídeos neutros pelas células glandulares. O ambroxol também estimula a síntese e liberação de surfactante endógeno pelos pneumócitos tipo II. Embora os mecanismos exatos que regulam essa produção ainda não estejam completamente elucidados, sabe-se que envolvem vias celulares complexas e multifatoriais (European Medicines Agency, 2015; Paleari *et al.*, 2011; Ponugoti *et al.*, 2024).

2.3.1.2 Propriedade antioxidante

A atividade antioxidante é fundamental para a manutenção da homeostase celular e a prevenção de danos induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS), como os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH) e o NO. Essas espécies podem ser geradas endogenamente, principalmente nas mitocôndrias durante a respiração celular, ou por fatores exógenos, como

exposição ao fumo e poluentes ambientais. Para neutralizar os efeitos nocivos das ROS, o organismo dispõe de um sistema antioxidante complexo, que inclui enzimas como a SOD, catalase (CAT) e glutathione reduzida (GSH), além de antioxidantes não enzimáticos, como as vitaminas C e E (Palaia *et al.*, 2011; Ponugoti *et al.*, 2024).

Embora amplamente reconhecidos por seus efeitos deletérios, os radicais livres exercem funções fisiológicas essenciais, como a sinalização celular e a defesa imunológica contra patógenos. No entanto, quando sua produção excede a capacidade dos sistemas antioxidantes endógenos, instala-se o estresse oxidativo, condição responsável por danos às estruturas celulares, incluindo lipídios, proteínas e *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Esse desequilíbrio contribui para o envelhecimento celular e está implicado na fisiopatologia de diversas doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatórias (Palaia *et al.*, 2011; Pooja; Shweta; Patel, 2025).

Nesse contexto, estudos demonstram que o Ambroxol exerce ação antioxidante por meio da neutralização de radicais livres, especialmente aqueles gerados por exposição a agentes tóxicos inalados, como a fumaça do cigarro. Além disso, o fármaco modula a atividade de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, e exerce efeito protetor contra a peroxidação lipídica, reforçando sua utilidade em condições associadas ao estresse oxidativo (Malerba; Ragnoli, 2008; Palaia *et al.*, 2011; Ponugoti *et al.*, 2024).

Pesquisas *in vitro* e *in vivo* em modelos de inflamação pulmonar demonstram que o Ambroxol exerce ação antioxidante eficiente, capturando e eliminando efetivamente radicais OH e ácido hipocloroso (HOCl), com atividade moderada contra o O_2^- . Além disso, o fármaco reduz a produção de superóxido e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por neutrófilos ativados e macrófagos alveolares, preservando a função da α_1 -antiproteínase contra inativação, mediada por HOCl e peroxinitrito ($ONOO^-$). Essas ações são complementadas pela proteção do ácido hialurônico e do colágeno contra a oxidação induzida por ferro e HOCl, ao decompor e eliminar o HOCL e proporcionar proteção contra $ONOO^-$, além de suprimir a resposta de explosão respiratória em células fagocíticas (Gillissen *et al.*, 1996; Nowak *et al.*, 1994; Palaia *et al.*, 2011; Ponugoti *et al.*, 2024).

Em modelos *in vivo* e *in vitro* de doenças não pulmonares, o ambroxol demonstrou atuar como modulador da resposta antioxidante ao aumentar os níveis de enzimas antioxidantes endógenas, como SOD, CAT e GSH, ao mesmo tempo em que reduz marcadores de estresse oxidativo, como o malondialdeído (MDA). Esses efeitos evidenciaram a capacidade do fármaco de restaurar o equilíbrio redox celular e neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS), limitando o dano oxidativo às estruturas celulares. A preservação da integridade tecidual,

observada nesses estudos, reforça o potencial terapêutico do ambroxol como agente antioxidante além do trato respiratório (Barut *et al.*, 2019; Jiang *et al.*, 2013; Štětinová; Herout; Květina, 2004; Sunkari *et al.*, 2019).

A literatura demonstra que o ambroxol tem potencial para atuar contra o dano oxidativo e reduzir a destruição tecidual mediada por processos proteolíticos. Esse efeito ocorre de diversas maneiras: tanto pela redução do dano oxidativo à α 1-antiproteinase, como pela contenção da explosão respiratória em células fagocíticas ativadas e pela eliminação de ROS (Paleari *et al.*, 2011; Ponugoti *et al.*, 2024).

2.3.1.3 Efeito Anti-inflamatório

A literatura destaca estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que investigaram o potencial anti-inflamatório do ambroxol, com foco principalmente em modelos pulmonares. Em experimentos, o ambroxol demonstrou propriedades anti-inflamatórias, influenciando uma série de células, como leucócitos polimorfonucleares (PMN), células mononucleares, células do parênquima das vias aéreas, basófilos e mastócitos, restringindo suas atividades pró-inflamatórias. O ABX atua reduzindo a quimiotaxia dos leucócitos PMN *in vitro* e a formação de ânion superóxido, sem comprometer a viabilidade celular. Além disso, diminui a produção de IL-1 e do TNF- α em células mononucleares humanas expostas a endotoxinas, sem causar citotoxicidade (Malerba; Ragnoli, 2008; Paleari *et al.*, 2011; Ponugoti *et al.*, 2024).

Em estudo conduzido por Bianchi *et al.* (1990), a estimulação de células mononucleares humanas por endotoxinas do tipo lipopolissacarídeos (LPS) demonstrou que o ambroxol foi capaz de inibir a síntese das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF. Resultado semelhante foi observado em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em ratos, no qual o tratamento com ambroxol reduziu significativamente os níveis de TNF- α , IL-6 e do fator de crescimento transformador beta-1 (*Transforming Growth Factor-beta* 1 – TGF- β 1) no lavado broncoalveolar (*Bronchoalveolar Lavage* – BAL) (Su *et al.*, 2004; Bianchi *et al.*, 1990).

Além desses resultados específicos, diferentes investigações experimentais demonstraram que o ambroxol possui propriedades anti-inflamatórias mais amplas, atuando de forma consistente na modulação de mediadores inflamatórios em distintos modelos. O fármaco promoveu a redução significativa de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17, interleucina-22 (IL-22), interleucina-23 (IL-23). Simultaneamente, foi observado um aumento na expressão de IL-10, uma citocina anti-inflamatória com papel central na limitação

da resposta imune exacerbada (Barut *et al.*, 2019; Gaida *et al.*, 2005; Gültekin *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2022; Sunkari *et al.*, 2019).

O ambroxol também inibiu a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B* – NF-κB), um dos principais reguladores da cascata inflamatória, contribuindo para a supressão da transcrição de genes pró-inflamatórios. Ainda, observou-se menor infiltração celular, redução do edema e preservação da arquitetura tecidual nas áreas tratadas, sugerindo um efeito protetor local. Em alguns estudos, seu desempenho foi comparável ao de fármacos consagrados, como corticosteroides, reforçando o potencial terapêutico do ambroxol no controle da inflamação em condições não respiratórias (Barut *et al.*, 2019; Gaida *et al.*, 2005; Gültekin *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2022; Sunkari *et al.*, 2019).

2.3.1.4 Efeito analgésico

Os canais de sódio dependentes de voltagem (VGSCs) exercem papel fundamental na modulação da excitabilidade neuronal, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas associadas à dor. A família de canais VGSC do tipo Na_v1 é composta por nove isoformas, denominadas de Na_v1.1 a Na_v1.9, cuja expressão é regulada de forma espaço-temporal, apresentando propriedades eletrofisiológicas distintas. As isoformas Na_v1.1, Na_v1.5, Na_v1.6, Na_v1.7, Na_v1.8 e Na_v1.9 são expressas em neurônios do DRG, com destaque para Na_v1.7, altamente expresso nesses neurônios, e para Na_v1.8 e Na_v1.9, cuja expressão é seletiva e predominante em nociceptores. Essas isoformas têm sido amplamente associadas à transdução e propagação dos sinais nociceptivos, sendo alvos promissores para o desenvolvimento de novas terapias analgésicas (Hameed, 2019).

Para compreender a fisiopatologia da dor, é essencial considerar a participação dos canais Na_v1.8, pela sua especificidade para neurônios sensoriais, e Na_v1.7, em razão de suas associações genéticas com formas patológicas de dor. Esses dois canais apresentam diferenças significativas em suas propriedades cinéticas, dependência de voltagem e sensibilidade à tetrodotoxina (TTX), um bloqueador seletivo de canais de sódio. O canal Na_v1.7 é sensível à TTX, sendo inibido por concentrações nanomolares desse composto (classificado como TTX-sensível – TTX-S). Em contraste, o canal Na_v1.8 é resistente à TTX, não sendo bloqueado por essas concentrações (classificado como TTX-resistente – TTX-R) (Hameed, 2019).

Pesquisas indicam que a ação analgésica do ABX pode estar relacionada ao bloqueio de canais de sódio (Na⁺) dependentes de voltagem em neurônios sensoriais. Evidências demonstram que o ABX exerce um efeito supressor mais pronunciado sobre os

canais de Na⁺ resistentes à tetrodotoxina (TTX), como o Nav1.8, quando comparado aos canais sensíveis à TTX, como o Nav1.7 (Russo *et al.*, 2023; Weiser; Wilson, 2002).

Estudos eletrofisiológicos confirmam que o ambroxol é capaz de bloquear tanto canais Nav TTX-r quanto TTX-s em neurônios das fibras C do DRG de ratos. A substância atua de forma seletiva, com maior potência sobre os canais Nav1.8, sendo essa ação comparável à da bupivacaína em relação aos canais TTX-r, o que evidencia seu potencial como inibidor eficaz em concentrações clinicamente relevantes. Isto reforça o potencial do ambroxol como agente analgésico com aplicação no tratamento da dor neuropática (Weiser; Wilson, 2002).

Corroborando esses dados, estudos conduzidos por Gaida *et al.* (2005), utilizando modelos animais de dor crônica, neuropática e inflamatória, demonstraram que o ambroxol suprimiu significativamente os comportamentos relacionados à dor em níveis plasmáticos compatíveis com o uso clínico. Além disso, seus efeitos analgésicos foram comparáveis, ou até superiores, aos da gabapentina, fármaco amplamente utilizado no manejo da dor neuropática. Dada sua eficácia, torna-se essencial compreender o perfil de segurança do ambroxol, incluindo as faixas de dosagem utilizadas experimentalmente e seus potenciais efeitos tóxicos.

2.3.1.5 Dose e toxicidade de ambroxol

A literatura científica descreve um estudo que buscou determinar a dosagem adequada do ambroxol, bem como avaliar seus potenciais efeitos tóxicos. As vias de administração testadas incluem oral, intravenosa, subcutânea e intraperitoneal, utilizando modelos animais como camundongos, ratos, coelhos, porquinhos-da-índia e cães. Em testes de toxicidade oral aguda, a substância demonstrou baixa toxicidade nesses modelos. Entretanto, em casos de superdosagem, foram observados sintomas como dispneia, ataxia e convulsões parcialmente tônico-clônicas, sendo todos esses sintomas reversíveis (Malerba; Ragnoli, 2008).

No mesmo estudo, avaliações de toxicidade oral subaguda e crônica realizadas em ratos (52 e 78 semanas), coelhos (26 semanas) e cães (52 semanas) não evidenciaram efeitos adversos graves ou lesões orgânicas específicas mesmo em doses elevadas. Para os ratos, a dose testada chegou a 2500 mg/kg, enquanto coelhos e cães toleraram até 250 mg/kg. Em doses clínicas mais usuais até 50 mg/kg (rato), 40 mg/kg (coelho) e 10 mg/kg (cão), não foram observadas alterações adversas (Malerba; Ragnoli, 2008).

Estudos clínicos têm demonstrado que o ambroxol apresenta um perfil de segurança favorável mesmo em doses elevadas. Em uma revisão publicada por Cazan *et al.* (2018), com base em dados do PRAC da União Europeia, foram analisadas diferentes dosagens do fármaco

entre 60 e 150 mg por via oral em adultos com doenças das vias aéreas, contemplando formulações de liberação prolongada e imediata. Oosterhuis *et al.* (1993) também relataram ausência de eventos adversos graves com a administração oral de 1000 mg/dia, reforçando a segurança do composto em doses mais elevadas.

Resultados similares foram observados em outros ensaios clínicos. Laoag-Fernandez, Fernandez e Mauro (2000) utilizaram 1000 mg/dia de ambroxol por via intravenosa, durante três dias, em gestantes para prevenção da Síndrome do Desconforto Respiratório do Recém-Nascido, observando apenas efeitos leves e autolimitados, como congestão nasal, náuseas, vômitos e taquicardia leve. De forma semelhante, Istaiti *et al.* (2023) reportaram boa tolerabilidade à dose oral de 600 mg/dia durante 12 meses em pacientes com doença de Gaucher tipo 1, sem registro de eventos adversos graves. Os estudos reforçam o potencial do ambroxol como uma alternativa terapêutica segura, indo além do uso mucolítico tradicional.

Um aspecto central na compreensão das propriedades analgésicas de um fármaco é o conhecimento preciso das dosagens que possibilitam alcançar concentrações plasmáticas terapêuticas e seguras. Estudos pré-clínicos demonstram que a extrapolação de doses eficazes entre espécies deve considerar a equivalência farmacocinética, especialmente no que se refere à concentração plasmática máxima (C_{max}) (Ferreira *et al.*, 2023). Em um estudo conduzido por Gaida *et al.* (2005), os níveis plasmáticos de ambroxol em ratos foram determinados e comparados com dados clínicos obtidos em humanos a partir de 11 estudos. Foi observada uma correlação linear entre as concentrações plasmáticas máximas em humanos e em ratos, utilizando doses que variaram de 30 a 1000 mg por indivíduo, o que reforça a validade da equivalência dose-resposta entre as espécies.

Em 2005, Gaida *et al.* (2005) investigaram os efeitos do ABX como bloqueador seletivo dos canais de sódio voltagem-dependentes Na_v1.8, visando avaliar seu potencial analgésico em modelos de dor crônica, incluindo dor neuropática e inflamatória. Foram testadas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, administradas por via oral em ratos. A seleção das dosagens baseou-se em uma correlação linear previamente identificada entre os níveis plasmáticos do ABX em ratos e humanos, com doses variando de 10 a 1000 mg/kg em ratos e correspondendo a concentrações plasmáticas máximas obtidas em humanos com doses entre 30 e 1000 mg por indivíduo. Essas dosagens foram comparadas à gabapentina, nas concentrações de 10, 30 e 100 mg/kg.

Os resultados demonstraram que o ABX apresentou superioridade à gabapentina na maioria dos modelos avaliados. No teste da pata induzido por formalina, observou-se eficácia a partir de 300 mg/kg, sendo que, na dose de 1000 mg/kg, o efeito analgésico do ABX superou

o da gabapentina. Em modelo de dor neuropática por ligadura parcial do nervo ciático, doses a partir de 100 mg/kg promoveram alívio significativo da alodínia mecânica, com completa restauração dos limiares mecânicos na dose de 1000 mg/kg, superando a eficácia de 72% da gabapentina. No modelo de monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund, a dose de 1000 mg/kg de ABX reduziu a alodínia em 43%, valor comparável à redução de 45% promovida por 100 mg/kg de gabapentina (Gaida *et al.*, 2005).

Em 2004, Su *et al.* (2004) conduziram um experimento para investigar a ação anti-inflamatória do ABX em um modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos. Os camundongos receberam doses intraperitoneais de 30 mg/kg e 90 mg/kg de ABX por sete dias, sendo os resultados comparados aos da dexametasona, padrão terapêutico. Tanto o ambroxol quanto a dexametasona reduziram significativamente manifestações clínicas como hemorragia, edema pulmonar, exsudação e infiltração de neutrófilos em 24 horas e 48 horas. Além disso, foi observada uma redução significativa na razão peso úmido/peso seco do pulmão. Em comparação ao grupo controle, os níveis de TNF- α , IL-6 e TGF- β 1 no BAL também foram significativamente menores nos grupos tratados. A concentração de proteínas no BAL, marcador de permeabilidade vascular, apresentou queda expressiva com ambos os tratamentos.

No ano seguinte, Haque e Gilani (2005) investigaram os efeitos anticatarata do ABX, da Spirulina e da vitamina E, utilizando um modelo de indução de catarata por naftaleno em ratos. As doses orais de ABX foram de 100 mg/kg/dia, administradas tanto de forma isolada quanto em combinação com o agente indutor. O estudo destacou o papel dos processos oxidativos e das espécies reativas de oxigênio na gênese da catarata senil, sendo observada uma redução acentuada de até 14 vezes na concentração de glutathiona, um importante antioxidante endógeno. O modelo com naftaleno foi eficaz em simular a catarata senil por promover a redução de proteínas hidrossolúveis e da glutathiona. Os resultados evidenciaram a capacidade do ambroxol, da Spirulina e da vitamina E em retardar o desenvolvimento da catarata, o que foi atribuído à potente atividade antioxidante desses agentes, à atenuação do estresse oxidativo e à proteção contra a alquilação de proteínas, glutathiona e aminoácidos (Haque; Gilani, 2005).

Um estudo conduzido por Cao, Hou e Zhang (2019) avaliou a ação do ambroxol em doses orais de 2 mg/kg/dia e 50 mg/kg/dia sobre lesões pulmonares induzidas por ventilação mecânica (LPVI) em modelo experimental com roedores. Os animais submetidos à ventilação e tratados com a dose mais elevada (50 mg/kg) apresentaram redução significativa do edema pulmonar intersticial e da infiltração de células inflamatórias, em comparação com os que

receberam apenas solução salina. No entanto, a dose mais baixa (2 mg/kg) não demonstrou eficácia na atenuação da resposta inflamatória associada à ventilação mecânica.

Em 2018, Furgała *et al.* (2018) investigaram os efeitos do ambroxol e da pregabalina na redução da alodínia fria induzida por oxaliplatina em camundongos. As doses intravenosas testadas de ambroxol foram de 12,5 mg/kg e 37,5 mg/kg, determinadas experimentalmente. Observou-se que apenas a dose de 37,5 mg/kg foi eficaz, apresentando atividade antialodínica significativa, restrita, contudo, à fase inicial da alodínia.

Em 2022, Cavalu *et al.* (2022) exploraram os efeitos do ambroxol em modelo de colite ulcerativa (CU) induzida por ácido acético em ratos, utilizando doses orais de 100 mg/kg/dia e 200 mg/kg/dia. Os resultados indicaram que a dose mais elevada apresentou efeito profilático mais pronunciado, com melhora significativa das manifestações histopatológicas da CU. O tratamento com 200 mg/kg intensificou a ativação da via *Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2* (Nrf2) e a expressão de Heme Oxigenase-1 (HO-1) e catalase, otimizando a resposta antioxidante frente ao dano oxidativo. Além disso, observou-se a inibição da via de sinalização do NF-κB e de seus mediadores pró-inflamatórios associados, como IL-6 e TNF-α, ao passo que a IL-10 foi positivamente modulada.

Considerando o perfil farmacológico multifacetado do ambroxol e sua reconhecida baixa toxicidade, torna-se pertinente investigar seu potencial terapêutico em modelos de osteoartrite, uma condição de alta prevalência, impacto funcional relevante e limitada resposta às opções terapêuticas atualmente disponíveis. Essas características tornam a OA um desafio clínico e socioeconômico significativo, sobretudo no contexto do envelhecimento populacional e da sobrecarga dos sistemas de saúde. No entanto, a escassez de estudos que avaliem diretamente sua ação na fisiopatologia da OA justifica a proposta deste estudo experimental, que visa aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de ação do ambroxol nessa condição e explorar sua viabilidade como alternativa terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos do ambroxol em modelo experimental de osteoartrite em joelhos de ratos.

3.2 Específicos

- a) Mapear e integrar criticamente as evidências disponíveis na literatura, identificando padrões, consensos, divergências e lacunas de conhecimento, com o objetivo de fundamentar a relevância científica e a originalidade da presente tese;
- b) Avaliar o efeito do ambroxol sobre o grau de incapacitação articular, através dos testes comportamentais;
- c) Investigar as alterações radiológicas articulares em modelo experimental de osteoartrite tratado com ambroxol;
- d) Avaliar o efeito do ambroxol na preservação da integridade da cartilagem articular, com base na análise histológica;
- e) Quantificar a resposta inflamatória pela dosagem de citocinas.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo 1

Non-pulmonary mechanisms of action of ambroxol *in vivo* experimental models: a systematic review

Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita¹, Anne Caroline Silva Nogueira da Cruz², Rafael de Abreu Lima³, Joana Tenório-Meireles⁴, Arney José Nogueira Farias⁵, Isabela Nogueira Santos⁵, Gustavo Frota⁶, Taciana Gabrielle Pinheiro de Moura Carvalho⁷, Rafael Antônio Freire Carvalho⁸, Jorge Antônio Meireles-Teixeira⁷, Tereza Prazeres⁶, Rafael Cardoso Carvalho⁹, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes¹⁰, João Batista Santos Garcia¹¹.

¹Medicine Department I, Federal University of Maranhao (UFMA) and Post-Graduate Program in Health Sciences (UFMA), Sao Luis, Maranhao, Brazil.

²Post-Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhao, Sao Luis, Maranhao, Brazil.

³Nursing Department, Federal University of Maranhao, and Multiprofessional Residence Program in Health, University Hospital of Maranhao (HUUFMA), Sao Luis, Maranhao, Brazil.

⁴University CEUMA, Sao Luis, Maranhao, Brazil.

⁵Federal University of Maranhao, Sao Luis, Maranhao, Brazil.

⁶Graduate Program in Biotechnology – RENORBIO, Federal University of Maranhao, Sao Luis, Maranhao, Brazil.

⁷Medicine Department I, Federal University of Maranhao (UFMA), Sao Luis, Maranhao, Brazil.

⁸Medical School – Pinheiro Campus, Federal University of Maranhao (UFMA), Pinheiro, Maranhao, Brazil.

⁹Department of Pathology, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Maranhao, Sao Luis, Maranhao, Brazil.

¹⁰Physiological Sciences Department, Federal University of Maranhao, Sao Luis, Maranhao, Brazil.

¹¹Medicine Department II, Federal University of Maranhao, Sao Luis, Maranhao, Brazil.

Artigo publicado no periódico: **Fundamental & Clinical Pharmacology**

ISSN: 0767-3981

Online ISSN:1472-8206

Qualis:A2

Fator de Impacto: 2,5

REVIEW ARTICLE OPEN ACCESS

Non-Pulmonary Mechanisms of Action of Ambroxol in In Vivo Experimental Models: a Systematic Review

Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita¹  | Anne Caroline Silva Nogueira da Cruz²  | Rafael de Abreu Lima³  | Joana Tenório-Meireles⁴  | Arney José Nogueira Farias⁵  | Isabela Nogueira Santos⁵  | Gustavo Frota⁶  | Taciana Gabrielle Pinheiro de Moura Carvalho⁷  | Rafael Antônio Freire Carvalho⁸  | Jorge Antônio Meireles-Teixeira⁷  | Tereza Prazeres⁶  | Rafael Cardoso Carvalho⁹  | Maria do Socorro de Sousa Cartágenes¹⁰  | João Batista Santos Garcia¹¹ 

¹Medicine Department I, Federal University of Maranhão (UFMA) and Post-Graduate Program in Health Sciences (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil | ²Post-Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil | ³Nursing Department, Federal University of Maranhão, and Multiprofessional Residence Program in Health, University Hospital of Maranhão (HUUFMA), São Luís, Maranhão, Brazil | ⁴University CEUMA, São Luís, Maranhão, Brazil | ⁵Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil | ⁶Graduate Program in Biotechnology – RENORBIO, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil | ⁷Medicine Department I, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Maranhão, Brazil | ⁸Medical School – Pinheiro Campus, Federal University of Maranhão (UFMA), Pinheiro, Maranhão, Brazil | ⁹Department of Pathology, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil | ¹⁰Physiological Sciences Department, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil | ¹¹Medicine Department II, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

Correspondence: Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita (michelline.joana@ufma.br)

Received: 16 March 2025 | **Revised:** 11 August 2025 | **Accepted:** 24 February 2026

Keywords: ambroxol | analgesic | anti-inflammatory agent | antioxidant | drug repositioning | in vivo

ABSTRACT

Background: Repositioning offers a cost-effective approach to discovering new therapeutic applications for existing medications. Ambroxol, primarily used as a mucolytic for respiratory diseases, has demonstrated anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant properties, suggesting potential benefits in non-pulmonary conditions. This study conducted a systematic review to evaluate the efficacy of ambroxol in experimental disease models unrelated to the respiratory system.

Methods: Following registration in the Open Science Framework and adherence to the PICO strategy for formulating the guiding question, searches were performed in PUBMED/MEDLINE, EMBASE, and SCOPUS using the keywords: (Ambroxol) AND (Anti-Inflammatory Agents OR Analgesics OR Antioxidants) AND (Animals OR in vivo). The SYRCL tool assessed methodological quality. Among 353 identified records, eight articles met eligibility criteria.

Results: These studies investigated ambroxol's effects in models of gastric lesions, neuropathic pain, psoriasis-like skin inflammation, hemorrhagic cystitis, and ischemia/reperfusion injuries in the liver and kidneys. Ambroxol doses ranged from 5 to 1000 mg/kg, predominantly administered orally. Its antioxidant properties were demonstrated by reducing free radicals and increasing enzymatic activity (SOD, CAT, GSH). Anti-inflammatory effects included a decrease in pro-inflammatory cytokines

Abbreviations: ABX, ambroxol; ACH, acetylcholine; AED, animal equivalent dose; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CAT, catalase; CR, creatinine; CYP, cyclophosphamide; GSH, glutathione; IL, interleukin; IL-1 β , interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; IL-17, interleukin-17; IL-22, interleukin-22; IL-23, interleukin-23; IMQ, imiquimod; IND, indomethacin; LDH, lactate dehydrogenase; LPS, lipopolysaccharide; MDA, malondialdehyde; MPO, myeloperoxidase; NF- κ B, nuclear factor kappa B; OSF, Open Science Framework; PRG, pregabalin; QCRI, Qatar Computing Research Institute; SC, subcutaneous; SOD, superoxide dismutase; SYRCL, Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TGF- β , transforming growth factor beta; TLR, Toll-like receptors; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2026 The Author(s). *Fundamental & Clinical Pharmacology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique.

(TNF- α , IL-1 β) and histological improvements. Antinociceptive action was observed through inhibition of voltage-gated sodium channels and reduction of oxidative stress, alleviating neuropathic pain.

Conclusions: Despite ambroxol's widespread clinical use, limited research has explored its non-respiratory applications. Existing studies suggest its promising therapeutic potential, reinforcing the need for further investigation into its role as an alternative treatment for various inflammatory and oxidative stress-related conditions beyond pulmonary diseases.

1 | Introduction

Drug repositioning has emerged as a promising alternative in response to the challenges of developing new medications, as it seeks to identify new applications for a drug beyond its originally approved indication. This approach provides a solution to the lengthy, costly, and highly uncertain process of drug development, in which only 2.01% of innovations in chemical molecules reach the market [1].

The significant reduction in time and costs associated with drug repositioning is due to the already well-known safety and pharmacokinetic profile of these molecules, facilitating the rapid advancement of research for evaluation in clinical models and Phase II and III trials. This technique expands the therapeutic potential of previously approved drugs [2].

Ambroxol (ABX) or trans-4-(2-amino-3,5-dibromobenzylamino)-cyclohexanol is a chemical compound classified as a mucolytic agent, widely used for decades in the treatment of respiratory diseases due to its ability to stimulate mucociliary clearance, improve mucus viscosity, and facilitate expectoration [3].

It is an active metabolite of bromhexine, isolated from the plant species *Adhatoda vasica*. ABX is clinically used for the treatment of respiratory diseases associated with viscous or excessive mucus in chronic bronchitis. Additionally, studies have shown that ABX possesses anti-inflammatory, analgesic, antiviral, antibacterial, antifungal, and antifibrotic properties through various mechanistic actions, including antioxidant potential by scavenging free radicals and reducing the release of histamine, human leukotrienes, mast cells, and leukocytes [4].

ABX is already widely used in clinical practice, demonstrating a safe use profile and well-established pharmacodynamics. Recent investigations have revealed additional properties, expanding its therapeutic potential beyond the respiratory tract. Despite these perspectives, knowledge about the action and efficacy of ABX in experimental models outside the respiratory context remains limited. Therefore, gathering and systematically organizing evidence is essential to support future therapeutic applications of this drug.

Therefore, the present study aimed to conduct a systematic literature review to evaluate the anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant properties of ABX in *in vivo* experimental models of non-respiratory diseases.

2 | Methods

This is a systematic review study, registered in the Open Science Framework (OSF) under DOI number [10.17605/OSF.IO/ZXTVR](https://doi.org/10.17605/OSF.IO/ZXTVR)

and based on the methodological guidelines for conducting systematic reviews and meta-analyses of randomized clinical trials [5]. The research was guided by the following key question: Does ABX demonstrate efficacy when used as an anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant agent in experimental models of diseases beyond the respiratory tract? Subsequently, it was structured according to the PICO strategy (Population, Intervention, Comparison, and Outcomes), where the characteristics of the population (rats with inflammatory conditions), intervention (effect of ABX administered at different doses), comparison (other medications used, results before and after ABX administration), and outcome (anti-inflammatory, analgesic, and/or antioxidant action) were combined (Table 1).

2.1 | Literature Search

The search was conducted in the PubMed/MEDLINE, Embase, and Scopus databases. It was carried out between September and November 2024, with no restrictions on year or language for the selected studies. For the search, Boolean operators "AND" and "OR" were used in combination with controlled descriptors, according to the following search strategy: (Ambroxol) AND (Anti-Inflammatory Agents OR Analgesics OR Antioxidants) AND (Animals OR *in vivo*).

The studies retrieved from all combinations and databases were selected using a free web-based review platform called Rayyan, developed by the Qatar Computing Research Institute (Rayyan QCRI) [6]. The selection process involved duplicate removal, identification, selection, and eligibility assessment.

2.2 | Inclusion Criteria

Initially, studies that involved animal experimentation and the use of ABX in analgesic, anti-inflammatory, and antioxidant models for non-pulmonary diseases were included.

TABLE 1 | PICO strategy.

Studied domain: use of ambroxol	
Population	Rodents in inflammatory conditions
Intervention	Effect of ambroxol administered at different doses
Comparison	Other medications used, results before and after ambroxol
Outcome	Anti-inflammatory, analgesic, and/or antioxidant action

2.3 | Exclusion Criteria

Articles that were not original, that addressed in vitro or human experimental models, that focused on the pulmonary effect of ABX, or that investigated neurodegenerative diseases and chaperone mechanisms were excluded.

2.4 | Study Selection

The study selection process was conducted independently by two blinded reviewers (Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita and João Batista Santos Garcia), and disagreements were resolved by a third reviewer. In the first stage, the titles of the references identified through the search strategy were read, and potentially eligible studies were preselected. In the second stage, the titles and abstracts were reviewed, and the articles chosen in this step were analyzed in full for inclusion or exclusion in the review.

2.5 | Data Extraction

The data from the included studies were extracted by one evaluator (M. J. T. A. M. M). For this purpose, a form adapted from the Cochrane Development, Psychosocial and Learning Problems (Cochrane) (<https://dplp.cochrane.org/data-extraction-forms>) was used, and the data were recorded in a Microsoft Excel spreadsheet. The extracted variables included study characteristics (author/year of publication, country of study), sample characteristics (sample size, animal characteristics—species, sex, weight), study objective, type of inflammatory model used, intervention (dose, route of administration, and treatment duration), evaluation parameters, results, and main conclusions.

2.6 | Interspecies Dose Adjustment

To account for interspecies differences in metabolic rates between rats and mice, the methodology for calculating the animal equivalent dose (AED) was adopted, based on the body surface area normalization method [7].

Accordingly, estimated average body weights were used for rats (220 g) and mice (32 g), considering the strain standards reported in the studies. Based on this, the minimum and maximum doses administered in mice were converted into their rat-equivalent doses to facilitate a more accurate interpretation of pharmacological exposure and enhance the consistency of the findings.

2.7 | Methodological Quality Assessment

To assess the methodological quality of the animal studies included in this review, the Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE) tool was used to evaluate the risk of bias in animal studies. This tool includes the following categories: selection bias, performance bias, detection bias, attrition bias, reporting bias, and other sources of bias. Ten questions were applied to the articles included in the systematic

review, with possible answers being “YES,” indicating a low risk of bias (when the methodological criterion was clearly met); “NO,” indicating a high risk of bias (when the criterion was not met or was inadequately applied); and “UNCLEAR” (when the information was not available or was insufficient for a proper judgment) [8].

Because this study involved the analysis of existing published research, it did not require ethical approval. The data used were publicly available and did not involve any direct interaction with animals, humans, or their personal information. Furthermore, no authors were contacted to obtain additional information about their publications, as the analysis focused solely on the data within the publications themselves.

3 | Results

A total of 353 articles were identified in the electronic databases using the search strategy. During the selection process, 71 duplicate references were removed, resulting in 282 articles. The titles and abstracts of these articles were screened, leading to the exclusion of 93 references, leaving a total of 189 studies. Regarding study type, 29 studies were excluded for being conducted in humans or in vitro; 27 were clinical protocols, review articles, theses, or dissertations; 21 articles investigated ABX for respiratory tract diseases; and 14 studies did not address the relevant topic. This process resulted in 99 articles, which were subjected to independent screening using the Rayyan software. Screening was performed by two reviewers, and in case of a tie, a third author provided an opinion. Consequently, the full texts of the 99 records were analyzed regarding the methodology used, results, and conclusions. After this stage, references that did not meet the selected variables for this review (randomized trial, presence of a control or placebo group, clearly defined outcomes, statistical analysis) were excluded, resulting in a final sample of eight studies (Figure 1).

3.1 | Characteristics of Included Studies

In this review, eight studies were included. The average number of animals evaluated was 37, ranging from 6 to 108, with two studies not reporting the number of participants. Most of the subjects were rats ($n = 14$), predominantly male ($n = 36$), from the Wistar strain ($n = 8$). The research objectives varied, but all explored specific aspects of ABX efficacy in inflammatory, painful, or oxidative conditions.

In five studies (62.5%), the anti-inflammatory effect was evaluated using experimental models such as neuropathy, hepatic ischemia/reperfusion, psoriasis, hemorrhagic cystitis, and renal ischemia/reperfusion. Among these models, the neuropathic pain model was the most prevalent, representing 37.5% of the evaluated studies. Additionally, 50% of the studies investigated the antioxidant activity of the drug, while 37.5% explored its analgesic effect.

Considering the dose conversion using the AED calculation based on studies conducted with mice, it was possible to estimate an adjusted dose range corresponding to rats. Thus,

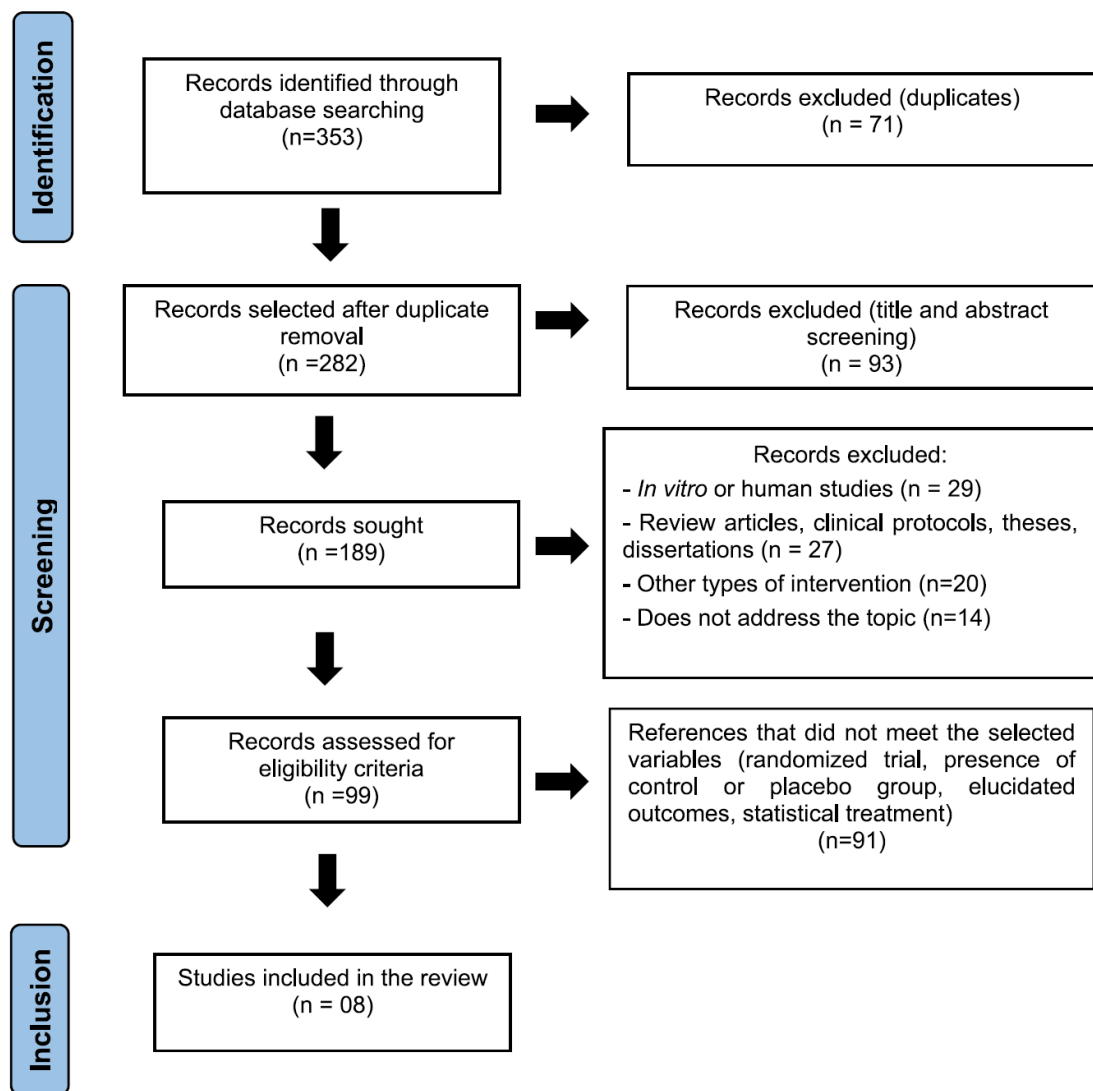


FIGURE 1 | Identification of studies through databases according to PRISMA recommendations.

in models evaluating anti-inflammatory activity, ABX doses varied widely, from 5 to 1000 mg/kg, administered through different routes, including oral, intraperitoneal, subcutaneous, and topical. For antioxidant activity, the adjusted doses ranged from 5 to 140 mg/kg, via oral, intravenous, subcutaneous, and intraperitoneal routes. Regarding analgesic effects, only studies conducted in rats were found, with doses ranging from 30 to 1000 mg/kg, always administered orally, with one study evaluating the combination of ABX with other agents, such as pregabalin.

The treatment duration with ABX ranged from 6 h to 4 weeks, depending on the experimental model. Antioxidant and anti-inflammatory studies generally adopted shorter protocols, ranging from 6 h to 7 days, whereas neuropathic pain and analgesia models involved longer treatments, lasting from 5 days to 4 weeks. In studies with therapeutic combinations, such

as ABX and pregabalin, the duration reached up to 21 days (Table 2).

The included studies utilized various evaluation parameters to investigate the effects of ABX. Histological analyses were performed in 62.5% of the studies, highlighting changes in tissues such as the stomach, liver, skin, bladder, and kidneys. Biochemical parameters were employed in 62.5% of the studies, including inflammatory markers tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), and antioxidant markers such as glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA). Functional and behavioral parameters were assessed in 50% of the studies, covering bladder contractility, thermal and mechanical allodynia, and withdrawal latency in acute and chronic pain models. These parameters were essential for assessing the antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic effects of ABX.

TABLE 2 | Characterization of animal model studies included in this review.

Author/year	Country	Study population	Objective	Research target/ intervention model	Dose and administration route	Treatment duration
Štětínová et al. (2004) [9]	Czech Republic	Female Wistar rats (<i>n</i> = NR*) 200–250 g	Evaluate the antioxidant action of ambroxol (ABX)	Indomethacin (IND)- induced gastric lesion	(1) Body lesions: ABX 10, 30, and 50 mg/kg (oral); (2) Antral lesions: 30, 60 min before IND; 50 mg/kg (oral)	Pre-induction: (1) Body lesions: 5, 30, 60 min before IND; (2) Antral lesions: 30 min before IND and 1 h after feeding/6 h
Gaida et al. (2005) [10]	Germany	Male Wistar and Sprague–Dawley rats (<i>n</i> = NR*) 200–350 g	Investigate the effect of ABX on chronic neuropathic and inflammatory pain	Pain: (1) Partial sciatic nerve ligation; (2) Chronic sciatic nerve constriction injury. Inflammation: Freund's adjuvant paw injection	ABX 30, 100, 300, and 1000 mg/kg (oral)	(1) Analgesia: 8–10 days; (2) Inflammation: 5 days
Hama et al. (2010) [11]	United States	Male Sprague–Dawley rats (<i>n</i> = 6) 100–150 g	Efficacy of ABX in neuropathic pain control	Surgical clip-induced spinal cord injury	ABX 100, 300, and 1000 mg/kg (oral)	4 weeks
Jiang et al. (2013) [12]	China	Male Wistar rats (<i>n</i> = 30) 200–280 g	Evaluate the antioxidant and anti-inflammatory actions of ABX	Hepatic ischemia/reperfusion injury	ABX 20, 80, and 140 mg/kg (intravenous)	6 h
Bhardwaj et al. (2016) [13]	India	NR*/Sprague–Dawley rats (<i>n</i> = 30) 180–250 g	Investigate the neuroprotective and antinociceptive effects of ABX in neuropathic pain	Induction by oxaliplatin injection	(1) ABX 1000 mg/ kg (oral); (2) ABX 1000 mg/ kg + pregabalin (PRG) 10 mg/kg (oral)	21 days
Sunkari et al. (2019) [14]	India	Male BALB/c mice (<i>n</i> = 30) 25–30 g	Evaluate the anti- inflammatory and antioxidant effects of ABX	Imiquimod (IMQ) model for psoriasis-like cutaneous inflammation	ABX 10 and 30 mg/ kg (topical) and ABX 2 mg/kg subcutaneous (SC)	7 days
Barut et al. (2019) [15]	Turkey	Male BALB/c Mice (<i>n</i> = 108) 25–40 g	Potential anti- inflammatory and antioxidant effects of ABX	Cyclophosphamide (CYP)- induced hemorrhagic cystitis	ABX 30, 70, and 100 mg/kg (intraperitoneal)	4 days
Gültekin et al. (2022) [4]	Cyprus and Turkey	Female and male Wistar rats (<i>n</i> = 18) 200–250 g	Evaluate the anti- inflammatory effect of ABX	Renal ischemia/reperfusion injury model	ABX 30 mg/kg (oral)	6 h

Abbreviation: NR, not reported.

The review demonstrated that ABX exhibits significant anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic effects. A total of 62.5% of the studies reported a significant reduction in inflammatory markers, such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6, as well as improvements in inflammatory conditions, including psoriasis, hemorrhagic cystitis, and ischemic injuries. The same percentage of studies showed an increase in antioxidant enzyme activity, such as GSH, SOD, and CAT, along with a reduction in oxidative stress markers, including MDA.

Regarding pain control, 37.5% of the studies demonstrated that ABX significantly reduced hyperalgesia and allodynia in a dose-dependent manner, with effects comparable with those of standard therapies. Histological models indicated that ABX attenuated tissue damage, reduced edema, and prevented structural damage in organs such as the liver, kidneys, and skin.

It was concluded that ABX exhibited dose-dependent analgesic and antinociceptive properties, leading to a reduction in hepatic, renal, and cutaneous damage, with anti-inflammatory and antioxidant effects. Additionally, it improved neuropathic pain and bladder contractile function by blocking sodium channels and regulating redox balance (Table 3).

3.2 | Methodological Quality Assessment

The evaluation of the studies using the SYRCLE tool criteria indicated a low risk of bias in animal allocation sequence (75%), baseline characteristics (100%), and random housing (62.5%), suggesting that experimental groups were homogeneous before interventions.

However, allocation concealment showed an uncertain risk in 75% of the studies, and blinding, in both outcome assessment and interventions, presented an uncertain risk in 87.5%, highlighting weaknesses in preventing biases related to knowledge of interventions by assessors.

Despite these concerns, incomplete outcome data and selective outcome reporting were considered low risk in 100% of the studies, ensuring transparency and methodological reliability in the evaluated studies (Figure 2).

4 | Discussion

In this systematic review, the potential of ABX as an anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic agent was evaluated in experimental models of diseases unrelated to the respiratory system. The included studies suggest that the drug exhibits therapeutic versatility, with significant effects in various pathophysiological contexts. Recognizing the interspecies heterogeneity between the models used (rats and mice) and the potential metabolic implications for ABX's pharmacokinetics, the AED was calculated to convert the doses administered in mice to adjusted values for rats. This partial standardization aimed to minimize the limitations in dose comparability between species and was incorporated into the analysis of results, allowing for a more robust interpretation of the magnitude and consistency of the observed effects.

4.1 | Antioxidant Activity

In the study by Jiang et al. in 2013 [12], the dose-dependent antioxidant effect of ABX was evaluated in a model of ischemia/reperfusion-induced hepatic injury. The authors used histological parameters and biochemical assays to assess the markers. It was observed that animals receiving higher doses of ABX (80 and 140 mg/kg) exhibited better outcomes in controlling liver injury, with reduced histological damage and decreased serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). This finding is supported by the study of Stetinova et al. in 2004 [9], which demonstrated a dose-dependent and time-related antioxidant effect of ABX in a model of indomethacin-induced gastric injury. The study reported better modulation of these injuries in both number and extent when ABX was administered 30 min before indomethacin at the highest tested dose (50 mg/kg). These results suggest that the observed benefits may be associated with the antioxidant and anti-inflammatory properties of ABX, particularly at high doses.

However, when compared with other studies, the *in vivo* effect of ABX was considered low in the study by Stetinova et al. in 2004 [9], despite the fact that the compound appears to be capable of scavenging a broad spectrum of radicals, which play a key role in the pathogenesis of indomethacin-induced gastric mucosal injury [16].

The study by Barut et al. in 2019 [15] demonstrated the ability of ABX to control oxidative damage in a model of cyclophosphamide (CYP)-induced hemorrhagic cystitis. Pre-treatment with ABX reduced MDA lipid peroxidation and prevented the depletion of GSH. Similar findings were reported in the study by Sunkari et al. in 2019 [14], which evaluated the effect of ABX in an imiquimod (IMQ)-induced model of psoriasis-like skin inflammation in rats, observing increased levels of antioxidant markers such as GSH and SOD, as well as reduced nitrite levels. These results were also observed in the study by Jiang et al. in 2013 [12], which reported increased activities of SOD, CAT, and GSH. These findings suggest that ABX exerts its antioxidant action both through the direct modulation of antioxidant enzymes and by preserving components of the cellular antioxidant defense system [17, 18].

4.2 | Anti-Inflammatory Activity

In the study by Sunkari et al. in 2019 [14], the positive effect of ABX was evaluated in a psoriasis-like model induced by the inflammatory agent IMQ. This inflammation model was developed by Van Der Fits and consists of the topical application of IMQ cream, which is commercially available in India, to the shaved dorsal skin region. IMQ is a ligand for Toll-like receptors (TLR7 and TLR8) and acts as a potent immune activator. It is commonly used for the topical treatment of genital warts caused by the human papillomavirus and other cancerous skin abnormalities [19].

When analyzing the histology of IMQ-induced skin lesions, the authors observed that topical application of ABX significantly reduced epidermal hyperplasia. Regarding biochemical and

TABLE 3 | Main findings and statistical significance in the studies included in this review.

Author/year	Evaluation parameters	Results	Key conclusions
Štětínová et al. (2004) [9]	Histological examination of the stomach: (1) Macroscopic evaluation of gastric lesions and (2) Microscopic examination.	(1) Macroscopic: Dose-dependent inhibition: Best results with ABX 50 mg/kg at 30 min pre-induction with indomethacin. Antral lesions: 50 mg/kg reduced lesion count but had a larger extension than the vehicle. (2) Microscopic: ABX reduced lesion depth and severity at 50 mg/kg, but antral lesions were not well controlled, forming true ulcers.	Low antioxidant effect despite free radical elimination.
Gáida et al. (2005) [10]	(1) Acute pain model (tail-flick and hot plate); (2) Chronic pain model (formalin paw test); (3) Neuropathic pain model.	(1) Acute pain model: ABX 1000 mg/kg increased withdrawal latency; (2) Chronic pain model: ABX 1000 mg/kg reduced paw flinching in acute and late phases; (3) Neuropathic pain model: ABX 100 and 1000 mg/kg reduced mechanical allodynia, fully restoring it at the highest dose.	ABX exhibited significant dose-dependent analgesic properties.
Hama et al. (2010) [11]	(1) Mechanical hypersensitivity model (Von Frey test); (2) Heat hypersensitivity model (infrared test); (3) Rotarod test; (4) Basso, Beattie, Bresnahan locomotor rating scale.	(1) ABX 1000 mg/kg reversed mechanical hypersensitivity by 72% in 60 min; (2) Partial reversal of heat hypersensitivity was observed at 90 min with 100 mg/kg (65%) and 300 mg/kg (61%); (3) ABX did not alter rotarod performance; (4) ABX did not significantly change BBB scores.	ABX exhibited significant antinociceptive effects without impairing coordinated locomotion, suggesting that its mechanism of action involves sodium channel blockade in primary afferent nociceptors.
Jiang et al. (2013) [12]	(1) Histological analysis; (2) Biochemical analysis alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST); (3) Antioxidant enzyme activity (SOD, CAT, GSH, MDA in liver tissue); (4) Western blot (caspase-3, Bcl-2, Bax, JNK).	(1) Histological analysis: ABX 20, 80, 140 mg/kg reduced cytoplasmic discoloration and nuclear condensation, with the best results at 80 and 140 mg/kg; (2) Biochemical analysis: ABX 20, 80, and 140 mg/kg significantly reduced ALT and AST levels; (3) Antioxidant enzyme activity: SOD and CAT significantly increased with ABX 80 and 140 mg/kg; GSH increased and MDA decreased with ABX 20, 80, and 140 mg/kg; (4) Western blot: ABX 140 mg/kg significantly increased Bcl-2 and reduced JNK; ABX 80 and 140 mg/kg reduced Bax and caspase-3 levels.	ABX significantly reduced liver damage caused by ischemia/reperfusion injury, increasing antioxidant and anti-apoptotic activity.

(Continues)

TABLE 3 | (Continued)

Author/year	Evaluation parameters	Results	Key conclusions
Bhardwaj et al. (2016) [13]	(1) Thermal paw hyperalgesia (hot plate test); (2) Cold paw allodynia (acetone drop method); (3) Cold tail hyperalgesia (cold tail immersion test); (4) Biochemical analysis (superoxide anion generation, total protein, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), myeloperoxidase (MPO) activity).	(1) ABX 1000mg/kg and ABX + PRG significantly attenuated thermal paw hyperalgesia, cold tail hyperalgesia, and cold paw allodynia; (2) ABX 1000mg/kg and ABX + PRG reduced oxidative stress markers (superoxide anion generation, TBARS) and inflammatory mediators (TNF- α and MPO).	ABX 1000 mg/kg and ABX + PRG significantly improved neuropathic pain, reducing oxidative stress and inflammatory mediators. The antinociceptive and neuroprotective effects of ABX are attributed to voltage-gated sodium channel blockade.
Sunkari et al. (2019) [14]	(1) Spleen index relative to body weight; (2) Biochemical parameters in skin tissue samples—GSH; (3) Estimation of nitrite levels induced by lipopolysaccharide (LPS) and imiquimod (IMQ); (4) Estimation of SOD; (5) Histological evaluation; (6) Cytokine assessment: IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-22, IL-23, TNF- α , and transforming growth factor beta (TGF- β).	(1) ABX 10 and 30 mg/kg (topical) and 2 mg/kg (SC) reduced epidermal hyperplasia, skin thickness, and spleen enlargement, reducing spleen index; (2) ABX 10 and 30 mg/kg (topical) significantly increased antioxidant markers GSH and SOD and reduced nitrite levels; (3) ABX 10 and 30 mg/kg (topical) reduced IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-22, IL-23, TGF- β , and TNF- α and increased IL-10 levels; (4) ABX 10 and 30 mg/kg (topical) significantly attenuated psoriasiform lesions in the histological analysis.	ABX significantly reduced skin inflammation, skin thickness, and splenomegaly. It decreased pro-inflammatory cytokines and modulated the oxidative/antioxidant redox balance.
Barut et al. (2019) [15]	(1) Bladder contractility studies; (2) Biochemical analysis: MDA; total GSH; TNF- α ; (3) Histopathological analysis.	(1) Pre-treatment with ABX did not reduce bladder weight increase caused by cyclophosphamide (CYP); (2) ABX 100mg/kg pre-treatment significantly increased acetylcholine (ACh) responsiveness; (3) ABX 70 and 100 mg/kg pre-treatment reduced MDA lipid peroxidation; (4) ABX 30 mg/kg significantly prevented GSH reduction; (5) ABX 30, 70, and 100 mg/kg pre-treatment prevented TNF- α level increase; (6) ABX 70 mg/kg significantly reduced mucosal hemorrhage.	ABX improved bladder contractile function, reduced mucosal hemorrhage, and demonstrated antioxidant and anti-inflammatory effects by decreasing MDA levels and TNF- α levels while increasing GSH levels.
Gültekin et al. (2022) [4]	(1) Biochemical analysis: alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CR) levels, and TNF- α and IL-1 β concentrations; (2) Histopathological analysis.	(1) ABX reduced ALP and LDH levels; (2) ABX significantly decreased BUN and CR levels; (3) ABX significantly reduced TNF- α and IL-1 β levels; (4) ABX reduced interstitial edema and tubular cell desquamation.	ABX protected renal structures and functions, minimizing cellular and inflammatory damage by reducing ALP, LDH, BUN, CR, TNF- α , and IL-1 β levels.

Abbreviation: NR, not reported.

	Allocation sequence	Basic characteristics	Allocation hiding	Random accommodation	Blinding	Random result evaluation	Blinding	Incomplete results data	Selection result report	Other sources of bias
BARUT et al., 2019	+	+	?	+	?	+	?	+	+	+
BHARDWAJ et al., 2016	?	+	?	+	?	+	?	+	+	?
GAIDA et al., 2005	+	+	?	+	?	?	?	+	+	+
GULTEKIN et al., 2022	+	+	?	?	?	?	?	+	+	+
HAMA et al., 2010	+	+	?	+	?	+	+	+	+	?
JIANG et al., 2013	?	+	?	?	?	+	?	+	+	+
STETINOVA et al., 2004	+	+	+	+	+	+	?	+	+	+
SUNKARI et al., 2019	+	+	+	?	?	+	+	+	+	+

Low risk
 Unclear risk
 High risk

FIGURE 2 | Risk of bias in animal studies assessed by the SYRCL tool.

immunological parameters, the IMQ group exhibited lower levels of GSH peroxidase and SOD but a higher level of nitrite production compared with the control rats. However, after treatment with ABX at doses of 10 and 30 mg/kg topical and 2 mg/kg subcutaneous, the antioxidant markers GSH and SOD were significantly increased compared with the IMQ control group. Additionally, a reduction in nitrite levels in the skin tissue was also observed [14].

Topical ABX at doses of 10 and 30 mg/kg also effectively counteracted oxidative stress. The drug additionally attenuated elevated cytokine levels in a dose-dependent manner. Thus, ABX intervention led to a significant reduction in nitrosative and oxidative stress and decreased the levels of cytokines IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-22, IL-23, TGF- β , and TNF- α ,

while simultaneously increasing the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 [14].

Another study evaluated the effects of ABX on pro-inflammatory cytokines in a rat model of ischemia/reperfusion-induced renal injury [4]. When assessing biochemical parameters through serum levels of alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH), a significant increase in these enzymes was detected in the ischemic injury group without treatment. In contrast, in the group treated with ABX hydrochloride, ALP and LDH activities were significantly reduced. Regarding pro-inflammatory markers, TNF- α and IL-1 β levels were analyzed in both groups: the control group (with injury and no treatment) and the ABX-treated group (with injury and treated with ABX). The findings

showed that untreated rats secreted significantly higher levels of TNF- α and IL-1 β ($p < 0.0001$), whereas these levels were reduced in the ABX-treated group ($p < 0.05$). Additionally, interstitial edema and tubular cell desquamation were decreased in the group treated with ABX.

A different study also analyzed the protective effect of ABX against oxidative/inflammatory damage, but in this case, induced by CYP in the urinary bladder of BALB/c mice [15]. The study's main findings highlighted a reduction in bladder injury, as ABX treatment significantly decreased mucosal hemorrhage and improved bladder contractile function. Additionally, improvements in biochemical parameters were observed, including cytokine levels and inflammation markers such as total GSH and TNF- α .

Accordingly, Barut et al. in 2019 [15] observed that CYP treatment significantly increased TNF- α levels compared with the control group. Additionally, it was found that ABX treatment, at all doses, reduced TNF- α levels, similar to the group treated with the reference drug. In the study by Su et al. in 2004 [20], which evaluated a murine model of acute lung injury, ABX treatment also reduced TNF- α levels in bronchoalveolar lavage fluid due to its anti-inflammatory potential. Similar results were observed in the studies by Malerba et al. in 2008 [17] and Beeh et al. in 2008 [21], which reported the anti-inflammatory effect of ABX by reducing TNF- α levels and neutrophil infiltration in the lungs of rats, as well as decreasing the release or production of cytokines such as IL-1 β .

Although the anti-inflammatory mechanism of ABX is not yet well elucidated for other comorbidities, Ferretti et al. in 1992 [22] suggest that ABX may inhibit phosphodiesterase enzymes, which block the production of pro-inflammatory cytokines. Additionally, ABX may also inhibit the activation of the pro-inflammatory transcription factor nuclear factor kappa B (NF- κ B) [21].

4.3 | Antinociceptive Effect

A study conducted in India investigated the neuroprotective and antinociceptive effects of ABX in a rat model of oxaliplatin-induced neuropathic pain [13]. To assess the outcomes in animals, biochemical parameters were analyzed, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), superoxide anion generation in the sciatic nerve, and myeloperoxidase (MPO) activity. Additionally, behavioral tests were conducted to evaluate nociception: the hot plate test (thermal hyperalgesia of the paw), the acetone drop test (cold allodynia of the paw), and the tail immersion test in cold water (cold hyperalgesia of the tail) [23–25].

Thus, the study observed that pharmacological co-treatment with ABX effectively improved oxaliplatin-induced neuropathic pain, as ABX significantly alleviated hyperalgesia and pain-related allodynia behaviors in rats. This finding is supported by evidence demonstrating that ABX possesses antinociceptive, antioxidant, and anti-inflammatory properties [10, 26]. The neuroprotective and antinociceptive potential of ABX can be

attributed to the reduction of oxidative stress markers, inflammatory mediators, and the inhibition of voltage-gated sodium channels in chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain [13].

Other studies have also evaluated the antinociceptive effect of ABX, such as the study by Hama et al. in 2010 [11], which investigated this effect in rats with spinal cord injury-induced neuropathic pain. Similar to other studies, the antinociceptive effect was assessed through behavioral tests, including the mechanical hypersensitivity test and the heat hypersensitivity test [27, 28].

The results regarding the antinociceptive effect of ABX showed that the highest dose (1000 mg/kg) significantly reversed mechanical hypersensitivity, starting 30 min after administration and persisting for at least 3 h ($p < 0.05$). Regarding heat withdrawal latency, an increase in withdrawal latencies was observed in rats treated with 300 mg/kg of ABX, while a partial reversal of heat hypersensitivity was noted 90 min after administration of a dose of 100 mg/kg [11].

We highlight that this review is the first to comprehensively examine the activity of ABX in three distinct actions: anti-inflammatory, analgesic, and antioxidant in experimental models of various non-pulmonary diseases, revealing a promising therapeutic potential for managing inflammation, pain, and oxidative stress in different tissues. However, some limitations should be considered, such as the limited number of recent publications, methodological heterogeneity among the included studies, and a potential publication bias due to the small sample size in the analysis. Nevertheless, these biases were minimized through an extensive search of the international literature.

5 | Conclusion

Although ABX has been used for decades as a mucolytic and expectorant in the treatment of respiratory diseases, few studies have explored its use for other purposes. Nonetheless, this systematic review underscores its therapeutic potential as an antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive agent, emphasizing its versatility in experimental models of diseases not related to the respiratory system.

The reviewed studies indicate that ABX exerts beneficial effects in various pathological conditions, acting as an antioxidant modulator by increasing the levels of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, and GSH while reducing oxidative stress markers like MDA. Regarding inflammation, ABX reduced pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and increased the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10. It also prevented histological damage, edema, and inflammation and contributed to maintaining redox balance. As for its antinociceptive effect, ABX reduced hyperalgesia and allodynia, possibly through the inhibition of voltage-gated sodium channels.

However, some limitations must be considered. Methodological heterogeneity, a limited number of recent studies, and the overall scarcity of publications restrict the generalization of findings and hinder the feasibility of more robust analyses, such as a meta-analysis.

Finally, it is important to highlight the relevance of ABX as a promising therapeutic agent for the treatment of inflammatory, oxidative, and pain-related conditions. However, further experimental research on non-pulmonary diseases, as well as well-designed clinical trials, is essential to validate its efficacy.

Author Contributions

Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita and João Batista Santos Garcia conceived the idea for the review, defined the guiding question and inclusion/exclusion criteria, and supervised the study. Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita, Anne Caroline Silva Nogueira da Cruz, and Rafael de Abreu Lima developed the protocol, registered the review, and assisted in defining the search, selection, and data extraction methods. Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita, Joana Tenório-Meireles, Arney José Nogueira Farias, and Isabela Nogueira Santos conducted the database search, applying strategies and filters. Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita and João Batista Santos Garcia reviewed the titles and abstracts for study selection. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes assisted in screening and resolved author discrepancies. Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita, Gustavo Frota, and Taciana Gabrielle Pinheiro de Moura Carvalho extracted and organized the data from the included articles. Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita, Jorge Antônio Meireles-Teixeira, and Rafael Cardoso Carvalho assessed the risk of bias, analyzed the data, and assisted in writing the results. Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita, Rafael Antônio Freire Carvalho, and Tereza Prazeres reviewed the text, translated it, ensured compliance with the journal's guidelines, submitted the manuscript, and followed the editorial process.

Funding

The authors have nothing to report.

Acknowledgements

The Article Processing Charge for the publication of this research was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) (ROR identifier: 00x0ma614).

Ethics Statement

Ethical approval was not required for this systematic review as it did not involve human or animal subjects.

Consent

The authors have nothing to report.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supporting information files. Additional details can be provided upon reasonable request.

Permission to Reproduce Material From Other Sources

No previously published material requiring permission for reproduction was used in this study.

Clinical Trial Registration

The authors have nothing to report.

References

1. S. Pushpakom, F. Iorio, P. A. Eyers, et al., "Drug Repurposing: Progress, Challenges and Recommendations," *Nature Reviews. Drug Discovery* 18, no. 1 (2018): 41–58, <https://doi.org/10.1038/NRD.2018.168>.
2. L. Cai, C. Lu, J. Xu, et al., "Drug Repositioning Based on the Heterogeneous Information Fusion Graph Convolutional Network," *Briefings in Bioinformatics* 22, no. 6 (2021): bbab319, <https://doi.org/10.1093/BIB/BBAB319>.
3. D. Cazan, L. Klimek, A. Sperl, M. Plomer, and S. Kölsch, "Safety of Ambroxol in the Treatment of Airway Diseases in Adult Patients," *Expert Opinion on Drug Safety* 17, no. 12 (2018): 1211–1224, <https://doi.org/10.1080/14740338.2018.1533954>.
4. Ç. Gültekin, S. Sayiner, Ş. Çetinel, and A. Ö. Şehirli, "Does Ambroxol Alleviate Kidney Ischemia-Reperfusion Injury in Rats?," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 26, no. 8 (2022): 1037–1041, <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.64330.14148>.
5. Ministério da Saúde, "Methodological Guidelines: Elaboration of Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials," (2021).
6. M. Ouzzani, H. Hammady, Z. Fedorowicz, and A. Elmagarmid, "Rayyan-A Web and Mobile App for Systematic Reviews," *Systematic Reviews* 5, no. 1 (2016): 1–10, <https://doi.org/10.1186/S13643-016-0384-4/FIGURES/6>.
7. M. J. Saadh, M. Haddad, M. F. Dababneh, M. F. Bayan, and B. A. Al-Jaidi, "A Guide for Estimating the Maximum Safe Starting Dose and Conversion It Between Animals and Humans," *Systematic Reviews in Pharmacy* 11, no. 8 (2020): 99–104.
8. C. R. Hooijmans, M. M. Rovers, R. B. M. De Vries, M. Leenaars, M. Ritskes-Hoitinga, and M. W. Langendam, "SYRCLE's Risk of Bias Tool for Animal Studies," *BMC Medical Research Methodology* 14, no. 1 (2014): 1–9, <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43/TABLES/4>.
9. V. Štětínová, V. Herout, and J. Květina, "In Vitro and In Vivo Antioxidant Activity of Ambroxol," *Clinical and Experimental Medicine* 4, no. 3 (2004): 152–158, <https://doi.org/10.1007/S10238-004-0050-3>.
10. W. Gaida, K. Klinder, K. Arndt, and T. Weiser, "Ambroxol, a Nav1.8-Preferring Na⁺ Channel Blocker, Effectively Suppresses Pain Symptoms in Animal Models of Chronic, Neuropathic and Inflammatory Pain," *Neuropharmacology* 49, no. 8 (2005): 1220–1227, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.08.004>.
11. A. T. Hama, A. W. Plum, and J. Sagen, "Antinociceptive Effect of Ambroxol in Rats With Neuropathic Spinal Cord Injury Pain," *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 97, no. 2 (2010): 249–255, <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.08.006>.
12. K. Jiang, X. Wang, X. Mao, et al., "Ambroxol Alleviates Hepatic Ischemia Reperfusion Injury by Antioxidant and Antiapoptotic Pathways," *Transplantation Proceedings* 45, no. 6 (2013): 2439–2445, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.04.007>.
13. H. C. Bhardwaj, M. Arunachalam, S. L. Hari Kumar, and S. Navis, "Neuroprotective and Anti-Nociceptive Potential of Ambroxol in Oxaliplatin Induced Peripheral Neuropathic Pain in Rats," *Biology and Medicine* 8, no. 2 (2016): 1000268, <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000268>.
14. S. Sunkari, S. Thatikonda, V. Pooladanda, V. S. Challa, and C. Godugu, "Protective Effects of Ambroxol in Psoriasis Like Skin Inflammation: Exploration of Possible Mechanisms," *International Immunopharmacology* 71 (2019): 301–312, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.035>.
15. E. N. Barut, S. Engin, B. Barut, et al., "Uroprotective Effect of Ambroxol in Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Mice," *International Urology and Nephrology* 51, no. 5 (2019): 803–810, <https://doi.org/10.1007/S11255-019-02128-Y>.
16. T. Tamura, T. Yokoyama, and K. Ohmori, "Effects of Diacerein on Indomethacin-Induced Gastric Ulceration," *Pharmacology* 63, no. 4 (2001): 228–233, <https://doi.org/10.1159/000056138>.

17. M. Malerba and B. Ragnoli, "Ambroxol in the 21st Century: Pharmacological and Clinical Update," *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4, no. 8 (2008): 1119–1129, <https://doi.org/10.1517/17425255.4.8.1119>.
18. D. Nowak, A. Antczak, M. Król, P. Bialasiewicz, and T. Pietras, "Antioxidant Properties of Ambroxol," *Free Radical Biology & Medicine* 16, no. 4 (1994): 517–522, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90130-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90130-9).
19. L. van der Fits, S. Mourits, J. S. A. Voerman, et al., "Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis," *Journal of Immunology* 182, no. 9 (2009): 5836–5845, <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0802999>.
20. X. Su, L. Wang, Y. Song, and C. Bai, "Inhibition of Inflammatory Responses by Ambroxol, a Mucolytic Agent, in a Murine Model of Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide," *Intensive Care Medicine* 30, no. 1 (2004): 133–140, <https://doi.org/10.1007/S00134-003-2001-Y>.
21. K. M. Beeh, J. Beier, A. Esperester, and L. D. Paul, "Antiinflammatory Properties of Ambroxol," *European Journal of Medical Research* 13, no. 12 (2008): 557–562.
22. C. Ferretti, G. Coppi, M. Blengio, and E. Genazzani, "Inhibitory Effect of Theophylline, Theophylline-7-Acetic Acid, Ambroxol and Ambroxol-Theophylline-7-Acetate on Rat Lung cAMP Phosphodiesterase Isoenzymes," *International Journal of Tissue Reactions* 14, no. 1 (1992): 31–36.
23. Y. Choi, Y. W. Yoon, H. S. Na, S. H. Kim, and J. M. Chung, "Behavioral Signs of Ongoing Pain and Cold Allodynia in a Rat Model of Neuropathic Pain," *Pain* 59, no. 3 (1994): 369–376.
24. R. Necker and R. F. Hellon, "Noxious Thermal Input From the Rat Tail: Modulation by Descending Inhibitory Influences," *Pain* 4 (1977): 231–242, [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90135-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90135-X).
25. N. B. Eddy, C. F. Touchberry, and J. E. Lieberman, "Synthetic Analgesics; Methadone Isomers and Derivatives," *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 98, no. 2 (1950): 121–137.
26. K. Felix, M. Pairet, and R. Zimmermann, "The Antioxidative Activity of the Mucoregulatory Agents: Ambroxol, Bromhexine and N-Acetyl-L-Cysteine. A Pulse Radiolysis Study," *Life Sciences* 59, no. 14 (1996): 1141–1147, [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(96\)00431-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00431-6).
27. S. R. Chaplan, F. W. Bach, J. W. Pogrel, J. M. Chung, and T. L. Yaksh, "Quantitative Assessment of Tactile Allodynia in the Rat Paw," *Journal of Neuroscience Methods* 53, no. 1 (1994): 55–63, [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9).
28. K. Hargreaves, R. Dubner, F. Brown, C. Flores, and J. Joris, "A New and Sensitive Method for Measuring Thermal Nociception in Cutaneous Hyperalgesia," *Pain* 32, no. 1 (1988): 77–88, [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7).

4.2 Capítulo 2

Therapeutic Potential of Ambroxol in Osteoarthritis: A Drug Repurposing Study

Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita ^{1*}, Anne Caroline Silva Nogueira da Cruz ², Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita Meireles Teixeira ³, Amanda Tissore Forwille Reis ⁴, Gustavo Medeiro Frota ⁵, Taciana Gabrielle Pinheiro de Moura Carvalho ⁶, Rafael Antônio Freire Carvalho ⁷, Jorge Antônio Meireles Teixeira ⁸, Marcelo Souza de Andrade ⁹, Rafael Cardoso Carvalho ¹⁰, Eduardo Martins de Sousa ¹¹, Joicy Cortez de Sá Sousa ¹², Sebastiao Vieira de Moraes ¹³, Eduardo Rodrigues Silva ¹⁴, Maria do Socorro de Sousa Cartágenes ¹⁵ and João Batista Santos Garcia ¹⁶

¹ Professor at the Federal University of Maranhao (UFMA) and Post-Graduate Program in Health Sciences (UFMA), Medicine Department I, Sao Luis, Maranhao, Brazil; michelline.joana@ufma.br

² Federal University of Maranhao, Post-Graduate Program in Health Sciences, Sao Luis, Maranhao, Brazil; anne_caroliness@hotmail.com

³ University CEUMA, Medical Student, Sao Luis, Maranhao; tenoriojoana04@gmail.com

⁴ Graduated in Pharmacy from Federal University of Maranhao Sao Luis, Maranhao, Brazil; amanda.forwille@discente.ufma.br

⁵ Federal University of Maranhao, Graduate Program in Biotechnology – RENORBIO, Sao Luis, Maranhao, Brazil; gustavo.frota@discente.ufma.br

⁶ Professor at the Federal University of Maranhao (UFMA), Medicine Department I, Sao Luis, Maranhao, Brazil; taciana.moura@ufma.br

⁷ Professor at the Federal University of Maranhao (UFMA), Medical School – Pinheiro Campus, Pinheiro, Maranhao, Brazil; rafael.afc@ufma.br

⁸ Professor at the Federal University of Maranhao (UFMA), Medicine Department I, Sao Luis, Maranhao, Brazil; jorge.meireles@ufma.br

⁹ Laboratory of Molecular Biology (Labiomol), Post graduation Program in Adult Health (PPGSAD), Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brazil; marcelo.andrade@ufma.br

¹⁰ Professor at the Federal University of Maranhao (UFMA); carvalho.rafael@ufma.br

¹¹ PhD. Permanent Professor in the Graduate Program in Applied Biosciences to Health, CEUMA University, São Luís, MA; eduardo.martins@ceuma.br

¹² Special Coordination of Morphology (CEMOR/CCBS/UFMA); Graduate Program in Health Sciences – PPGCS, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brazil; joicy.sa@ufma.br

¹³ Professor at the Federal University of Maranhao (UFMA), Medicine Department II, Sao Luis, Maranhao, Brazil; svmcoluna@gmail.com

¹⁴ Federal University of Maranhao, Graduate Program in Biotechnology – RENORBIO, Sao Luis, Maranhao, Brazil. eduardo.rs@discente.ufma.br

¹⁵ Professor at the Federal University of Maranhao, Physiological Sciences Department, Sao Luis, Maranhao, Brazil; cartagenes.maria@ufma.br

¹⁶ Professor at the Federal University of Maranhao, Medicine Department II, Sao Luis, Maranhao, Brazil; joao.garcia@ufma.br

Artigo publicado no periódico: Pharmaceuticals

ISSN: 1424-8247

Qualis:A2

Fator de Impacto: 4,8



Article

Therapeutic Potential of Ambroxol in Osteoarthritis: A Drug Repurposing Study

Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita ^{1,*} , Anne Caroline Silva Nogueira da Cruz ², Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita Meireles Teixeira ³, Amanda Tissore Forwille Reis ⁴ , Gustavo Medeiro Frota ⁵ , Taciana Gabrielle Pinheiro de Moura Carvalho ⁶, Rafael Antônio Freire Carvalho ⁷ , Jorge Antônio Meireles Teixeira ⁶, Marcelo Souza de Andrade ⁸ , Rafael Cardoso Carvalho ⁹ , Eduardo Martins de Sousa ¹⁰ , Joicy Cortez de Sá Sousa ¹¹, Sebastião Vieira de Moraes ¹², Eduardo Rodrigues Silva ⁵ , Maria do Socorro de Sousa Cartágenes ¹³ and João Batista Santos Garcia ¹²

- ¹ Post-Graduate Program in Health Sciences (UFMA), Medicine Department I, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil
 - ² Post-Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil; anne_caroliness@hotmail.com
 - ³ Medical School, University CEUMA, São Luís 65075-120, MA, Brazil; tenoriojoana04@gmail.com
 - ⁴ College of Pharmacy, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil; amanda.forwille@discente.ufma.br
 - ⁵ Graduate Program in Biotechnology—RENORBIO, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil; gustavo.frota@discente.ufma.br (G.M.F.); eduardo.rs@discente.ufma.br (E.R.S.)
 - ⁶ Medicine Department I, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil; taciana.moura@ufma.br (T.G.P.d.M.C.); jorge.meireles@ufma.br (J.A.M.T.)
 - ⁷ Medical School, Pinheiro Campus, Federal University of Maranhão (UFMA), Pinheiro 65200-000, MA, Brazil; rafael.afc@ufma.br
 - ⁸ Laboratory of Molecular Biology (Labiomol), Post Graduation Program in Adult Health (PPGSAD), Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil; marcelo.andrade@ufma.br
 - ⁹ Special Coordination in Biological and Health Sciences I, Center for Biological and Health Sciences (CCBS), Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil; carvalho.rafael@ufma.br
 - ¹⁰ Graduate Program in Applied Biosciences to Health, University CEUMA, São Luís 65075-120, MA, Brazil; eduardo.martins@ceuma.br
 - ¹¹ Special Coordination of Morphology (CEMOR/CCBS/UFMA), Graduate Program in Health Sciences—PPGCS, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil; joicy.sa@ufma.br
 - ¹² Medicine Department II, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil; svmcoluna@gmail.com (S.V.d.M.); joao.garcia@ufma.br (J.B.S.G.)
 - ¹³ Physiological Sciences Department, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís 65080-805, MA, Brazil; cartagenes.maria@ufma.br
- * Correspondence: michelline.joana@ufma.br; Tel.: +55-(98)-98124-6777

Abstract

Background/Objectives: Ambroxol is a mucolytic agent widely used in the treatment of respiratory diseases; however, evidence in the literature indicates anti-inflammatory, analgesic, and immunomodulatory properties, suggesting potential for therapeutic repurposing. This study aimed to evaluate the analgesic and anti-inflammatory effects of ambroxol in an experimental model of osteoarthritis (OA). **Methods:** Adult male Wistar rats underwent OA induction on day zero (D0) by sodium monoiodoacetate (MIA) injection and were allocated into the following groups: Healthy, negative control (CTRL−), and groups treated with meloxicam (2 mg/kg) or ambroxol (10, 50, and 100 mg/kg). Treatments were administered orally (gavage) once daily for 28 days. Behavioral tests were performed, including rotarod, walkway gait analysis, weight-bearing, Von Frey, and Rat Grimace Scale assessments, along with radiographic and histopathological analyses and quantification of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, and IL-10). **Results:**



Academic Editors: Maria Matilde Soares Duarte Marques and Dinender K. Singla

Received: 24 February 2026

Revised: 29 March 2026

Accepted: 17 April 2026

Published: 27 April 2026

Copyright: © 2026 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the [Creative Commons Attribution \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

Ambroxol treatment improved nociceptive parameters and motor function, reduced radiographic and histopathological scores, and showed performance comparable to meloxicam in several tests. There was a marked reduction in IL-1 β and IL-6 levels, while IL-10 levels were lower in ambroxol-treated groups, suggesting early control of the inflammatory response. **Conclusions:** The results indicate that ambroxol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory actions and suggest a potential chondroprotective effect, reinforcing its viability as a candidate for therapeutic repositioning in osteoarthritis. Further studies are required to more precisely elucidate its mechanisms of action, define optimal dosing and treatment duration, and support translation to clinical models.

Keywords: ambroxol; drug repurposing; experimental osteoarthritis; inflammation; chronic pain

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a multifactorial joint disease resulting from an imbalance between the processes of cartilage degradation and regeneration, influenced by biomechanical, inflammatory, genetic, and metabolic factors. It is characterized by the progressive degeneration of articular cartilage, remodeling of the subchondral bone, inflammation of the synovial membrane, and alterations in periarticular tissues. Among these structures, articular cartilage is the most affected, playing a central role in the pathophysiology of the disease [1,2].

The initial event of cartilage degradation has not yet been completely established. However, it is known that articular cartilage has a low regenerative capacity because it is avascular, aneural, and alymphatic. In this context, repetitive mechanical overload or joint trauma may induce microlesions in the subchondral bone, promoting joint instability. Tissue aging also contributes to the establishment of cellular senescence, characterized by the permanent interruption of the cell cycle of chondrocytes and synoviocytes. These cells begin to maintain a metabolically active state, secreting inflammatory mediators and degradative enzymes that compromise the integrity of the extracellular matrix and favor the progression of the articular degenerative process [1–3].

The progression of osteoarthritis (OA) is strongly mediated by inflammatory processes, in which pro-inflammatory cytokines, particularly interleukin-1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6), produced by chondrocytes and synoviocytes activated in response to cartilage and subchondral bone injury, stimulate the production of proteolytic enzymes, such as matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases of the ADAMTs family. These enzymes are responsible for the degradation of structural components of cartilage, including type II collagen and aggrecan, directly contributing to the deterioration of the extracellular matrix [1,4].

Concomitantly, there is an increase in oxidative stress with the production of reactive oxygen species and nitric oxide, as well as activation of the arachidonic acid pathway and cyclooxygenase-2 (COX-2), culminating in the production of prostaglandin E2 (PGE2), a mediator associated with inflammation, joint pain, and the progression of cartilage degradation [5–7].

In response to this inflammatory environment, anti-inflammatory cytokines, such as interleukin-10 (IL-10), are produced as a compensatory mechanism, acting to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines and to reduce the expression of matrix-degrading enzymes. However, in osteoarthritis, these regulatory mechanisms are generally insuffi-

cient to neutralize the intense catabolic activity present in the articular microenvironment, thereby favoring the structural progression of the disease [5].

Given this complex inflammatory and degenerative environment, the treatment of osteoarthritis primarily aims to control pain, reduce low-grade inflammation, and prevent the structural progression of the disease. To achieve these goals, both non-pharmacological and pharmacological interventions are used, including analgesics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), corticosteroids, and hyaluronic acid. Among these options, NSAIDs and selective inhibitors of the cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme are the most frequently employed due to their action in reducing inflammatory prostaglandins. However, these medications are often associated with significant adverse effects, including cardiovascular and gastrointestinal complications [8,9].

The therapeutic limitations and safety profile of these approaches reinforce the need for safer and more effective pharmacological strategies for the management of osteoarthritis. In this context, drug repurposing has emerged as a promising strategy, as it seeks new applications for already approved medications, thereby reducing costs and development time [10,11].

Ambroxol (trans-4-(2-amino-3,5-dibromobenzylamino)-cyclohexanol), an active metabolite of bromhexine, has attracted increasing scientific interest due to its broad pharmacological spectrum. Experimental and clinical evidence demonstrate that this drug exhibits anti-inflammatory, local analgesic, antioxidant, and antimicrobial properties, in addition to stimulating the production of pulmonary surfactant. Additionally, ambroxol presents a favorable safety profile, even when administered at high doses [12,13].

Studies demonstrate that ambroxol can reduce the production of important pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6, in addition to increasing the expression of anti-inflammatory cytokines, such as interleukin-10 (IL-10), suggesting a relevant role in the regulation of the inflammatory response [14–17]. The reduction in these pro-inflammatory cytokines may also indirectly influence cartilage metabolism, since mediators such as IL-1 β and IL-6 stimulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and aggrecanases, enzymes directly involved in the degradation of structural components of cartilage [4,18–20].

Several experimental studies have investigated the anti-inflammatory potential of ambroxol in different models of inflammatory and immune-mediated diseases. In an experimental model of cyclophosphamide-induced cystitis, treatment with ambroxol significantly reduced TNF- α levels and promoted improvement in the histopathological parameters of the tissue. Similar results were observed in models of psoriasis-like cutaneous inflammation and in models of inflammatory colitis, in which ambroxol was able to reduce inflammatory cytokines, decrease oxidative stress, and attenuate tissue damage. These findings reinforce the concept that ambroxol may act as a multifunctional immunomodulatory agent capable of modulating inflammatory cascades and oxidative processes in different pathological contexts [17,21,22].

Considering that osteoarthritis involves a complex interaction between chronic inflammation, oxidative stress, and progressive degradation of articular cartilage, drugs capable of modulating these mechanisms represent promising candidates for therapeutic repurposing strategies. In this context, the anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory properties of ambroxol provide a plausible mechanistic rationale for investigating its effects in osteoarthritis. Thus, the present study investigated the anti-inflammatory and antinociceptive potential of ambroxol in an experimental model of osteoarthritis induced by sodium monoiodoacetate (MIA) in rat knees.

2. Results

2.1. Behavioral and Functional Assessments

Motor performance, assessed by the rotarod test, showed a reduction in motor activity in the negative control group (CTRL–) at D7 following osteoarthritis induction. In contrast, animals treated with ambroxol at doses of 10, 50, and 100 mg/kg exhibited a progressive recovery of locomotor function, with the 10 mg/kg and 100 mg/kg doses showing more pronounced effects that were maintained up to D28 compared with the CTRL– group. The response profile of ambroxol was comparable to that observed with meloxicam (Figure 1A).

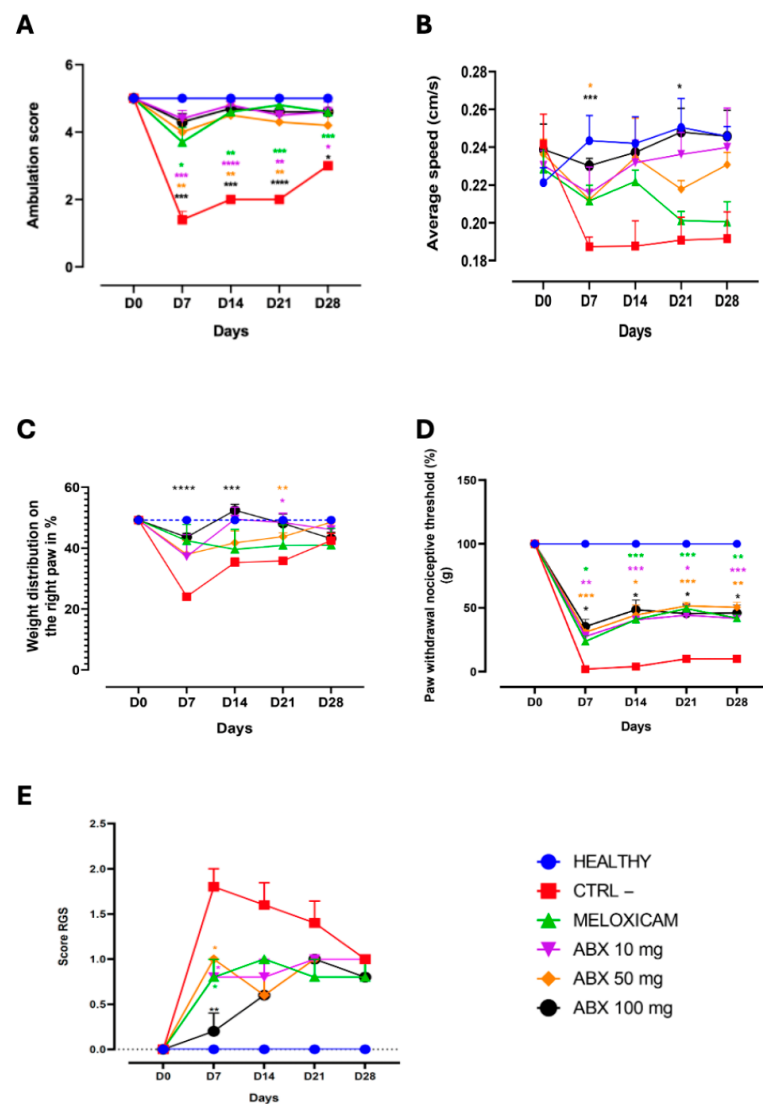


Figure 1. Behavioral and nociceptive assessment in rats with MIA-induced osteoarthritis treated with ambroxol (10, 50, and 100 mg/kg) or meloxicam. (A) Rotarod test for evaluation of motor activity and coordination; (B) gait analysis to assess mean locomotion velocity; (C) weight-bearing test for measurement of spontaneous postural pain; (D) mechanical paw withdrawal threshold assessed using the Von Frey test; (E) spontaneous pain evaluation using the Rat Grimace Scale (RGS). Assessments were performed on days 0, 7, 14, 21, and 28 after osteoarthritis induction with monoiodoacetate

(MIA). Animals treated with ambroxol showed progressive improvement in locomotor parameters and a reduction in behavioral pain indicators compared with the negative control group (CTRL−), suggesting an analgesic effect and attenuation of functional impairment associated with the experimental osteoarthritis model. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, with $n = 5$ animals per group. Symbols indicate statistically significant differences compared with the CTRL− group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$), with colors matching the respective groups. Statistical comparisons were performed using two-way repeated-measures ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

In the spontaneous gait analysis on the walkway, the CTRL− group showed a reduction in mean walking speed from D7 onward, indicating functional impairment. In contrast, ambroxol-treated groups maintained higher mean velocities than the CTRL− group at all evaluated time points, with the 50 mg/kg and 100 mg/kg doses showing statistically significant differences at D7. Notably, the 100 mg/kg dose maintained statistical significance at D21, suggesting preservation of motor performance (Figure 1B).

In the incapacitance (weight-bearing) test, the CTRL− group showed a reduction in weight distribution on the affected paw at D7, confirming increased pain. Ambroxol treatment promoted a dose- and time-dependent functional recovery. The 100 mg/kg dose induced a faster and more pronounced recovery from D7 onward, maintaining a statistically significant difference compared with the CTRL− group up to D14. The 50 mg/kg and 10 mg/kg doses showed statistically significant differences at D21 (Figure 1C).

Mechanical allodynia assessed by the von Frey test demonstrated that ambroxol increased the nociceptive threshold compared with the CTRL− group from D7 onward. Doses of 10, 50, and 100 mg/kg produced early and sustained antinociceptive effects comparable to those observed with meloxicam, indicating a consistent and long-lasting analgesic effect (Figure 1D).

Spontaneous pain, assessed by the Rat Grimace Scale (RGS), showed a marked increase in scores in the CTRL− group following OA induction at D7. All ambroxol-treated groups, as well as the meloxicam group, exhibited a significant reduction in facial pain scores at D7, with ambroxol-treated animals displaying facial expressions comparable to those observed in the meloxicam-treated group, which was the reference drug. The most pronounced effect was observed at the 100 mg/kg dose. At D14 and D21, ambroxol- and meloxicam-treated groups maintained low RGS values, indicating sustained antinociceptive effects over time (Figure 1E).

2.2. Radiographic and Histological Evaluation

Radiographic and histological analyses revealed a consistent pattern of joint degeneration in animals from the CTRL− group and a protective effect in groups treated with ambroxol and meloxicam. Radiographic evaluation demonstrated that ambroxol exerted a dose-dependent effect. The group treated with ambroxol at 100 mg/kg showed a significant reduction in Kellgren–Lawrence (KL) scores compared with the CTRL− group from D14 onward, maintaining sustained improvement up to D28, indicating an effect on limiting osteoarthritis progression. The 50 mg/kg dose significantly reduced KL scores compared with the CTRL− group at D21 and D28, exhibiting a radiographic pattern similar to that observed with meloxicam, thus demonstrating efficacy, although with a later onset of response compared with the higher ambroxol dose (Figure 2).

The histological analysis corroborated the radiographic findings, revealing marked differences in cartilage architecture among the experimental groups. The healthy group preserved intact cartilage structure with well-organized chondrocytes (Figure 3A–C), whereas the negative control group (CTRL−) exhibited extensive chondral lesions, fissuring in the deep cartilage layer, fragmented tidemark, chondrocyte depletion, and the presence

of osteoprogenitor cells and osteoclasts (Figure 3D–F). The meloxicam and ambroxol 10 and 50 mg/kg groups (Figure 3G–O) showed superficial fibrillation with preservation of cellularity. In contrast, the ambroxol 100 mg/kg group displayed cartilage morphology similar to that observed in the healthy group, with only rare fibrillations (Figure 3P–R).

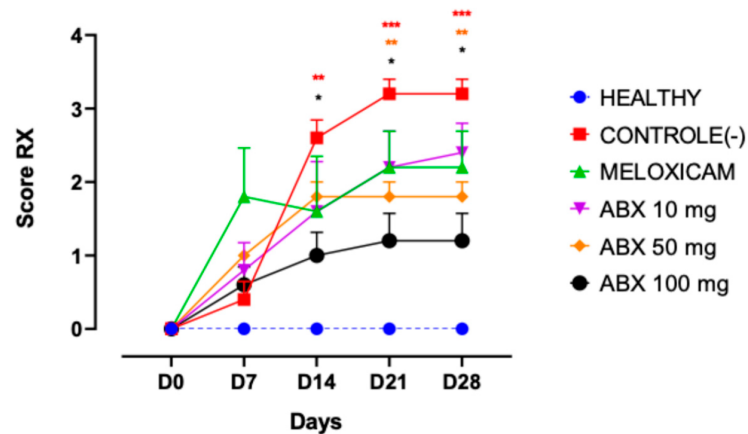


Figure 2. Radiographic evaluation of osteoarthritis progression in rats subjected to sodium monoiodoacetate (MIA)-induced osteoarthritis and treated with ambroxol (10, 50, and 100 mg/kg) or meloxicam. The degree of joint damage was assessed using the Kellgren–Lawrence (KL) radiographic scoring system in the right knee on days 0, 7, 14, 21, and 28 after osteoarthritis induction. Animals treated with ambroxol exhibited lower radiographic scores over time compared with the negative control group (CTRL–), indicating attenuation of structural joint deterioration associated with the experimental osteoarthritis model. Data are expressed as mean $\pm$ SEM, with $n = 5$ animals per group. Statistical comparisons were performed using two-way repeated-measures ANOVA followed by Tukey’s post hoc test. Statistically significant differences compared with the CTRL– group are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. The colors of the asterisks correspond to the respective experimental groups.

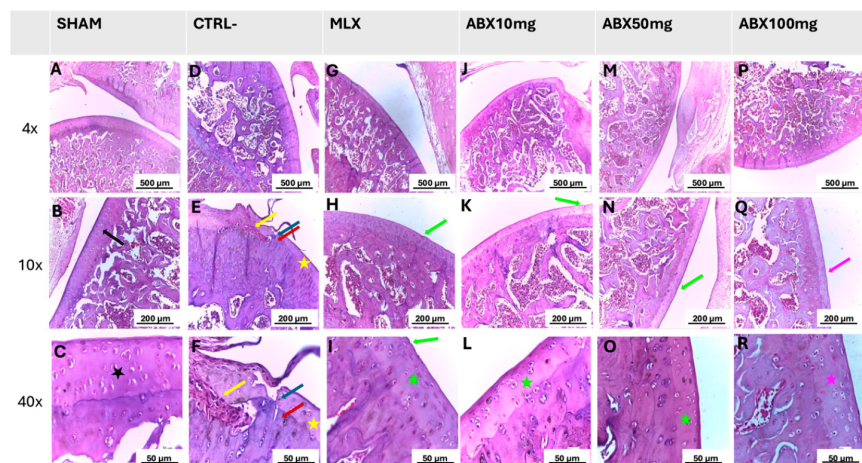


Figure 3. Histological evaluation of knee articular cartilage in rats subjected to the experimental model of osteoarthritis induced by sodium monoiodoacetate (MIA). Composite panel of representative images from the following groups: HEALTHY (A–C), negative control (CTRL–; D–F), meloxicam (MLX; G–I), ambroxol 10 mg/kg (ABX10; J–L), ambroxol 50 mg/kg (ABX50; M–O), and ambroxol 100 mg/kg (ABX100; P–R). The samples were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed

at magnifications of 4×, 10×, and 40×, with corresponding scale bars of 500 µm (4×), 200 µm (10×), and 50 µm (40×). In animals from the HEALTHY group (A–C), preservation of cartilage architecture is observed, with intact cartilage [■] and organized chondrocytes [★]. In contrast, the CTRL– group (D–F) exhibits degenerative alterations consistent with advanced osteoarthritis, including fissuring in the deep cartilage layer [■], fragmented Tidemark [■], chondrocyte depletion [★], and the presence of osteoprogenitor cells and osteoclasts [■]. The groups treated with MLX (G–I), ABX 10 mg/kg (J–L), and ABX 50 mg/kg (M–O) show mild areas of superficial fibrillation [■] and intact cells [★], suggesting attenuation of the degenerative changes induced by MIA. In the group treated with ABX 100 mg/kg (P–R), an almost intact articular surface is observed, with rare fibrillations, preserved tidemark [■], and intact cells [★], indicating greater preservation of the articular cartilage compared with the negative control group (CTRL–).

The mean Osteoarthritis Research Society International (OARSI) scores were 1.5 ± 0.5 for ambroxol 10 mg/kg; 1.0 ± 0.0 for meloxicam and ambroxol 50 mg/kg; and 0.33 ± 0.33 for ambroxol 100 mg/kg, whereas the CTRL– group exhibited the highest values (2.83 ± 0.33). These results further support that ambroxol promoted structural preservation of articular cartilage comparable to that observed with meloxicam (Figure 4).

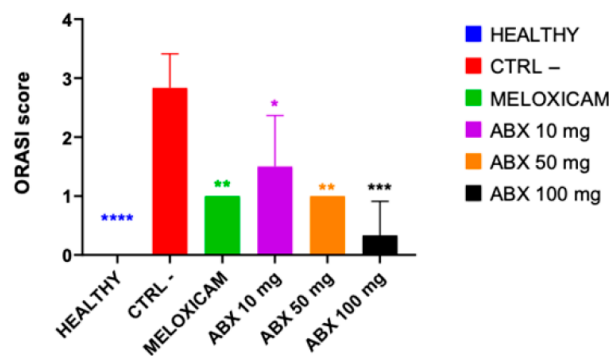


Figure 4. Histological evaluation of articular cartilage using the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) scoring system in rats subjected to the experimental model of osteoarthritis induced by sodium monoiodoacetate (MIA). The scores reflect the degree of articular cartilage degeneration in the different experimental groups: HEALTHY, negative control (CTRL–), meloxicam (MLX), ambroxol 10 mg/kg (ABX10 mg), ambroxol 50 mg/kg (ABX50 mg), and ambroxol 100 mg/kg (ABX100 mg). The CTRL– group showed a significant increase in the OARSI score, indicating a greater degree of cartilage damage following osteoarthritis induction. In contrast, the groups treated with meloxicam and ambroxol exhibited reduced histological scores, suggesting attenuation of degenerative cartilage changes. This effect was more evident in the groups treated with ambroxol at intermediate and higher doses, indicating a potential chondroprotective effect of the drug in the experimental osteoarthritis model. Data are expressed as mean ± SEM, with $n = 5$ animals per group. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Statistical differences are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ compared with the CTRL– group. The colors of the asterisks indicate the respective groups with statistically significant differences.

2.3. Cytokine Quantification

Cytokine quantification showed that the CTRL– group exhibited elevated levels of IL-1β and IL-6 compared with the other groups, indicating an intense systemic inflammatory process. In contrast, animals in the healthy group displayed significantly lower concentrations of these cytokines, confirming the absence of an inflammatory response (Figure 5A,B).

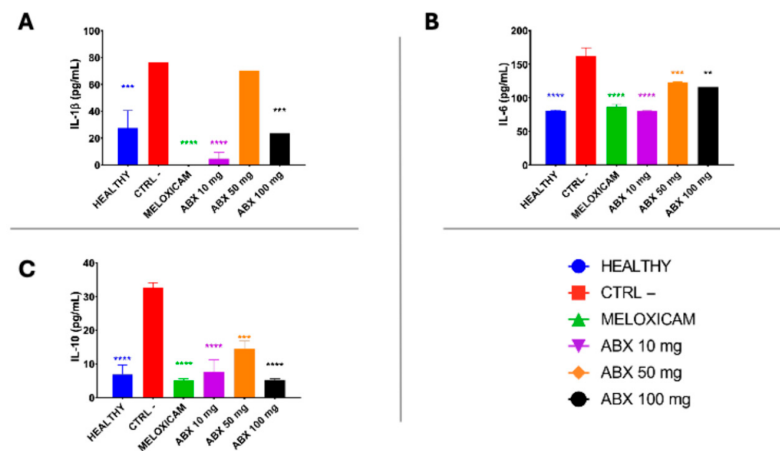


Figure 5. Evaluation of serum levels of systemic inflammatory cytokines in rats subjected to the experimental model of osteoarthritis induced by sodium monoiodoacetate (MIA). (A) IL-1 β ; (B) IL-6; (C) IL-10. Serum cytokine concentrations were determined by ELISA and expressed in pg/mL in the different experimental groups: HEALTHY, negative control (CTRL-), meloxicam (MLX), ambroxol 10 mg/kg (ABX10 mg), ambroxol 50 mg/kg (ABX50 mg), and ambroxol 100 mg/kg (ABX100 mg). The CTRL- group showed a significant increase in the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6, reflecting the systemic inflammatory state associated with experimental osteoarthritis. In contrast, the groups treated with meloxicam and ambroxol demonstrated a significant reduction in these inflammatory mediators. In addition, a relative increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10 was observed, suggesting modulation of the systemic inflammatory profile by the treatment. Data are presented as mean $\pm$ SEM, $n = 5$ animals per group. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Statistical differences are indicated by ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ compared with the CTRL- group. The colors of the asterisks indicate the respective groups with statistically significant differences.

Treatment with meloxicam and ambroxol at doses of 10 and 100 mg/kg promoted a significant reduction in IL-1 β levels compared with the CTRL- group. Regarding IL-6, all treatments significantly reduced serum concentrations when compared with the CTRL- group (Figure 5A,B).

The anti-inflammatory cytokine IL-10 showed significantly lower levels in animals treated with meloxicam and ambroxol at doses of 10, 50, and 100 mg/kg compared with the CTRL- group (Figure 5C), indicating modulation of the immune response by the evaluated treatments.

3. Discussion

The present study demonstrated that ambroxol exerted significant analgesic and anti-inflammatory effects in an experimental model of osteoarthritis (OA) induced by sodium monoiodoacetate (MIA) in rats, in addition to preserving joint integrity. Behavioral assessments revealed a reduction in spontaneous pain and mechanical allodynia, as well as improvements in locomotor performance and weight distribution between the hind paws. Taken together, radiographic, histological, and immunological findings indicated that ambroxol was able to preserve articular structure and modulate the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines, exhibiting efficacy comparable to that of the reference drug meloxicam.

All results obtained were analyzed in comparison with the negative control group (CTRL-). In the functional assessments performed using the rotarod, weight-bearing, and gait analysis tests, progression of osteoarthritis was observed in the negative control

group (CTRL–), characterized by reduced locomotor performance, decreased weight support on the affected limb, and a reduction in mean walking speed starting from day 7. These findings reflect functional impairment resulting from pain and joint degeneration, parameters widely recognized as markers of OA progression [23–25].

However, on day 28, a slight increase in weight-bearing values was observed in the CTRL– group, approaching those of the other groups. This finding may reflect spontaneous compensatory mechanisms typical of chronic pain models, in which animals, even in the presence of persistent pain, tend to develop adaptive weight redistribution strategies over time. This phenomenon has been widely documented in the literature as part of the behavioral adjustments associated with the progression of osteoarthritis [26].

In this study, locomotor performance assessed by the rotarod test was significantly improved in the groups treated with ambroxol. Complementarily, gait analysis demonstrated that treatment with ambroxol at doses of 50 and 100 mg/kg significantly increased walking speed. These findings indicate an improvement in locomotor function, possibly related to the reduction in pain and joint inflammation, factors that play a central role in the functional limitation observed in osteoarthritis. In this context, the analgesic and anti-inflammatory effects previously described for ambroxol may contribute to the preservation of mobility in experimental models of the disease [12,27].

Similar results have been reported in the literature. In a rat model of Parkinson's disease, ambroxol improved motor coordination and locomotor performance, reinforcing its potential modulatory effect on mechanisms associated with motor dysfunction [28].

Corroborating these findings, the weight-bearing test demonstrated a significant improvement in the ability of the affected paw to support weight in the groups treated with ambroxol. The 100 mg/kg dose showed an early and sustained effect, with values approaching those observed in the healthy group. These results are consistent with previous studies describing the ability of ambroxol to effectively suppress pain symptoms in animal models of chronic, inflammatory, and neuropathic pain [12,27].

Considering that functional recovery is directly associated with pain modulation, nociceptive tests using the Von Frey test and the Rat Grimace Scale (RGS) were performed. In the Von Frey test, the groups treated with ambroxol exhibited a progressive and significant increase in the response threshold from the beginning of treatment, indicating an anti-allodynic effect. Similar results have been previously reported in the literature. In a model of chronic inflammatory pain in rats, ambroxol reduced mechanical allodynia and hyperalgesia [28]. In that study, the Von Frey test was also used, in which treated animals showed a significant decrease in nociceptive responses, corroborating the antinociceptive potential of ambroxol.

The results obtained using the Rat Grimace Scale (RGS) revealed a modulation of spontaneous pain by ambroxol. The treated groups showed a reduction in RGS scores over the same period, with significant differences observed at doses of 10, 50, and 100 mg/kg on day 7, displaying a pattern similar to that observed with meloxicam. By day 28, all groups exhibited similar scores, which may be attributed to adaptive neurobehavioral mechanisms and facial desensitization frequently described in chronic pain models [29].

These effects may be related to the ability of ambroxol to inhibit voltage-gated sodium channels, particularly Nav1.8, which are widely expressed in peripheral nociceptive neurons, as well as possible effects on Nav1.9, as previously described in the literature. The modulation of these channels reduces neuronal excitability and peripheral nociceptive transmission, contributing to the reduction in hyperalgesia and mechanical allodynia observed in this study [28,30].

The integration of behavioral outcomes with morphofunctional analyses broadens the understanding of the pathophysiological mechanisms underlying the experimental pain

model and the therapeutic effects of ambroxol. The behavioral tests employed in this study allowed the characterization of both nociceptive and spontaneous pain. Importantly, to the best of our knowledge, the use of walkway gait analysis, the weight-bearing test, and the Rat Grimace Scale (RGS) to evaluate ambroxol in an experimental pain model has not been previously reported in the literature.

Radiographic analysis based on the Kellgren–Lawrence scale demonstrated the progression of joint degeneration throughout the experimental protocol, with the CTRL– group showing a significant increase in scores from day 14 onward, confirming the effectiveness of the MIA-induced osteoarthritis model. In contrast, the groups treated with ambroxol exhibited a delay in the progression of structural changes, particularly at the 100 mg/kg dose, which showed statistically significant differences from day 14 and remained so until day 28, and at the 50 mg/kg dose, which exhibited significantly lower scores from day 21 through to day 28, with performance comparable to that observed with meloxicam.

Radiographic findings suggest that ambroxol may be associated with a delay in the progression of structural articular changes in treated groups; however, to the best of our knowledge, there is no evidence in the literature directly linking its use to radiographic outcomes in osteoarthritis models, meaning that this application is still poorly explored. These effects may be related to previously described pharmacological mechanisms, particularly its anti-inflammatory action mediated by the inhibition of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α , as well as its antioxidant properties through the neutralization of reactive oxygen species (ROS), which reduce oxidative stress, preserve the extracellular matrix, and promote chondrocyte viability, thereby contributing to the attenuation of osteoarthritis progression [21,31,32].

Histological evaluation corroborated the radiographic findings. The CTRL– group exhibited high scores, characterized by marked cartilage degeneration, extracellular matrix disorganization, and loss of chondral architecture. In contrast, ambroxol-treated groups showed a significant reduction in histological scores, indicating preservation of cartilage tissue. The 100 mg/kg dose showed the best performance, whereas the 50 mg/kg dose demonstrated an effect comparable to that of the standard anti-inflammatory agent. The 10 mg/kg dose, although significant compared with the negative control, showed lower efficacy, suggesting a dose-dependent effect. This pattern is supported by previous studies demonstrating greater efficacy of ambroxol at higher doses in controlling inflammation and pain [21,28].

The cytokine analysis revealed the anti-inflammatory profile of ambroxol. Cytokines were quantified in the serum of the animals, allowing a systemic evaluation of the inflammatory response associated with the experimental osteoarthritis model. Although osteoarthritis is predominantly a disease localized to the joint, inflammatory mediators produced in the articular microenvironment can reach the systemic circulation and reflect the inflammatory activity associated with joint degeneration [18,33].

In this context, the CTRL– control group exhibited elevated levels of IL-1 β and IL-6, consistent with a pronounced inflammatory process, whereas the treated groups showed significant reductions in these mediators, particularly IL-1 β at doses of 10 and 100 mg/kg and IL-6 at all tested doses, with effects comparable to those observed with meloxicam. These results reinforce the ability of ambroxol to modulate joint inflammation through the inhibition of key pro-inflammatory cytokines involved in cartilage degradation, such as IL-1 β and IL-6, in agreement with previous evidence reported in the literature [16,21,32,34].

Regarding IL-10, an anti-inflammatory cytokine, it was observed that the CTRL– group exhibited the highest concentrations, whereas the groups treated with meloxicam and ambroxol showed significantly lower levels, similar to those observed in the healthy

group. The lower production of this cytokine in the treated groups may reflect a reduction in the primary inflammatory stimulus, since IL-10, despite its anti-inflammatory role, may also act as a marker of the intensity of the inflammatory response under established pathological conditions. Thus, elevated IL-10 levels in the untreated group may represent a compensatory mechanism in response to exacerbated inflammation, whereas the reduction observed in the treated groups may indicate better control of the inflammatory process, with a reduced need for activation of immunoregulatory mechanisms [35].

Additionally, a previous study investigating a model of severe pediatric pneumonia demonstrated that elevated IL-10 levels were associated with greater inflammatory severity and that their reduction following treatment with ambroxol corresponded to a marker of clinical improvement [35]. Although this model represents a distinct pathological context, these findings suggest that a decrease in IL-10 may occur in scenarios in which attenuation of the primary inflammatory stimulus reduces the need for compensatory anti-inflammatory responses.

The integration of radiographic, histological, and immunological findings suggests that the chondroprotective effects of ambroxol are largely attributable to its anti-inflammatory and immunomodulatory actions on the articular microenvironment. The reduction in IL-1 β and IL-6 in the treated groups reflects the suppression of pro-inflammatory mediators directly involved in cartilage degradation and in the activation of chondrocytes and osteoclasts, in agreement with the lower radiographic and histological scores, which indicate preservation of chondral architecture. Although the present study did not directly evaluate the tissue distribution of the drug within the joint, it is plausible that the systemic modulation of these inflammatory mediators contributes to the reduction in the catabolic environment associated with cartilage degradation.

Considering the translational potential of these findings, the interpretation of the doses used in this study should be analyzed within the context of interspecies dose equivalence. The ambroxol doses were defined based on previously published preclinical data and on calculations of animal equivalent dose (AED), using allometric scaling recommended by the guidelines of the U.S. Food and Drug Administration [36,37]. According to these principles, the maximum dose used in this study (100 mg/kg/day) corresponds approximately to a human dose considered safe of up to 1000 mg/day. Previous clinical studies have demonstrated that ambroxol presents a favorable safety profile even under high-dose regimens, suggesting that the pharmacological exposure observed in this experimental model may be plausible from a translational perspective [28,38]. However, further pharmacokinetic investigations and additional clinical studies are necessary to determine the therapeutic feasibility of this strategy in the context of osteoarthritis.

Despite the promising results observed in this study, some limitations should be considered. The absence of the evaluation of other relevant cytokines, such as TNF- α , and mediators, including NF- κ B, MMP-13, and ADAMTS-5, represents a limitation of the study and highlights the need for future investigations that more comprehensively explore the systemic and local inflammatory profile associated with ambroxol treatment.

Another limitation refers to the absence of characterization of immune cells present in the articular tissue. Although the results indicate significant modulation of inflammatory cytokines associated with ambroxol treatment, specific analyses were not performed to identify the cellular sources of these mediators within the articular microenvironment.

Therefore, the results of this study contribute scientifically by demonstrating, in an integrated manner, the multimodal potential of ambroxol as an anti-inflammatory, analgesic, and chondroprotective agent in an experimental model of osteoarthritis. The convergence of behavioral, radiographic, histological, and immunological findings strengthens the relevance of the study and broadens the understanding of the mechanisms of action of

ambroxol in the modulation of pain and the preservation of articular cartilage. These findings support the repositioning of ambroxol as a promising therapeutic alternative and open perspectives for translational investigations aimed at the management of chronic pain and osteoarticular degeneration.

4. Materials and Methods

4.1. Drugs

The drugs used in this study were commercially acquired. Ambroxol was stored at room temperature until use and administered by oral gavage at doses of 10, 50, and 100 mg/kg/day. Meloxicam was used as a pharmacological control and administered by oral gavage at a dose of 2 mg/kg/day.

4.2. Animals

Adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, albinus variety), approximately 120 days old and weighing 300 ± 50 g, were used in this study. The animals were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Maranhão (UFMA) and housed in the Sectorial Animal Facility of the Center for Biological and Health Sciences at UFMA under controlled conditions of temperature (22 ± 2 °C), humidity (40–60%), and a 12 h light/dark cycle, with free access to commercial chow (Nuvilab®, Quimtia, Colombo, PR, Brazil) and water ad libitum. Animals underwent a seven-day acclimatization period for clinical monitoring and environmental adaptation and were subsequently randomized and blindly allocated to the experimental groups.

4.3. Ethical Procedure

The study was conducted at the Experimental Laboratory for the Study of Pain (LEED), affiliated with the Federal University of Maranhão (UFMA). The experimental protocol was previously approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of UFMA (CEUA/UFMA) under protocol number 23115.013021/2022-17. All experimental procedures were conducted in accordance with the ethical guidelines for animal experimentation established by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and the International Association for the Study of Pain [39,40].

4.4. Experimental Protocol

The study included male Wistar rats ($n = 30$), randomly allocated into six experimental groups (A–F), with five animals per group ($n = 5$ /group). On day 0 (D0), all animals underwent baseline behavioral assessments and radiographic examinations of the right knee. Osteoarthritis was induced by a single intra-articular injection of 2 mg sodium monoiodoacetate (MIA) [24]. The procedure was performed under general anesthesia induced via intraperitoneal administration of ketamine hydrochloride (50 mg/kg), midazolam (1 mg/kg), and tramadol (5 mg/kg), with anesthetic maintenance using 2.5% isoflurane. After the procedure, animals were housed in individual cages under a 12 h light/dark cycle, with free access to food and water, throughout the 28-day experimental protocol.

Treatment was initiated on the third day after osteoarthritis induction and administered once daily by oral gavage. Group A (healthy) remained without induction or treatment; Group B, the negative control (CTRL–), received 0.9% saline (0.1 mL/kg/day); Group C was treated with meloxicam (MLX, 2 mg/kg/day); and Groups D, E, and F received ambroxol (ABX) at doses of 10, 50, and 100 mg/kg/day, respectively. Behavioral and radiographic evaluations were performed on days 0, 7, 14, 21, and 28. On day 28, after completion of the analyses, animals were euthanized for collection of right knee joints and blood samples for histopathological analyses and cytokine quantification.

The randomization of animals was performed using a computer-generated allocation sequence, and the distribution into experimental groups was conducted by a researcher who was not involved in the subsequent outcome assessments. Behavioral, radiographic, and histological evaluations were performed by previously trained evaluators who were blinded to the allocation of animals to the experimental groups, in order to minimize potential observation bias. For statistical analysis, the datasets were previously coded so that the researcher responsible for the analysis remained blinded to the identification of the experimental groups during data processing.

4.5. Parameters for Determination of Administered Doses

The ambroxol doses used (10, 50, and 100 mg/kg/day) were defined based on previously published preclinical data and on the calculation of the Animal Equivalent Dose (AED), following the principles of allometric scaling recommended by the guidelines of the U.S. Food and Drug Administration [36,37].

Previous studies have demonstrated a linear correlation between plasma ambroxol levels in humans and rodents, suggesting a wide safety margin for dose extrapolation. In addition, clinical data report the safe use of doses of up to 1000 mg/day in humans, further supporting the feasibility of the dose ranges tested [28,38].

For this study, AED calculations considered a 60 kg human and a 150 g rat. The meloxicam dose (2 mg/kg/day) corresponds to the therapeutic human dose of 15 mg/day [41]. The lowest ambroxol dose (10 mg/kg/day) was derived from the standard clinical regimen of 90 mg/day [42]. The intermediate dose (50 mg/kg/day) was defined based on the Effective Dose 50% (ED50), from literature data demonstrating its association with significant anti-inflammatory effects in a murine model [43]. The higher dose (100 mg/kg/day) corresponded to the AED of the maximum dose considered safe in humans (1000 mg/day) [38].

4.6. In Vivo Behavioral Assessments

4.6.1. Assessment of Motor Activity/Forced Locomotion (Rotarod Test)

Animals were evaluated for motor activity using the rotarod test (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA), with an acceleration speed of 16 rpm over a 300 s period. Prior to testing, animals underwent a seven-day habituation period, with sessions lasting three to five minutes. On the day of assessment, two trained examiners observed locomotion and assigned scores ranging from 1 to 5, where a score of 5 indicated normal paw use and a score of 1 indicated complete disuse. The final score for each animal was calculated as the arithmetic mean of the evaluators' scores, thereby reducing individual bias [24,44,45].

4.6.2. Spontaneous Locomotion (Walkway Gait Analysis)

Spontaneous locomotion analysis was employed to assess the animals' locomotor function, using a glass walkway adapted at LEED/UFMA, in accordance with protocols previously described in the literature [46]. The apparatus measured $80 \times 20 \times 17$ cm and was elevated 70 cm above the ground, allowing video recording with a fixed camera positioned on the floor at a distance of 70 cm from the walkway. Animals underwent an adaptation period prior to testing. During the experiment, displacement time and maximum speed achieved were recorded. Images were analyzed using Kinovea software (version 0.8.24), which provided precise measurements. Mean velocity (V_m) was calculated as the ratio between the distance traveled (Δs) and the time elapsed (Δt) ($V_m = \Delta s / \Delta t$), with final values obtained from the average of individual velocities within each group.

4.6.3. Incapacitance Test/Hind Paw Weight Distribution (Weight-Bearing Test)

Spontaneous postural pain was assessed using the weight-bearing test, employing equipment from IITC Life Science (USA). This method allows quantification of changes in

body weight distribution between the right hind paw, in which osteoarthritis was induced (OA+), and the left hind paw, which remained non-induced (OA−), with such variations serving as indicators of joint discomfort resulting from the lesion.

Animals were individually placed in a transparent restraint chamber coupled to a platform equipped with two independent load cells, capable of recording the weight exerted by each hind paw (measured in grams) without the need for immobilization. Each recording lasted five seconds, and three consecutive measurements were obtained per animal. The final value corresponded to the arithmetic mean of the three measurements.

Changes in weight distribution between the hind paws were expressed using the paw weight distribution index (PWDI), calculated according to the following formula [23,33,47]:

$$\text{PWDI}(\%) = \frac{\text{PWDIA}}{\text{PWDIA} + \text{PWDIC}} \times 100$$

where PWDI (%) is the percentage of the paw weight distribution index; PWDIA is the weight distribution index of the affected paw; and PWDIC is the weight distribution index of the contralateral paw.

4.6.4. Quantification of Spontaneous Pain and Assessment of Mechanical Allodynia (Von Frey Test)

Mechanical allodynia was assessed using a digital Von Frey analgesimeter (model EFF 301W, Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The device consists of a pressure transducer connected to a digital counter, allowing precise measurement (0.1 g resolution) of the force applied to the plantar surface up to a limit of 150 g. The stimulus was applied using a disposable polypropylene tip with a diameter of 0.5 mm attached to the transducer [48].

Animals were individually placed in transparent acrylic boxes (12 × 20 × 17 cm) with a metal mesh floor (5 mm² grid), allowing access to the plantar surface of the paws. The boxes were positioned on an elevated platform with a mirror inclined at 45° and placed 25 cm below, facilitating visualization of the responses. After placement, animals were allowed to acclimate for 15 min before the start of the test [24,44,48].

The mechanical stimulus was applied gradually and continuously to the mid-plantar surface of the ipsilateral (affected) and contralateral paws until a paw withdrawal response occurred. Each paw was stimulated up to six times, and the three most consistent measurements were considered for calculation of the paw withdrawal nociceptive threshold (PWNT), expressed as the mean force (in grams) required to elicit withdrawal. Results were presented as a percentage of the PWNT, calculated according to the following formula [24,44]:

$$\text{PWNT}(\%) = \frac{\text{PWNTA}}{\text{PWNTA} + \text{PWNTC}} \times 100$$

where PWNT (%) is the percentage of the paw withdrawal nociceptive threshold; PWNTA is the paw withdrawal nociceptive threshold of the affected paw; and PWNTC is the paw withdrawal nociceptive threshold of the contralateral paw.

4.6.5. Facial Expression of Pain (Rat Grimace Scale)

Facial expression of pain was assessed using the Rat Grimace Scale (RGS), a method developed to quantify spontaneous pain in rodents based on the observation of specific facial changes. Unlike tests that evaluate responses to thermal or mechanical stimuli, the RGS allows non-invasive and continuous assessment of animal discomfort, representing a sensitive and clinically relevant tool [29]. This scale was adapted from the Facial Action Coding System (FACS), originally used to assess pain in non-verbal patients, due to the similarity of pain-associated facial expressions between humans and rodents [29].

The assessment was based on four facial action units: orbital tightening, nose/cheek flattening, ear changes, and whisker change. Each parameter was scored on a scale from 0 to 2, corresponding to no pain (0), moderate pain (1), and severe pain (2). Analyses were performed by two independent evaluators, previously trained and blinded to the treatment groups, and the final score was determined as the mean of the values assigned by both observers [29].

4.7. Radiographic Evaluation

Radiographic evaluation of the knees was performed using a portable Diox[®] device (Acteon, Rio de Janeiro, Brazil), equipped with digital exposure control, an LCD display, and automatic adjustment of exposure time and power, operating at fixed parameters of 60 kV and 4 mA. Images were acquired using a computerized system with a digital sensor (Micro Imagem, Indaiatuba, SP, Brazil), with exposure time, focus-to-film distance, and animal positioning kept constant. For image acquisition, rats were anesthetized with 2.5% isoflurane delivered via a face mask and positioned in dorsal and left lateral recumbency, and craniocaudal and laterolateral projections were obtained. Examinations were performed on experimental days D0, D7, D14, D21, and D28 in all groups.

Radiographs were evaluated in a blinded manner by an orthopedic specialist with expertise in osteoarthritis, using the Kellgren and Lawrence classification adapted for rodents. This classification is based on criteria such as joint space narrowing, osteophyte formation, subchondral sclerosis, and bone deformity, and ranges from 0 to 4, where 0 indicates a normal joint and 4 represents severe involvement, characterized by marked joint space narrowing, pronounced subchondral sclerosis, evident bone contour deformity, and the presence of large osteophytes. Each joint received a score, and results were expressed as the mean score per group [24,49,50].

4.8. Histological Evaluation of Inflammatory Parameters

Histological evaluation was performed at the Multiuser Histology Laboratory of the Post-Graduate Program in Health Sciences at the Federal University of Maranhão (LMH-PPGCS/UFMA). After euthanasia, the right knee joints were dissected and fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2) for 48 h, then washed and stored in 70% ethanol for subsequent decalcification. Decalcification was carried out for approximately 15 days using EasyDesc Soft (EasyPath[®], Indaiatuba, SP, Brazil—based on ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA] and sodium and potassium tartrate), with weekly solution changes. After this period, samples were washed in running water and processed using standard histological procedures, including dehydration in an ascending alcohol series, clearing in xylene, and paraffin infiltration. The blocks were oriented to obtain horizontal sections, and 5 µm sections were cut using a semi-automatic microtome and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

Histological slides were examined under a light microscope (Leica ICC50, Wetzlar, Germany) equipped with 10× eyepieces and 4× (500 mm), 10× (200 mm), and 40× (50 mm) objectives, and representative images were recorded as photomicrographs. For histological scoring, three representative sections per joint obtained from the central region of the femorotibial articulation were analyzed. The evaluation was performed in a blinded manner by a previously trained examiner, considering morphological changes in the articular cartilage, subchondral bone, and osteophyte formation. Cartilage degeneration was assessed using the semi-quantitative Osteoarthritis Research Society International (OARSI) scoring system adapted for rodents, which ranges from grades 0 to 6, where 0 indicates intact articular cartilage and surface, and 6 represents severe joint deformation

and extensive cartilage damage [51]. Results were expressed as the mean histological score obtained for each experimental group.

4.9. Cytokine Quantification

Serum concentrations of IL-1 β , IL-6, and IL-10 were determined by ELISA using commercial rat-specific kits (ELK Biotech, Wuhan, China). Blood samples were collected by abdominal aorta puncture at the time of euthanasia, and the obtained serum was stored at -80°C until analysis. Samples were analyzed in triplicate, with standard curves prepared by serial dilutions according to the manufacturer's instructions, and absorbance was measured at 450 nm [52].

Absorbance values were recorded in Microsoft Excel, and cytokine concentrations were calculated by interpolation from the standard curves, corrected for the dilution factor, and expressed as pg/mL (or normalized to total protein). Mean values were statistically analyzed using GraphPad Prism version 10.1.0.

4.10. Statistical Analysis

Data were analyzed using one-way analysis of variance (one-way ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test. Variables influenced by two sources of variation (time $\times$ treatment) were evaluated using two-way repeated-measures ANOVA, also followed by Tukey's post hoc test. Results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), adopting $p < 0.05$ as the level of statistical significance. All analyses were performed using GraphPad Prism[®] version 10.1.0.

5. Conclusions

The results of this study are promising and demonstrate that ambroxol exerts antinociceptive and anti-inflammatory effects in the MIA-induced osteoarthritis model, reducing pain, improving motor function, and attenuating articular degeneration, with efficacy comparable to that of meloxicam. The improvements observed in gait, weight distribution, and facial pain scores, together with the structural preservation detected by radiographic and histological analyses, reinforce the robustness of these findings.

Taken together, these results suggest that ambroxol has potential for therapeutic repositioning in osteoarthritis. However, additional studies are required to investigate its applicability in clinical trials and to further elucidate its molecular mechanisms of action.

Author Contributions: Conceptualization: J.B.S.G., M.d.S.d.S.C. and M.J.T.A.M.M. Methodology: J.B.S.G., M.d.S.d.S.C. and M.J.T.A.M.M. Software: G.M.F., J.T.A.M.M.T. and A.T.F.R. Validation: J.B.S.G., M.d.S.d.S.C., M.J.T.A.M.M. and R.C.C. Formal analysis: M.J.T.A.M.M., M.S.d.A., J.B.S.G. and M.d.S.d.S.C. Investigation: M.J.T.A.M.M., A.C.S.N.d.C., J.T.A.M.M.T., A.T.F.R., E.R.S. and T.G.P.d.M.C. Resources: J.A.M.T., M.d.S.d.S.C., J.B.S.G., J.C.d.S.S., S.V.d.M. and E.M.d.S. Data curation: M.J.T.A.M.M., R.A.F.C. and R.C.C. Writing—original draft preparation: M.J.T.A.M.M. Writing—review and editing: M.J.T.A.M.M., J.A.M.T., J.B.S.G. and M.d.S.d.S.C. Visualization: M.J.T.A.M.M. and G.M.F. Supervision: J.B.S.G., M.d.S.d.S.C. and R.C.C. Project administration: J.B.S.G., M.d.S.d.S.C. and M.J.T.A.M.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Maranhão (CEUA-UFMA) (protocol code 23115.013021/2022-17 and date of approval 21 September 2022).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

ABX	Ambroxol
AED	Animal equivalent dose
ANOVA	Analysis of variance
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais (Institutional Animal Care and Use Committee)
CONCEA	National Council for the Control of Animal Experimentation (Brazil)
CTRL–	Negative control
D0	Day 0
D7	Day 7
D14	Day 14
D21	Day 21
D28	Day 28
ED-50	Effective dose 50%
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Facial Action Coding System
H&E	Hematoxylin and eosin
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
KL	Kellgren–Lawrence
LCD	Liquid crystal display
LEED	Experimental Laboratory for the Study of Pain
LMH-PPGCS	Multuser Histology Laboratory—Graduate Program in Health Sciences
MIA	Monosodium iodoacetate
MLX	Meloxicam
Nav	Voltage-gated sodium channel
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B
NSAIDs	Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
OA	Osteoarthritis
OA+	Osteoarthritis-induced paw
OA–	Non-induced paw
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
PWDI	Paw weight distribution index
PWDIA	Paw weight distribution index—affected paw
PWDIC	Paw weight distribution index—contralateral paw
PWNT	Paw withdrawal nociceptive threshold
PWNTA	Paw withdrawal nociceptive threshold—affected paw
PWNTC	Paw withdrawal nociceptive threshold—contralateral paw
RGS	Rat Grimace Scale
ROS	Reactive oxygen species
SEM	Standard error of the mean
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
UFMA	Federal University of Maranhão
V _m	Mean velocity
Δ s	Distance traveled
Δ t	Time elapsed

References

1. Mobasheri, A.; Batt, M. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Ann. Phys. Rehabil. Med.* **2016**, *59*, 333–339. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Nahian, A.; Sapra, A. Histology, chondrocytes. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557576/> (accessed on 1 November 2025).
3. Hunter, D.J.; Bierma-Zeinstra, S. Osteoarthritis. *Lancet* **2019**, *393*, 1745–1759. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Qian, L.; Li, C.; Liu, H.; Zhou, H.; Tan, T. Diosmetin ameliorates osteoarthritic inflammation in vivo and ECM macromolecules degradation in interleukin-1 β -stimulated murine chondrocytes through the Nrf2/NF- κ B pathway. *Folia Histochem. Cytobiol.* **2024**, *62*, 99–109. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Ansari, M.Y.; Ahmad, N.; Haqqi, T.M. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *129*, 110452. [\[CrossRef\]](#)
6. Jin, Y.; Liu, Q.; Chen, P.; Zhao, S.; Jiang, W.; Wang, F.; Li, P.; Zhang, Y.; Lu, W.; Zhong, T.P.; et al. A novel prostaglandin E receptor 4 (EP4) small molecule antagonist induces articular cartilage regeneration. *Cell Discov.* **2022**, *8*, 24. [\[CrossRef\]](#)
7. Min, G.-Y.; Park, J.-M.; Joo, I.-H.; Kim, D.-H. Inhibition effect of *Caragana sinica* root extracts on osteoarthritis through MAPKs, NF- κ B signaling pathway. *Int. J. Med. Sci.* **2021**, *18*, 861–872. [\[CrossRef\]](#)
8. Bannuru, R.R.; Osani, M.C.; Vaysbrot, E.E.; Arden, N.K.; Bennell, K.; Bierma-Zeinstra, S.M.A.; Kraus, V.B.; Lohmander, L.S.; Abbott, J.H.; Bhandari, M.; et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2019**, *27*, 1578–1589. [\[CrossRef\]](#)
9. Kolasinski, S.L.; Neogi, T.; Hochberg, M.C.; Oatis, C.; Guyatt, G.; Block, J.; Callahan, L.; Copenhaver, C.; Dodge, C.; Felson, D.; et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res.* **2020**, *72*, 149–162. [\[CrossRef\]](#)
10. Pinzi, L.; Bisi, N.; Rastelli, G. How drug repurposing can advance drug discovery: Challenges and opportunities. *Front. Drug Discov.* **2024**, *4*, 1460100. [\[CrossRef\]](#)
11. Kuswanto, W.; Baker, M.C. Repurposing drugs for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **2024**, *32*, 886–895. [\[CrossRef\]](#)
12. Barbosa, S.R.; Silva, R.I.; Borges, R.d.S.; Queiroz, A.N. Drug repositioning: A study on ambroxol. *Rev. Eletron. Acervo Saude* **2023**, *23*, e11700. [\[CrossRef\]](#)
13. Russo, M.A.; Baron, R.; Dickenson, A.H.; Kern, K.-U.; Santarelli, D.M. Ambroxol for neuropathic pain: Hiding in plain sight? *Pain* **2023**, *164*, 3–13. [\[CrossRef\]](#)
14. Malerba, M.; Ragnoli, B. Ambroxol in the 21st century: Pharmacological and clinical update. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 1119–1129. [\[CrossRef\]](#)
15. Jiang, W.; Jin, Y.; Zhang, S.; Ding, Y.; Huo, K.; Yang, J.; Zhao, L.; Nian, B.; Zhong, T.P.; Lu, W.; et al. PGE2 activates EP4 in subchondral bone osteoclasts to regulate osteoarthritis. *Bone Res.* **2022**, *10*, 27. [\[CrossRef\]](#)
16. Sunkari, S.; Thatikonda, S.; Pooladanda, V.; Challa, V.S.; Godugu, C. Protective effects of ambroxol in psoriasis-like skin inflammation: Exploration of possible mechanisms. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *71*, 301–312. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Goldring, M.B.; Otero, M. Inflammation in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **2011**, *23*, 471–478. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Kapoor, M.; Martel-Pelletier, J.; Lajeunesse, D.; Pelletier, J.-P.; Fahmi, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2011**, *7*, 33–42. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Mobasheri, A.; Rayman, M.P.; Gualillo, O.; Sellam, J.; van der Kraan, P.; Fearon, U. The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 302–311. [\[CrossRef\]](#)
20. Barut, E.N.; Engin, S.; Barut, B.; Kaya, C.; Kerimoglu, G.; Ozel, A.; Kadioglu, M. Uroprotective effect of ambroxol in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. *Int. Urol. Nephrol.* **2019**, *51*, 803–810. [\[CrossRef\]](#)
21. Cavalu, S.; Sharaf, H.; Saber, S.; Youssef, M.E.; Abdelhamid, A.M.; Mourad, A.A.E.; Ibrahim, S.; Allam, S.; Elgharabawy, R.M.; El-Ahwany, E.; et al. Ambroxol, a mucolytic agent, boosts HO-1, suppresses NF- κ B, and decreases the susceptibility of the inflamed rat colon to apoptosis: A new treatment option for treating ulcerative colitis. *FASEB J.* **2022**, *36*, e22464. [\[CrossRef\]](#)
22. Çağlar, C.; Kara, H.; Ateş, O.; Uğurlu, M. Evaluation of different intra-articular injection therapies with gait analysis in a rat osteoarthritis model. *Cartilage* **2021**, *13*, 1134S–1143S. [\[CrossRef\]](#)
23. Gregersen, L.S.; Rosland, T.; Arendt-Nielsen, L.; Whiteside, G.; Hummel, M. Unrestricted weight bearing as a method for assessment of nociceptive behavior in a model of tibiofemoral osteoarthritis in rats. *J. Behav. Brain Sci.* **2013**, *3*, 306–314. [\[CrossRef\]](#)
24. Morais, S.V.; Czeckzo, N.G.; Malafaia, O.; Filho, J.M.R.; Garcia, J.B.S.; Miguel, M.T.; Zini, C.; Massignan, A.G. Osteoarthritis model induced by intra-articular monosodium iodoacetate in rat knee. *Acta Cir. Bras.* **2016**, *31*, 765–773. [\[CrossRef\]](#)
25. Kishnan, D.; Morato, E.O.; Calsetta, A.; Baumbauer, K.M.; Nair, L.S. Evaluation of pain-associated behavioral changes in monoiodoacetate-induced osteoarthritic rats using dynamic weight bearing analysis. *Life* **2024**, *14*, 983. [\[CrossRef\]](#)
26. Kern, K.U.; Schwickert, M. Ambroxol for the treatment of fibromyalgia: Science or fiction? *J. Pain Res.* **2017**, *10*, 1905–1929. [\[CrossRef\]](#)

27. Mishra, A.; Chandravanshi, L.P.; Trigun, S.K.; Krishnamurthy, S. Ambroxol modulates 6-hydroxydopamine-induced temporal reduction in glucocerebrosidase (GCase) enzymatic activity and Parkinson's disease symptoms. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *155*, 479–493. [\[CrossRef\]](#)
28. Gaida, W.; Klinder, K.; Arndt, K.; Weiser, T. Ambroxol, a Nav1.8-preferring Na⁺ channel blocker, effectively suppresses pain symptoms in animal models of chronic, neuropathic and inflammatory pain. *Neuropharmacology* **2005**, *49*, 1220–1227. [\[CrossRef\]](#)
29. Sotocinal, S.G.; Sorge, R.E.; Zaloum, A.; Tuttle, A.H.; Martin, L.J.; Wieskopf, J.S.; Mapplebeck, J.C.; Wei, P.; Zhan, S.; Zhang, S.; et al. The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol. Pain* **2011**, *7*, 55. [\[CrossRef\]](#)
30. Hama, A.T.; Plum, A.W.; Sagen, J. Antinociceptive effect of ambroxol in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2010**, *97*, 249–255. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Jiang, X.; Zhang, J.; Kou, B.; Zhang, C.; Zhong, J.; Fang, X.; Huang, X.; Zhang, X.; Xie, F.; Hu, Q.; et al. Ambroxol improves neuronal survival and reduces white matter damage through suppressing endoplasmic reticulum stress in microglia after intracerebral hemorrhage. *Biomed. Res. Int.* **2020**, *2020*, 8131286. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Ullah, S.; Khan, A.; Ali, T.; Kim, M.O. Ambroxol attenuates detrimental effect of LPS-induced glia-mediated neuroinflammation, oxidative stress, and cognitive dysfunction in mice brain. *Front. Immunol.* **2025**, *16*, 1494114. [\[CrossRef\]](#)
33. Morais, S.V.; Calado, G.P.; Carvalho, R.C.; Garcia, J.B.S.; de Queiroz, T.M.; Filho, A.J.C.; Lopes, A.J.O.; Cartágenes, M.D.S.d.S.; Domingues, G.R.d.S. Impact of cuminaldehyde and indomethacin co-administration on inflammatory responses in MIA-induced osteoarthritis in rats. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 630. [\[CrossRef\]](#)
34. Su, X.; Wang, L.; Song, Y.; Bai, C. Inhibition of inflammatory responses by ambroxol, a mucolytic agent, in a murine model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Intensive Care Med.* **2004**, *30*, 133–140. [\[CrossRef\]](#)
35. Li, J.; Wu, H.; Zhang, J. Efficacy of phentolamine combined with ambroxol aerosol inhalation in the treatment of pediatric severe pneumonia and its effect on serum IL-10 and CRP levels. *Transl. Pediatr.* **2022**, *11*, 33–40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Saadh, M.J.; Haddad, M.; Dababneh, M.F.; Bayan, M.F.; Al-Jaidi, B.A. A guide for estimating the maximum safe starting dose and conversion it between animals and humans. *Syst. Rev. Pharm.* **2020**, *11*, 98–101.
37. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*; FDA: Rockville, MD, USA, 2005.
38. Cazan, D.; Klimek, L.; Sperl, A.; Plomer, M.; Pohlmann, T.; Kölsch, S. Safety of ambroxol in the treatment of airway diseases in adult patients. *Expert Opin. Drug Saf.* **2018**, *17*, 1211–1224. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Rivera, E.; Hernandez, R.; Carissimi, A.S.; Pekow, C. Laboratory animal legislation in Latin America. *ILAR J.* **2016**, *57*, 293–300. [\[CrossRef\]](#)
40. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **1983**, *16*, 109–110. [\[CrossRef\]](#)
41. Tacca, M.D.; Colucci, R.; Fornai, M.; Blandizzi, C. Efficacy and tolerability of meloxicam, a COX-2 preferential non-steroidal anti-inflammatory drug: A review. *Clin. Drug Investig.* **2002**, *22*, 799–818. [\[CrossRef\]](#)
42. Brazil. Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa). *Ambroxol: Healthcare Professional Package Insert*; ANVISA: Brasília, Brazil, 2023.
43. Cao, D.W.; Hou, M.X.; Zhang, X.R. Ambroxol alleviates ventilator-induced lung injury by inhibiting c-Jun expression. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 5004–5011. [\[CrossRef\]](#)
44. Kalff, K.-M.; El Mouedden, M.; van Egmond, J.; Veening, J.; Joosten, L.; Scheffer, G.J.; Meert, T.; Vissers, K. Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *641*, 108–113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Monville, C.; Torres, E.M.; Dunnett, S.B. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J. Neurosci. Methods* **2006**, *158*, 219–223. [\[CrossRef\]](#)
46. Knorr, S.; Rauschenberger, L.; Lang, T.; Volkmann, J.; Ip, C.W. Multifactorial assessment of motor behavior in rats after unilateral sciatic nerve crush injury. *J. Vis. Exp.* **2021**, *173*, e62606. [\[CrossRef\]](#)
47. Schött, E.; Berge, O.-G.; Ängeby-Möller, K.; Hammarström, G.; Dalsgaard, C.-J.; Brodin, E. Weight bearing as an objective measure of arthritic pain in the rat. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **1994**, *31*, 79–83. [\[CrossRef\]](#)
48. Tena, B.; Escobar, B.; Arguis, M.J.; Cantero, C.; Rios, J.; Gomar, C. Reproducibility of electronic von Frey and von Frey monofilaments testing. *Clin. J. Pain* **2012**, *28*, 318–323. [\[CrossRef\]](#)
49. Kellgren, J.H.; Lawrence, J.S. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **1957**, *16*, 494–502. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Kohn, M.D.; Sassoon, A.A.; Fernando, N.D. Classifications in brief: Kellgren–Lawrence classification of osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2016**, *474*, 1886–1893. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

51. Pritzker, K.P.H.; Gay, S.; Jimenez, S.A.; Ostergaard, K.; Pelletier, J.P.; Revell, P.A.; Salter, D.; van den Berg, W.B. Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging. *Osteoarthr. Cartil.* **2006**, *14*, 13–29. [[CrossRef](#)]
52. ELK Biotechnology Co., Ltd. *Rat IL-1 β (Interleukin 1 Beta) ELISA Kit—Manual*; ELK Biotechnology: Wuhan, China, 2023.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que o ambroxol apresenta efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em modelo experimental de osteoartrite induzida por monoiodoacetato de sódio em ratos. A convergência entre os dados comportamentais, radiográficos, histológicos e imunológicos fortalece a robustez dos resultados e amplia a compreensão do papel desse fármaco na modulação da dor e da degeneração articular na osteoartrite.

Do ponto de vista funcional, o ambroxol promoveu melhora significativa da dor espontânea e evocada, bem como recuperação da capacidade locomotora, evidenciada por testes como Rotarod, Análise de marcha em passarela, Weight Bearing, Von Frey e Rat Grimace Scale. Esses achados indicam importante efeito antinociceptivo, refletindo melhora significativa da mobilidade dos animais.

No âmbito estrutural, a integração dos dados radiográficos e histológicos demonstrou que o tratamento com ambroxol foi capaz de atenuar a progressão das alterações articulares induzidas pela osteoartrite, promovendo preservação da integridade da cartilagem. Observou-se redução dos escores de Kellgren–Lawrence, especialmente nas doses mais elevadas, indicando desaceleração das alterações degenerativas, como estreitamento do espaço articular, formação de osteófitos e esclerose subcondral. Esses resultados foram corroborados pela análise histológica, que evidenciou melhor preservação da arquitetura cartilaginosa, com menor grau de degradação tecidual, incluindo redução de fissuras, manutenção da organização da matriz extracelular e maior preservação dos condrócitos. Em conjunto, os dados sugerem que o ambroxol atua na modulação da progressão estrutural da osteoartrite, para além do controle sintomático.

Adicionalmente, a quantificação de citocinas evidenciou redução dos níveis de IL-1 β e IL-6 nos grupos tratados com ambroxol, confirmando seu efeito anti-inflamatório sistêmico. Observou-se, ainda, diminuição dos níveis de IL-10, o que pode refletir uma modulação precoce e eficaz da resposta inflamatória, reduzindo a necessidade de ativação de mecanismos compensatórios. Esse perfil de resposta indica um efeito imunomodulador do ambroxol, contribuindo para o reequilíbrio do microambiente articular e, consequentemente, para a preservação estrutural observada nas análises radiográficas e histológicas.

A integração dos dados experimentais e da revisão sistemática aponta o potencial do ambroxol em contextos inflamatórios não pulmonares. Enquanto o estudo experimental demonstrou, de maneira robusta, efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios e condroprotetores no modelo de osteoartrite induzida por MIA, a revisão sistemática evidenciou que esses efeitos

não são isolados, mas fazem parte de um padrão farmacodinâmico amplo, observado em diferentes modelos *in vivo*, incluindo condições inflamatórias, neuropáticas e associadas ao estresse oxidativo.

Em conjunto, os dados indicam que o ambroxol atua de forma multimodal, envolvendo a modulação de citocinas pró-inflamatórias, a redução do estresse oxidativo e a inibição da excitabilidade neuronal, especialmente por meio de canais de sódio voltagem-dependentes, conferindo consistência mecanísticas e plausibilidade biológica aos efeitos observados na osteoartrite. Entretanto, a literatura apresenta limitações, incluindo heterogeneidade metodológica, número reduzido de estudos recentes e escassez de investigações que permitam análises mais robustas. Essas lacunas reforçam a relevância científica e a originalidade da presente tese.

Com base nos dados apresentados, o ambroxol se destaca como um candidato promissor ao reposicionamento terapêutico na osteoartrite, não apenas pelo seu impacto na modulação da dor e da resposta inflamatória, mas também pela sua capacidade de interferir na progressão estrutural da doença. Associado ao seu perfil de segurança bem estabelecido, ampla utilização clínica e baixo custo, o fármaco apresenta potencial para aplicação translacional, configurando-se como uma alternativa acessível e potencialmente eficaz no manejo da dor crônica osteoarticular.

Entretanto, algumas limitações devem ser consideradas. A ausência da avaliação de mediadores inflamatórios adicionais, como TNF- α , NF- κ B, MMP-13 e ADAMTS-5, bem como de vias intracelulares específicas, limita uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos moleculares envolvidos, especialmente aqueles relacionados à degradação da matriz extracelular e à progressão da osteoartrite. Adicionalmente, não foi realizada a caracterização das células imunes presentes no tecido articular, o que restringe a identificação das fontes celulares dos mediadores inflamatórios e, consequentemente, a interpretação mais detalhada dos processos imunológicos no microambiente articular.

Diante dessas limitações, estudos futuros são necessários para elucidar de forma mais abrangente os mecanismos moleculares e celulares associados à ação do ambroxol. Além disso, investigações em modelos clínicos são fundamentais para confirmar sua eficácia, definir doses ideais, esquemas terapêuticos e avaliar seu impacto a longo prazo na progressão da osteoartrite.

Por fim, esta tese amplia o conhecimento na área de dor e doenças osteoarticulares ao demonstrar o potencial do ambroxol como agente antinociceptivo e anti-inflamatório. O reposicionamento desse fármaco, amplamente disponível e com perfil de segurança

estabelecido, configura uma estratégia promissora, alinhada à demanda por terapias mais eficazes, seguras e acessíveis para o manejo da osteoartrite e da dor crônica associada.

6 CONCLUSÃO

A revisão sistemática realizada nesta tese demonstrou o potencial terapêutico do ambroxol em diferentes modelos experimentais não pulmonares, destacando seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antinociceptivos. Esses resultados reforçam a plausibilidade do reposicionamento farmacológico do ambroxol e fundamentam os achados do presente estudo.

Nesse contexto, os resultados desta pesquisa demonstram que o ambroxol exerce efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios no modelo experimental de osteoartrite induzida por MIA. A redução da dor e a melhora da função motora, associadas à atenuação das alterações estruturais articulares evidenciadas por análises radiográficas e histológicas, reforçam a robustez dos resultados. A diminuição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, amplia a compreensão do papel do ambroxol na modulação da fisiopatologia da osteoartrite.

A eficácia observada, comparável à do meloxicam, evidencia o potencial translacional desses dados e destaca o ambroxol como um candidato ao reposicionamento terapêutico na osteoartrite, especialmente considerando seu perfil de segurança já estabelecido, ampla utilização clínica e baixo custo.

Assim, esta tese contribui de forma relevante para o avanço do conhecimento na área, ao propor o ambroxol como um candidato ao reposicionamento terapêutico no manejo da osteoartrite, destacando-se como uma alternativa potencialmente eficaz, acessível e com perfil de segurança já estabelecido. No entanto, são necessários estudos adicionais que investiguem sua aplicabilidade em ensaios clínicos e aprofundem a compreensão de seus mecanismos moleculares de ação.

REFERÊNCIAS

ABRAMOFF, Benjamin; CALDERA, Franklin E. Osteoarthritis: pathology, diagnosis, and treatment options. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 104, n. 2, p. 293-311, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>. Disponível em: [https://www.medical.theclinics.com/article/S0025-7125\(19\)30113-0/abstract](https://www.medical.theclinics.com/article/S0025-7125(19)30113-0/abstract). Acesso em: 20 maio 2025.

ANSARI, Mohammad Yunus; AHMAD, Nashrah; HAQQI, Tariq M. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: role of polyphenols. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, Paris, v. 129, p. 110452, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110452>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332220306454>. Acesso em: 10 jun. 2025.

BANNURU, Raveendhara R. *et al.* OARSI guidelines for the non-surgical management of knee, hip, and polyarticular osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, London, v. 27, n. 11, p. 1578-1589, 2019. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.joca.2019.06.011> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458419311161>. Acesso em: 22 maio 2025.

BARBOSA, Sheila Rodrigues *et al.* Reposicionamento de fármacos: um estudo sobre o ambroxol. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. e11700-e11700, 2023. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e11700.2023>. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/11700>. Acesso em: 1º ago. 2025.

BARUT, Elif Nur *et al.* Uroprotective effect of ambroxol in cyclophosphamide-induced cystitis in mice. **International Urology and Nephrology**, Amsterdam, v. 51, n. 5, p. 803-810. 2019. DOI: <http://www.doi.org/10.1007/s11255-019-02128-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11255-019-02128-y>. Acesso em: 9 jun. 2025.

BIANCHI, M. *et al.* Ambroxol inhibits interleukin 1 and tumor necrosis factor production in human mononuclear cells. **Agents and Actions**, Basel, v. 31, n. 3-4, p. 275-279, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01997619>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01997619>. Acesso em: 9 jun. 2025.

BLANCO, Francisco J. *et al.* Prevalence of symptomatic osteoarthritis in Spain: EPISER2016 study. **Reumatología Clínica (English Edition)**, [Barcelona], v. 17, n. 8, p. 461-470, 2021. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.reuma.2020.01.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1699258X20300231?via%3Dihub>. Acesso em: 24 maio 2025.

BOUSCARY, Alexandra *et al.* Drug repositioning in neurodegeneration: An overview of the use of ambroxol in neurodegenerative diseases. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 884, p. 173446, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173446>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299920305380?via%3Dihub>. Acesso em: 23 maio 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de medicamentos isentos de prescrição (LMIP)**. Brasília, DF: Anvisa, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/ptbr/setorregulado/regularizacao/medicamentos/medicamentos-isentos-de-prescricao/lista-de-medicamentos-isentos-de-prescricao-lmip?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: 11 maio 2025.

CALEFI, Pedro Henrique Souza *et al.* Comparison of the Physicochemical Properties, Antimicrobial Action, and Cytotoxicity of Ambroxol Hydrochloride, N-acetylcysteine, and Calcium Hydroxide Pastes. **European Endodontic Journal**, Istanbul, v. 7, n. 3, p. 217-222, 2022. DOI: <http://www.doi.org/10.14744/eej.2022.30306>. Disponível em: <https://www.eurendodj.com/index.php/pub/article/view/214>. Acesso em: 23 maio 2025.

CAO, Da-Wei; HOU, Mingxia; ZHANG, X. Ambroxol alleviates ventilator-induced lung injury by inhibiting c-Jun expression. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 23, n. 11, p. 5004-5011, 2019. DOI: http://www.doi.org/10.26355/eurrev_201906_18092. Disponível em: <https://www.europeanreview.org/article/18092>. Acesso em: 20 jun. 2025.

CAVALU, Simona *et al.* Ambroxol, a mucolytic agent, boosts HO-1, suppresses NF- κ B, and decreases the susceptibility of the inflamed rat colon to apoptosis: a new treatment option for treating ulcerative colitis. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 36, n. 9, p. e22496, 2022. DOI: <http://www.doi.org/10.1096/fj.202200749R>. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.202200749R>. Acesso em: 20 jun. 2025.

CAZAN, Dorothea *et al.* Safety of ambroxol in the treatment of airway diseases in adult patients. **Expert Opinion on Drug Safety**, London, v. 17, n. 12, p. 1211-1224, 2018. DOI: <http://www.doi.org/10.1080/14740338.2018.1533954>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14740338.2018.1533954>. Acesso em: 22 maio 2025.

CHEN, Hui *et al.* Molecular mechanisms of chondrocyte proliferation and differentiation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 664168, 2021. DOI: <http://www.doi.org/10.3389/fcell.2021.664168>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2021.664168/full>. Acesso em: 27 maio 2025.

CHOI, Young *et al.* Interleukin-1 β stimulates matrix metalloproteinase-2 expression via a prostaglandin E2-dependent mechanism in human chondrocytes. **Experimental and Molecular Medicine**, Gangnam-gu, v. 36, n. 3, p. 226-232, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/emm.2004.31>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/emm200431>. Acesso em: 2 jun. 2025.

COACCIOLI, Stefano *et al.* Osteoarthritis: new insight on its pathophysiology. **Journal of Clinical Medicine**, Basel, v. 11, n. 20, p. 6013, 2022. DOI: <http://www.doi.org/10.3390/jcm11206013>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/11/20/6013>. Acesso em: 20 maio 2025.

COIMBRA, Ibsen Bellini; PLAPLER, Pérola Grinberg; CAMPOS, Gustavo Constantino de. Generating evidence and understanding the treatment of osteoarthritis in Brazil: a study through Delphi methodology. **Clinics**, São Paulo, v. 74, p. e722, 2019. DOI:

<http://www.doi.org/10.6061/clinics/2019/e722>. Disponível em: <https://chooser.crossref.org/?doi=10.6061%2Fclinics%2F2019%2Fe722>. Acesso em: 24 maio 2025.

COMBE, Rachel; BRAMWELL, Steve; FIELD, Mark J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: A model of chronic nociceptive pain in rats? **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 370, n. 2/3, p. 236-240, 2004. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.neulet.2004.08.023>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394004010250?via%3Dihub>. Acesso em: 31 jul. 2025.

CRUZ, Ivana Beatrice Mânica da *et al.* Potencial regenerativo do tecido cartilaginoso por células-tronco mesenquimais: atualização, limitações e desafios. **Revista Brasileira de Ortopedia**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 2-10, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbo.2016.02.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102361616300388?via%3Dihub>. Acesso em: 27 maio 2025.

DESHPANDE, Bhushan R. *et al.* Number of persons with symptomatic knee osteoarthritis in the us: impact of race and ethnicity, age, sex, and obesity. **Arthritis Care and Research**, Hoboken, v. 68, n. 12, p. 1743-1750, 2016. DOI: <http://www.doi.org/10.1002/acr.22897>; Disponível em: <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acr.22897>. Acesso em: 24 maio 2025.

DIMITROULAS, Theodoros *et al.* Neuropathic pain in osteoarthritis: A review of pathophysiological mechanisms and implications for treatment. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, New York, v. 44, n. 2, p. 145-154, 2014. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.semarthrit.2014.05.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S004901721400105X?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jun. 2025.

DISSE, Bernd G.; ZIEGLER, Harald W. Pharmacodynamic mechanism and therapeutic activity of ambroxol in animal experiments. **Respiration**, Basel, v. 51, p. 15-22, 1987. Supplement 1. DOI: <http://www.doi.org/10.1159/000195270>. Disponível em: <https://karger.com/res/article-abstract/51/Suppl.%201/15/294456/Pharmacodynamic-Mechanism-and-Therapeutic-Activity?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 6 jun. 2025.

DU, Xinmei *et al.* The role of TGF-beta3 in cartilage development and osteoarthritis. **Bone Research**, Chengdu, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2023. DOI: <http://www.doi.org/10.1038/s41413-022-00239-4>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41413-022-00239-4>. Acesso em: 27 maio 2025.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Revised assessment report**: Ambroxol and bromhexine containing medicinal products: EMA/PRAC/800767/2015. London: EMA, 2015. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/ambroxol-and-bromhexine-article-31-referral-prac-assessment-report_en.pdf. Acesso em: 10 jun. 2025.

FERREIRA, Guilherme S. *et al.* Translatability of preclinical to early clinical tolerable and pharmacologically active dose ranges for central nervous system active drugs. **Translational Psychiatry**, London, v. 13, n. 74, p. 1-12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41398-023->

02353-1. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41398-023-02353-1>. Acesso em: 1º ago. 2025

FURGAŁA, Anna *et al.* Time-shifted co-administration of sub-analgesic doses of ambroxol and pregabalin attenuates oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Paris, v. 106, p. 930-940, 2018. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.039>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218342690>. Acesso em: 20 jun. 2025.

GAIDA, Wolfram *et al.* Ambroxol, a Nav1.8-preferring Na⁺ channel blocker, effectively suppresses pain symptoms in animal models of chronic, neuropathic and inflammatory pain. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 49, n. 8, p. 1220-1227, 2005. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.08.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0028390805003084?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jun. 2025.

GILLISSEN, Adrian *et al.* Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a comparison with N-acetylcysteine. **Research in Experimental Medicine**, Berlin, v. 196, n. 1, p. 389-398, 1996. DOI: <http://www.doi.org/10.1007/BF02576864>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02576864>. Acesso em: 9 jun. 2025.

GOLDRING, Mary B.; OTERO, Miguel. Inflammation in osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, Philadelphia, v. 23, n. 5, p. 471-478, 2011. DOI: <http://www.doi.org/10.1097/BOR.0b013e328349c2b1>. Disponível em: https://journals.lww.com/co-rheumatology/abstract/2011/09000/inflammation_in_osteoarthritis.12.aspx. Acesso em: 1º jun. 2025.

GÜLTEKIN, Çağrı *et al.* Does Ambroxol alleviate kidney ischemia-reperfusion injury in rats? **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Mashhad, v. 26, n. 8, p. 1037-1041, 2022. DOI: <http://www.doi.org/10.22038/IJBMS.2022.64330.14148>. Disponível em: https://ijbms.mums.ac.ir/article_20828.html. Acesso em: 9 jun. 2025.

GUPTA, P. R. Ambroxol - Resurgence of an old molecule as an anti-inflammatory agent in chronic obstructive airway diseases. **Lung India: Official Organ of Indian Chest Society**, Bombay, v. 27, n. 2, p. 46, 2010. DOI: <http://www.doi.org/10.4103/0970-2113.63603>. Disponível em: https://journals.lww.com/lungindia/fulltext/2010/27020/ambroxol___resurgence_of_an_old_molecule_as_an.2.aspx. Acesso em: 22 maio 2025.

HAMEED, Shaila. Nav1.7 and Nav1.8: Role in the pathophysiology of pain. **Molecular Pain**, London, v. 15, p. 1744806919858801, 2019. DOI: <http://www.doi.org/10.1177/1744806919858801>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1744806919858801>. Acesso em: 10 jun. 2025.

HAQUE, S. E.; GILANI, K.M.A. Effect of ambroxol, spirulina and vitamin-E in naphthalene induced cataract in female rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, New Delhi, v. 49, n. 1, p. 57-64, 2005. Disponível em: https://ijpp.com/IJPP%20archives/2005_49_1/57_64.pdf. Acesso em: 10 jun. 2025.

HORVÁTH, Ádám István *et al.* Novel multitarget analgesic candidate SZV-1287 demonstrates potential disease-modifying effects in the monoiodoacetate-induced osteoarthritis mouse model. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 15, p. e1377081, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1377081>. Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2024.1377081/full>. Acesso em: 25 maio 2025.

HU, Wenhui *et al.* Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 80, n. 4, p. 413, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218089>. Disponível em: [https://ard.eular.org/article/S0003-4967\(24\)10182-3/fulltext](https://ard.eular.org/article/S0003-4967(24)10182-3/fulltext). Acesso em: 25 maio 2025.

HU, Yan *et al.* Subchondral bone microenvironment in osteoarthritis and pain. **Bone Research** **2021 9:1**, Chengdu, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2021. DOI: <http://www.doi.org/10.1038/s41413-021-00147-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41413-021-00147-z>. Acesso em: 25 maio 2025.

HUNTER, David J.; BIERMA-ZEINSTRAS, Sita. Osteoarthritis. **The Lancet**, London, v. 393, n. 10182, p. 1745-1759, 2019. DOI: [http://www.doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](http://www.doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(19\)30417-9/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(19)30417-9/abstract). Acesso em: 1º jun. 2025.

ISTAITI, Majdolen *et al.* High-dose ambroxol therapy in type 1 gaucher disease focusing on patients with poor response to enzyme replacement therapy or substrate reduction therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 7, p. 6732, 2023. DOI: <http://www.doi.org/10.3390/ijms24076732>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/7/6732>. Acesso em: 16 jun. 2025.

IWANAGA, Toshihiko *et al.* Morphology and Functional Roles of Synoviocytes in the Joint. **Archives of Histology and Cytology**, Niigata, v. 63, n. 1, p. 17-31, 2000. DOI: <http://www.doi.org/10.1679/aohc.63.17>. Acesso em: 25 maio 2025.

JIANG, K. *et al.* Ambroxol alleviates hepatic ischemia reperfusion injury by antioxidant and antiapoptotic pathways. **Transplantation Proceedings**, New York, v. 45, n. 6, p. 2439-2445, 2013. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.04.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0041134513004958?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jun. 2025.

JIANG, Wenhao *et al.* PGE2 activates EP4 in subchondral bone osteoclasts to regulate osteoarthritis. **Bone Research**, Sichuan, v. 10, n. 1, p. 27, 2022. DOI: <http://www.doi.org/10.1038/s41413-022-00201-4>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41413-022-00201-4>. Acesso em: 2 jun. 2025.

JIN, Yunyun *et al.* A novel prostaglandin E receptor 4 (EP4) small molecule antagonist induces articular cartilage regeneration. **Cell Discovery**, London, v. 8, n. 1, p. 1-22, 2022. DOI: <http://www.doi.org/10.1038/s41421-022-00382-6>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41421-022-00382-6>. Acesso em: 2 jun. 2025.

JUNEJA, Pallavi; MUNJAL, Akul; HUBBARD, John. Anatomy, joints. *In*: STATPEARLS. [S. l.], 2025. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29939670/>. Acesso em: 25 maio 2025.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia básica**: texto e atlas. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KANTAR, Ahmad *et al.* An overview of efficacy and safety of ambroxol for the treatment of acute and chronic respiratory diseases with a special regard to children. **Multidisciplinary Respiratory Medicine**, Borgomanero, v. 15, n. 1, p. 511, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.4081/mrm.2020.511>. Disponível em: <https://mrmjournal.org/index.php/mrm/article/view/511>. Acesso em: 6 jun. 2025.

KAPOOR, Mohit *et al.* Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology** 2010, New York, v. 7, n. 1, p. 33-42, 2010. DOI: <http://www.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2010.196>. Acesso em: 1º jun. 2025.

KLOPPENBURG, Margreet; NAMANE, Mosedi; CICUTTINI, Flavia. The osteoarthritis. **Lancet**, London, v. 405, n. 10472, p. 71-85, 2025. DOI: [http://www.doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)02322-5](http://www.doi.org/10.1016/S0140-6736(24)02322-5). Disponível em: <https://www.thelancet.com/retrieve/pii/S0140673624023225>. Acesso em: 24 maio 2025.

KOHN, Mark D.; SASSOON, Adam A.; FERNANDO, Navin D. Classifications in brief: kellgren-lawrence classification of osteoarthritis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 474, n. 8, p. 1886-1893, 2016. DOI: <http://www.doi.org/10.1007/s11999-016-4732-4>. Disponível em: https://journals.lww.com/clinorthop/citation/2016/08000/classifications_in_brief__kellgren_lawrence.28.aspx. Acesso em: 20 maio 2025.

KOLASINSKI, Sharon L. *et al.* 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee. **Arthritis Care and Research**, Hoboken, v. 72, n. 2, p. 149-162, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.1002/acr.24131>. Disponível em: <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acr.24131>. Acesso em: 22 maio 2025.

KUSWANTO, Wilson; BAKER, Matthew C. Repurposing drugs for the treatment of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, London, v. 32, n. 8, p. 886-895, 2024. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.joca.2024.05.008>. Disponível em: <https://oarsijournal.com/retrieve/pii/S106345842401207X>. Acesso em: 22 maio 2025.

LAOAG-FERNANDEZ, Jovelle B.; FERNANDEZ, Alex M.; MARUO, Takeshi. Antenatal use of ambroxol for the prevention of infant respiratory distress syndrome. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 307-312, 2000. DOI: <http://www.doi.org/10.1111/j.1447-0756.2000.tb01327.x>. Disponível em: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1447-0756.2000.tb01327.x>. Acesso em: 16 jun. 2025.

LUO, Zhongyu *et al.* Disease burden and economic impact of osteoarthritis in working-age individuals (1990–2021): insights from the Global Burden of Disease Study 2021. **The Lancet**, London, 2024. Preprints. Disponível em: <https://papers.ssrn.com/abstract=4943732>. Acesso em: 22 maio 2025.

MA, Weiwei *et al.* Global, regional, and national epidemiology of osteoarthritis in working-age individuals: insights from the global burden of disease study 1990–2021. **Scientific Reports** 2025, London, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2025. DOI: <http://www.doi.org/10.1038/s41598-025-91783-6>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-025-91783-6>. Acesso em: 20 maio 2025.

MADALENO, Fernanda O. *et al.* Prevalence of knee osteoarthritis in former athletes: a systematic review with meta-analysis. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, São Carlos, v. 22, n. 6, p. 437-451, 2018. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.bjpt.2018.03.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413355517306275?via%3Dihub>. Acesso em: 21 maio 2025.

MALERBA, Mario; RAGNOLI, Beatrice. Ambroxol in the 21st century: Pharmacological and clinical update. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, London, v. 4, n. 8, p. 1119-1129, 2008. DOI: <http://www.doi.org/10.1517/17425255.4.8.1119>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.4.8.1119>. Acesso em: 5 jun. 2025.

MANDL, L. A. Osteoarthritis year in review 2018: clinical. **Osteoarthritis and Cartilage**, London, v. 27, n. 3, p. 359-364, 2019. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.joca.2018.11.001>. Disponível em: <https://oarsijournal.com/retrieve/pii/S1063458418315231>. Acesso em: 20 maio 2025.

MARTEL-PELLETIER, Johanne. Pathophysiology of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, London, v. 12, p. 31-33, 2004. Supplement A. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.joca.2003.10.002>. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(03\)00267-X/fulltext](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(03)00267-X/fulltext). Acesso em: 3 jun. 2025.

MEI, Jiahua *et al.* Regulation of apoptosis and interaction with cartilage degeneration in osteoarthritis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 13, p. 1571448, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2025.1571448>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2025.1571448/full>. Acesso em: 2 jun. 2025.

MEY, C. de *et al.* Efficacy and safety of an oral ambroxol spray in the treatment of acute uncomplicated sore throat. **Drug Research**, v. 65, n. 12, p. 658-667, 2015. DOI: <http://www.doi.org/10.1055/s-0035-1547229>. Disponível em: <https://www.thieme-connect.de/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0035-1547229>. Acesso em: 6 jun. 2025.

MIN, Ga-Yul *et al.* Inhibition effect of *Caragana sinica* root extracts on Osteoarthritis through MAPKs, NF-κB signaling pathway. **International Journal of Medical Sciences**, [Australia], v. 18, n. 4, p. 861-872, 2021. DOI: <http://www.doi.org/10.7150/ijms.52330>. Disponível em: <https://www.medsci.org/v18p0861.htm>. Acesso em: 2 jun. 2025.

MOBASHERI, Ali *et al.* The role of metabolism in the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, New York, v. 13, n. 5, p. 302-311, 2017. DOI: <http://www.doi.org/10.1038/nrrheum.2017.50>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2017.50>. Acesso em: 1º jun. 2025.

MOBASHERI, Ali; BATT, Mark. An update on the pathophysiology of osteoarthritis. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, Amsterdam, v. 59, n. 5-6, p. 333-339, 2016. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.rehab.2016.07.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877065716300847?via%3Dihub>. Acesso em: 20 maio 2025.

MORAIS, Sebastião Vieira de *et al.* Osteoarthritis model induced by intra-articular monosodium iodoacetate in rats knee. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 31, n. 11, p. 765-773, 2016. DOI: <http://www.doi.org/10.1590/S0102-865020160110000010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/acb/a/KYWQ63xvmJMMKyTBVRy6D9H/?lang=en>. Acesso em: 20 jun. 2025.

MULLIN, Stephen *et al.* Ambroxol for the treatment of patients with parkinson disease with and without glucocerebrosidase gene mutations: a nonrandomized, noncontrolled trial. **JAMA Neurology**, Chicago, v. 77, n. 4, p. 427-434, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.4611>. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/2758317>. Acesso em: 23 maio 2025.

NAHIAN, Ahmed; SAPRA, Amit. Histology, chondrocytes. In: STATPEARLS. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557576/>. Acesso em: 27 maio 2025.

NOWAK, Dariusz *et al.* Antioxidant properties of ambroxol. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 16, n. 4, p. 517-522, 1994. DOI: [http://www.doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90130-9](http://www.doi.org/10.1016/0891-5849(94)90130-9). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0891584994901309?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jun. 2025.

OHASHI, Yoshihisa *et al.* Mechanisms of peripheral and central sensitization in osteoarthritis pain. **Cureus**, Palo Alto, v. 15, n. 2, p. e35331, 2023. DOI: <http://www.doi.org/10.7759/cureus.35331>. Disponível em: <https://www.cureus.com/articles/129641-mechanisms-of-peripheral-and-central-sensitization-in-osteoarthritis-pain#!/>. Acesso em: 10 jun. 2025.

OLLIER, Celine *et al.* Pharmacokinetics of ambroxol sustained release (Mucosolvan® Retard) compared with other formulations in healthy volunteers. **Pulmonary Therapy**, New York, v. 6, n. 1, p. 119, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.1007/s41030-020-00116-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s41030-020-00116-7>. Acesso em: 6 jun. 2025.

OOSTERHUIS, B. *et al.* Dose-dependent uricosuric effect of ambroxol. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 237-241, 1993. DOI: <http://www.doi.org/10.1007/BF00271364>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00271364>. Acesso em: 17 jun. 2025.

PALEARI, Davide *et al.* Ambroxol: A multifaceted molecule with additional therapeutic potentials in respiratory disorders of childhood. **Expert Opinion on Drug Discovery**, London, v. 6, n. 11, p. 1203-1214, 2011. DOI: <http://www.doi.org/10.1517/17460441.2011.629646>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17460441.2011.629646>. Acesso em: 6 jun. 2025.

PELLETIER, Jean Pierre; MARTEL-PELLETIER, Johanne; ABRAMSON, Steven B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. **Arthritis & Rheumatism**, Atlanta, v. 44, n. 6, p. 1237-1247, 2001. DOI: [http://www.doi.org/10.1002/1529-0131\(200106\)44:6<1237::AID-ART214>3.0.CO;2-F](http://www.doi.org/10.1002/1529-0131(200106)44:6<1237::AID-ART214>3.0.CO;2-F). Disponível em: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131\(200106\)44:6<1237::AID-ART214>3.0.CO;2-F](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131(200106)44:6<1237::AID-ART214>3.0.CO;2-F). Acesso em: 2 jun. 2025.

PELLICORE, Matthew J. *et al.* Toward defining the role of the synovium in mitigating normal articular cartilage wear and tear. **Journal of Biomechanics**, New York, v. 148, p. 111472, 2023. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2023.111472>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021929023000416?via%3Dihub>. Acesso em: 25 maio 2025.

PINZI, Luca; BISI, Nicolò; RASTELLI, Giulio. How drug repurposing can advance drug discovery: challenges and opportunities. **Frontiers in Drug Discovery**, Lausanne, v. 4, p. 1460100, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fddsv.2024.1460100>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/drug-discovery/articles/10.3389/fddsv.2024.1460100/full>. Acesso em: 22 maio 2025.

PIRES, Diego Pontes de Carvalho *et al.* Updates in the treatment of knee osteoarthritis. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 59, n. 3, p. 337-348, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0044-1786351>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbort/a/kstrgZKJ3fbz5fKv3THTbpv/?format=html&lang=en>. Acesso em: 22 maio 2025.

PONUGOTI, Sai Srinivas *et al.* Ambroxol hydrochloride: a comprehensive review on industrial-scale synthesis, pharmacological aspects & therapeutic applications. **ChemistrySelect**, [S. l.], v. 9, n. 40, p. e202401887, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/slct.202401887>. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/slct.202401887>. Acesso em: 6 jun. 2025.

POOJA, Gori; SHWETA, Singh; PATEL, Pratixa. Oxidative stress and free radicals in disease pathogenesis: a review. **Discover Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 1-15, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s44337-025-00303-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s44337-025-00303-y>. Acesso em: 7 jun. 2025.

PUSHPAKOM, Sudeep *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 18, n. 1, p. 41-58, 2018. DOI: <http://www.doi.org/10.1038/nrd.2018.168>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30310233/>. Acesso em: 22 maio 2025.

QIAN, Liang *et al.* Diosmetin ameliorates osteoarthritic inflammation in vivo and ECM macromolecules degradation in interleukin-1 β -stimulated murine chondrocytes through the Nrf2/NF- κ B pathway. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Warszawa, v. 62, n. 2, p. 99-109,

2024. DOI: <http://www.doi.org/10.5603/fhc.100071>. Disponível em: https://journals.viamedica.pl/fofia_histochemica_cytobiologica/article/view/100071. Acesso em: 1º jun. 2025.

RAHMAN, W.; DICKENSON, A. H. Osteoarthritis-dependent changes in antinociceptive action of Nav1.7 and Nav1.8 sodium channel blockers: An in vivo electrophysiological study in the rat. **Neuroscience**, Oxford, v. 295, p. 103-116, 2015. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.042>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452215002791>. Acesso em: 10 jun. 2025.

REN, Jia Le; YANG, Junnan; HU, Wan. The global burden of osteoarthritis knee: a secondary data analysis of a population-based study. **Clinical Rheumatology**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 1769-1810, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10067-025-07347-6>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10067-025-07347-6>. Acesso em: 24 maio 2025.

REZENDE, Márcia Uchôa de *et al.* Cartilagem articular e osteoartrose. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 100-104, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-78522000000200005>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aob/a/WSKJ8KKTPJcwTttXKRbNQzC/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 27 maio 2025.

RUSSO, Marc A. *et al.* Ambroxol for neuropathic pain: Hiding in plain sight? **Pain**, Amsterdam, v. 164, n. 1, p. 3-13, 2023. DOI: <http://www.doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002693>. Disponível em: https://journals.lww.com/pain/abstract/2023/01000/ambroxol_for_neuropathic_pain__hiding_in_plain.7.aspx. Acesso em: 22 maio 2025.

SAFIRI, Saeid *et al.* Global, regional and national burden of osteoarthritis 1990-2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v. 79, n. 6, p. 819-828, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-216515>. Disponível em: <https://ard.eular.org/retrieve/pii/S0003496724013700>. Acesso em: 20 maio 2025.

SAVVARI, P. *et al.* Moderate to severe osteoarthritis: what is the economic burden for patients and the health care system? insights from the “ponos” study. **Cartilage**, Los Angeles, v. 15, n. 3, p. 268-277, 2024. DOI: <http://www.doi.org/10.1177/19476035231196524>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/19476035231196524>. Acesso em: 22 maio 2025.

SEIDMAN, Aaron J.; LIMAIE, Faten. Synovial fluid analysis. In: STATPEARLS. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537114/>. Acesso em: 26 maio 2025.

SEN, Rouhin; HURLEY, John A. Osteoarthritis. In: STATPEARLS. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482326/>. Acesso em: 4 jun. 2025.

SINUSAS, K. Osteoarthritis: diagnosis and treatment. **American Family Physician**, Kansas City, v. 85, n. 1, p. 49-56, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22230308/>. Acesso em: 26 maio 2025.

SORDI, Regina; LIMA JÚNIOR, Octávio Menezes de; ASSREUY, Jamil. Biossíntese e funções das lipoxinas na resolução da inflamação. Biosynthesis and functions of lipoxins in the resolution of inflammation. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v. 18, n. 1, p. 7-13, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5212/publicatio%20uepg.v18i1.4688>. Disponível em: <https://revistas.uepg.br/index.php/biologica/article/view/4688>. Acesso em: 2 jun. 2025.

STEINMETZ, Jaimie D. *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. **The Lancet Rheumatology**, London, v. 5, n. 9, p. e508-e522, 2023. DOI: [http://www.doi.org/10.1016/S2665-9913\(23\)00163-7](http://www.doi.org/10.1016/S2665-9913(23)00163-7). Disponível em: <https://www.thelancet.com/retrieve/pii/S2665991323001637>. Acesso em: 23 maio 2025.

ŠTĚTINOVÁ, V.; HEROUT, V.; KVĚTINA, J. In vitro and in vivo antioxidant activity of ambroxol. **Clinical and Experimental Medicine**, Milano, v. 4, n. 3, p. 152-158, 2004. DOI: <http://www.doi.org/10.1007/s10238-004-0050-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10238-004-0050-3>. Acesso em: 9 jun. 2025.

STEVENSON, Glenn W. *et al.* Monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis produces pain-depressed wheel running in rats: Implications for preclinical behavioral assessment of chronic pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 98, n. 1, p. 35-42, 2011. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.pbb.2010.12.009>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305710003850>. Acesso em: 31 jul. 2025.

SU, Xiao *et al.* Inhibition of inflammatory responses by ambroxol, a mucolytic agent, in a murine model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. **Intensive Care Medicine**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 133-140, 2004. DOI: <http://www.doi.org/10.1007/s00134-003-2001-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00134-003-2001-y>. Acesso em: 9 jun. 2025.

SUN, Xueshan *et al.* Osteoarthritis in the middle-aged and elderly in china: prevalence and influencing factors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 16, n. 23, p. 4701, 2019. DOI: <http://www.doi.org/10.3390/ijerph16234701>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/23/4701>. Acesso em: 20 maio 2025.

SUNKARI, Shruthi *et al.* Protective effects of ambroxol in psoriasis like skin inflammation: Exploration of possible mechanisms. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 71, p. 301-312, 2019. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.intimp.2019.03.035>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576918309056>. Acesso em: 9 jun. 2025.

ULLAH, Safi *et al.* Ambroxol attenuates detrimental effect of LPS-induced glia-mediated neuroinflammation, oxidative stress, and cognitive dysfunction in mice brain. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 16, p. 1494114, 2025. DOI: <http://www.doi.org/10.3389/fimmu.2025.1494114>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2025.1494114/full>. Acesso em: 5 jun. 2025.

VELASCO, Javier Alvarez; BIOIBERICA, S. A. U. do not disregard the use of chondroitin sulfate for knee OA: comment on the article by Kolasinski et al. **Arthritis Care and Research**, Hoboken, v. 72, n. 11, p. 1664-1665, 2020. DOI: <http://www.doi.org/10.1002/acr.24405>.

Disponível em: <https://acrjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/acr.24405>. Acesso em: 5 jun. 2025.

VELOSA, Ana Paula P.; TEODORO, Walcy R.; YOSHINARI, Natalino H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 160-166, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/KnHLKnxph95CRXKq3HGGwZy/?format=html&lang=pt>. Acesso em: 29 maio 2025.

VINCENT, Tonia L.; MILLER, Rachel E. Molecular pathogenesis of OA pain: Past, present, and future. **Osteoarthritis and Cartilage**, London, v. 32, n. 4, p. 398-405, 2024. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.joca.2024.01.005>. Disponível em: [https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584\(24\)00021-9/fulltext](https://www.oarsijournal.com/article/S1063-4584(24)00021-9/fulltext). Acesso em: 10 jun. 2025.

WANG, Bei *et al.* Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, Sichuan, v. 6, n. 1, p. 1-30, 2021. DOI: <http://www.doi.org/10.1038/s41392-020-00443-w>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41392-020-00443-w>. Acesso em: 2 jun. 2025.

WEISER, Thomas; WILSON, Nicola. Inhibition of tetrodotoxin (TTX)-resistant and TTX-sensitive neuronal Na⁺ channels by the secretolytic ambroxol. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 62, n. 3, p. 433-438, 2002. DOI: <http://www.doi.org/10.1124/mol.62.3.433>. Disponível em: [https://molpharm.aspetjournals.org/article/S0026-895X\(24\)13612-7/abstract](https://molpharm.aspetjournals.org/article/S0026-895X(24)13612-7/abstract). Acesso em: 10 jun. 2025.

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

Mediators of Inflammation, Oxford, v. 2014, n. 1, p. 561459, 2014. DOI:

<http://www.doi.org/10.1155/2014/561459>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2014/561459>. Acesso em: 1º jun. 2025.

XIA, Bingjiang *et al.* Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. **Calcified Tissue International**, Berlin, v. 95, n. 6, p. 495, 2014. DOI:

<http://www.doi.org/10.1007/s00223-014-9917-9>.

Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00223-014-9917-9>. Acesso em: 2 jun. 2025.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CIAEP: 02.0341.2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO



C E R T I F I C A D O (11/2023)

Certificamos que a proposta intitulada: **"Avaliação do efeito analgésico e anti-inflamatório do ambroxol em modelo experimental de osteoartrite em rato"** Processo 23115.013021/2022-17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Batista Santos Garcia e da Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartagenes,, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 21 de setembro de 2022.

We certify that the proposal: **"Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of ambroxol in an experimental model of osteoarthritis in rats"**, Process 23115.013021/2022-17, under the responsibility of Prof. Dr. João Batista Santos Garcia and Prof. Dr. Maria do Socorro de Sousa Cartagenes, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of September 21, 2022.

PROPOSTA

Finalidade: Pesquisa **Área:** Ciências da Saúde
Vigência: 10/05/2023 a 01/08/2026

ANIMAIS

Origem: Biotério Central da UFMA

Espécie: *Rattus norvegicus* **Sexo:** Machos **Idade:** 60 dias
var. Wistar **Peso:** 230-300g

AMOSTRA
30 ratos

Local do experimento: Biotério Setorial do Prédio de Pós-Graduação do CCBS

São Luís, 10 de maio de 2023

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais



Documento assinado digitalmente
BRUNO ARAUJO SERRA PINTO
Data: 10/05/2023 10:42:34-0300
Verifique em <https://validar.id.gov.br>

ANEXO B – USO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

DECLARAÇÃO DE ACORDO PARA UTILIZAÇÃO DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

(Art. 12, inciso I, da Resolução nº 374/2025 – CONSAD)

Eu, **Michelline Joana Tenório Albuquerque Madruga Mesquita**, discente regularmente matriculada no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, declaro que fui devidamente autorizada pelo **Prof. Dr. João Batista Santos Garcia**, orientador do projeto de pesquisa intitulado: **“Avaliação do Efeito Analgésico e Anti-inflamatório do Ambroxol em Modelo Experimental de Osteoartrite em Rato”**, a utilizar ferramentas de Inteligência Artificial no desenvolvimento das atividades acadêmicas relacionadas a este trabalho.

O uso da Inteligência Artificial foi realizado de forma ética, responsável e transparente, com a finalidade de apoio à organização de ideias, revisão textual, esclarecimento conceitual e aprimoramento da escrita, **não substituindo a autoria intelectual, a análise crítica ou a responsabilidade acadêmica da discente.**

Este acordo está em conformidade com o disposto no Art. 12, inciso I, da Resolução nº 374/2025 – CONSAD, que estabelece a necessidade de acordo prévio entre discente e docente, com registro da autorização para uso de IA no contexto acadêmico .

Declaro, ainda, que todas as informações, análises, interpretações e conclusões apresentadas no trabalho são de minha inteira responsabilidade, respeitando os princípios da integridade acadêmica e da originalidade.

Por ser verdade, firmamos a presente declaração.

Prompts/Comandos Utilizados (Art. 12, inciso III)

- i. *“Atue como um pesquisador. Realize uma revisão da literatura científica (PubMed, SciELO e Embase) sobre a osteoartrite abordando sua fisiopatologia, impacto funcional, prevalência global e fatores de risco associados, com base em diretrizes atuais e literatura científica. ”*
- ii. *“Atue como um pesquisador em farmacologia experimental. Realize uma revisão da literatura científica (PubMed, SciELO e Embase) sobre os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios do ambroxol. Apresente os principais mecanismos de ação, incluindo modulação de citocinas inflamatórias, estresse oxidativo e canais de sódio voltagem-dependentes. ”*
- iii. *“Auxilie na busca e organização de artigos científicos sobre a identificação de estudos sobre a fisiopatologia da osteoartrite, incluindo o desequilíbrio entre processos anabólicos e catabólicos da cartilagem, com ênfase em citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6), metaloproteinases (MMPs), ADAMTs, fatores de crescimento (TGF- β , IGF-1), estresse oxidativo (ROS, NO) e via do ácido araquidônico (COX-2, PGE2). ”*

- iv. *“Atue como especialista em dor e apoie a busca de evidências científicas sobre os mecanismos de dor na osteoartrite, incluindo sensibilização periférica e central, participação de fibras Aδ e C, receptores NMDA e desenvolvimento de dor neuropática.”*
- v. *“Como pesquisador em dor, explique os principais métodos de avaliação de dor em modelos experimentais de osteoartrite em ratos, incluindo teste de Von Frey, weight-bearing, análise de marcha e grimace scale.”*
- vi. *“Forneça suporte na busca e organização de estudos sobre o modelo experimental de osteoartrite induzida por monoiodoacetato (MIA), incluindo seu mecanismo de ação, alterações estruturais e funcionais, bem como avaliação histológica por meio do escore OARSI e análise radiográfica utilizando a classificação de Kellgren-Lawrence, considerando sua aplicabilidade em estudos pré-clínicos.”*

Assinatura da Discente: _____

Assinatura do Docente: _____