



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**RODOLFO DE MELO NUNES**

**AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS  
EM PACIENTES COM OSTEOARTRITE**

**FORTALEZA**

**2013**

RODOLFO DE MELO NUNES

AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE GLICOSAMINOGLICANOS EM  
PACIENTES COM OSTEOARTRITE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

FORTALEZA

2013

RODOLFO DE MELO NUNES

AValiação Qualitativa e Quantitativa de Glicosaminoglicanos em  
Pacientes com Osteoartrite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra Ana Caroline Rocha de Melo Leite

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

(UNILAB)

---

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha

Universidade federal do Ceará (UFC)

A cada um que contribuiu direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, especialmente à minha família, avô Luiza, meu orientador e amigos do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias – LIO – UFC.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que na sua imensa divindade se torna humilde para compreender a condição humana.

A minha avó (*in memoriam*), Luisa, incentivadora, imensurável apoio, e sempre sonhou comigo tudo que conquistei.

A minha mãe Valéria e avó João, pelo imensurável apoio, constante incentivo e imensa colaboração na formação da minha pessoa.

As minhas irmãs, Raylane, Rayane e Rayadna, pela eterna disponibilidade.

Ao meu tio Júnior, pelo companheirismo e exemplo de dedicação à docência e pesquisa.

Ao meu orientador, Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelo constante incentivo e aprendizado.

A Ana Carolina Matias e Ana Caroline, pelo imenso carinho, presença constante e inquestionáveis conselhos.

Aos meus amigos Joatan, Cosme, Adriano e Walter Breno, pela sincera amizade, constante presença e exemplo de conhecimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos do LIO: Natália Gomes dos Santos, Francisco Saraiva da Silva Júnior, Lucas de Ponte Melo, Fernando Alencar, Aryana Feitosa, Aline Alves, Esperança Caetano e Caio pelo imenso apoio e aprendizado.

Aos amigos de pós-graduação: Maritza, Talyta Hellen, Kamila, Anielle Torres Paulo, pelos momentos de aprendizado pessoal e científico e imensa disponibilidade.

Aos professores, por terem compartilhado seus conhecimentos e pela colaboração na minha formação científica.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, especialmente às secretárias Ivone Mary Fontenelle de Sousa e Rita de Cássia de Almeida.

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Ceará pela gentileza na doação dos animais para a execução desse trabalho.

A CAPES, CNPq e FUNCAP, por terem confiado plenamente na realização desse projeto e terem concedido financiamento para a execução desse trabalho.

## RESUMO

A cartilagem articular é um tecido avascular constituído por condrócitos dispersos em uma matriz extracelular abundante (MEC) que reveste as superfícies articulares e protege as extremidades ósseas. Além do fluido intersticial, a MEC é composta por proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas. Doenças articulares, como a osteoartrite (OA), promovem a degradação da cartilagem articular e esclerose do osso subcondral, levando à dor crônica e comprometimento funcional das articulações. Neste contexto, a quantificação de GAGs é utilizada para estudar o papel das alterações fisiológicas ou patológicas da cartilagem articular. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar as alterações bioquímicas da cartilagem articular humana e de rato com ou sem a OA. As cartilagens humanas foram obtidas de pacientes submetidos à artroplastia por OA ou por fratura. Ratos Wistar machos (150-180g) foram submetidos à osteoartrite experimental que consiste na transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). Grupo *sham* foi submetido apenas ao procedimento cirúrgico, sem transecção. Inicialmente, as amostras de cartilagem foram submetidas à ação do complexo enzimático PROLAV 750<sup>R</sup>, obtendo-se ao final do processo, os GAGs. Esses foram identificados e quantificados em gel de agarose (0,6%) e a massa molar foi avaliada em gel de poli(acrilamida) (6% w/v). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.), submetidos à ANOVA e teste de Tukey (P<0,05) ou teste “t” de Student (P<0,05). Em ratos, o rendimento da degradação da cartilagem pela PROLAV 750<sup>R</sup> foi significativamente diminuída após 70 dias de TLCA (P<0,05). Quanto à quantificação de GAGs, houve um aumento significativo do conteúdo de GAGs após 70 dias de TLCA. Em humanos, o percentual de massa degradada pela PROLAV foi reduzida na presença de OA. Os pacientes com OA com idade inferior a 80 anos apresentaram aumento significativo da quantidade de GAGs, quando comparado ao grupo controle. Quanto à mobilidade eletroforética, GAGs de pacientes com OA apresentaram alteração da massa molar. Esses achados mostram que tanto a cartilagem proveniente de pacientes acometidos por OA quanto animais submetidos à OA experimental apresentam menor rendimento à degradação enzimática, aumento da quantidade de CS e alteração da massa molar.

**Palavras-chave:** Cartilagem, glicosaminoglicanos, idade e osteoartrite.

## ABSTRACT

Articular cartilage is an avascular tissue composed of chondrocytes scattered in an abundant extracellular matrix (ECM) that lines the joint surfaces and protects the bone ends. In addition to the interstitial fluid, the ECM is composed of proteoglycans, glycosaminoglycans (GAGs) and glycoproteins. Joint diseases such as osteoarthritis (OA), promote the degradation of articular cartilage and subchondral bone sclerosis, leading to chronic pain and functional impairment of the joints. In this context, the quantification of GAGs is used as a means to study the physiological or pathological changes of articular cartilage. The objective of this study was to evaluate the biochemical changes of the articular cartilage of human and rat normal or affected by OA. The human cartilage was obtained from patients submitted to arthroplasty for OA or fracture. Male Wistar rats (150-180g) were submitted to the anterior cruciate ligament transection (ACLT). *Sham* group was submitted to only to surgery without transection. Initially, the cartilage samples were submitted to the action of the enzymatic complex PROLAV 750<sup>R</sup>, getting to the end of the process, the GAGs. These were identified and quantified in agarose gel (0.6%) and molar mass was assessed in polyacrylamide gel (6% w/v). The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.) were submitted to ANOVA and Tukey's test ( $P < 0.05$ ) or "t" test of Student ( $P < 0.05$ ). In rats, the effective proteolysis was significantly decreased after 70 days of ACLT ( $P < 0.05$ ). In the quantification of GAGs, there was a significant increase in GAG content after 70 days of ACLT. In humans, the percentage of mass degraded by PROLAV was altered by presence of OA. The OA patients under 80 years of age showed a significant increase in the amount of GAGs compared to the control group. In the electrophoretic mobility, GAGs of patients with OA showed abnormalities of the molar mass. These findings show that both cartilage from patients affected by OA as experimental animals subjected to OA have lower effective proteolysis, increasing the amount of CS and alteration of the molar mass.

**Keywords:** cartilage, glycosaminoglycans, age, osteoarthritis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	<b>Visão macroscópica e microscópica da matriz cartilaginosa</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2 -</b>	<b>Estrutura da matriz cartilaginosa em suas diferentes zonas ou camadas</b>	<b>12</b>
<b>Figura 3 -</b>	<b>Estrutura do proteoglicano</b>	<b>13</b>
<b>Figura 4 -</b>	<b>Esquema do protocolo de extração de glicosaminoglicanos da cartilagem articular.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 5-</b>	<b>Quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular em gel de agarose (0,6%)</b>	<b>24</b>
<b>Figura 6 -</b>	<b>Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (6% w/v) de condroitin-4-sulfato (C4S) e condroitin-6-sulfato (C6S).</b>	<b>26</b>
<b>Figura 7 -</b>	<b>A eficiência da proteólise (rendimento) após 70 dias de experimento.</b>	<b>27</b>
<b>Figura 8 -</b>	<b>Cinética da quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular de ratos submetidos ou/não à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA)</b>	<b>28</b>
<b>Figura 9 -</b>	<b>Avaliação da eficiência da proteólise da cartilagem articular do quadril.</b>	<b>29</b>
<b>Figura 10 -</b>	<b>Avaliação da quantidade do CS extraído da cartilagem articular do quadril.</b>	<b>30</b>

<b>Figura 11-</b>	<b>Mobilidade relativa dos glicosaminoglicanos (GAGs) extraídos da cartilagem articular do quadril, na presença ou não de osteoartrite (OA), em gel de poliacrilamida.</b>	<b>31</b>
<b>Figura 12-</b>	<b>Avaliação da eficiência da proteólise da cartilagem articular por faixa etária e independente da área em pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.</b>	<b>32</b>
<b>Figura 13-</b>	<b>Avaliação da quantidade de condroitin-sulfato na cartilagem articular com idade e independente da área em pacientes submetidos à artroplastia.</b>	<b>33</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 -</b>	<b>Características estruturais dos principais glicosaminoglicanos</b>	<b>15</b>
<b>Tabela 2 -</b>	<b>Número de pessoas por grupo, sexo e faixa etária</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 3 -</b>	<b>Número de pessoas por grupo, sexo, membro e faixa etária</b>	<b>20</b>
<b>Tabela 4 -</b>	<b>Número de animais por grupo e experimento</b>	<b>21</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADAMTS</b>	<b>Disintegrin end metalloproteinases with thrombospondin motifs</b>
<b>AGE</b>	<b>Advanced glycation end-products</b>
<b>ANOVA</b>	<b>Análise de variância univariada</b>
<b>ASC</b>	<b>Área sob a curva</b>
<b>CA</b>	<b>Cartilagem articular</b>
<b>CEPA</b>	<b>Comitê de Ética em Experimentação Animal</b>
<b>COMP</b>	<b>Proteína oligomérica da matriz da cartilagem</b>
<b>C4</b>	<b>Carbono 4</b>
<b>C6</b>	<b>Carbono 6</b>
<b>C4S</b>	<b>Condroitin-4-sulfato</b>
<b>C6S</b>	<b>Condroitin-6-sulfato</b>
<b>CTV</b>	<b>Brometo de cetil-trimetil-amônio</b>
<b>DO</b>	<b>Densidade óptica</b>
<b>DS</b>	<b>Dermatan-sulfato</b>
<b>E.P.M</b>	<b>Erro padrão da média</b>
<b>GAGS</b>	<b>Glicosaminoglicanos</b>
<b>GAG- GluGalGalXyl- O-CH<sub>2</sub>-</b>	<b>Xilose-galactose-galactose-ácido glucurônico</b>
<b>HS</b>	<b>Heparan-sulfato</b>
<b>HUWC</b>	<b>Hospital Universitário Walter Cantídio</b>

<b>LCA</b>	<b>Ligamento cruzado anterior</b>
<b>MEC</b>	<b>Matriz extracelular</b>
<b>MMP</b>	<b>Matriz metaloprotease</b>
<b>Mw</b>	<b>Massa molar</b>
<b>OA</b>	<b>Osteoartrite</b>
<b>P</b>	<b>Precipitado</b>
<b>QS</b>	<b>Queratan-sulfato</b>
<b>SB</b>	<b>Sobrenadante</b>
<b>TCLE</b>	<b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b>
<b>TLCA</b>	<b>Transecção do ligamento cruzado anterior</b>
<b>THIS</b>	<b>Tris(hidroximetil)aminometano</b>
<b>V</b>	<b>Volts</b>
<b>WISTAR</b>	<b>Espécie de rato</b>
<b>ΔM</b>	<b>Rendimento na degradação da cartilagem</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>1.1</b>	<b>Cartilagem</b>	<b>10</b>
<b>1.2</b>	<b>Proteoglicanos</b>	<b>12</b>
<b>1.3</b>	<b>Glicosaminoglicanos</b>	<b>13</b>
<b>1.4</b>	<b>Idade</b>	<b>14</b>
<b>1.5</b>	<b>Osteoartrite</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>Coleta de material biológico para o estudo</b>	<b>19</b>
<b>4.2</b>	<b>Animais</b>	<b>20</b>
<b>4.3</b>	<b>Indução da osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)</b>	<b>21</b>
<b>4.4</b>	<b>Extração de glicosaminoglicanos (GAGs)</b>	<b>21</b>
<b>4.5</b>	<b>Determinação do rendimento da degradação da cartilagem articular humana e de ratos</b>	<b>23</b>
<b>4.6</b>	<b>Identificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular humana por eletroforese em gel de agarose.</b>	<b>23</b>

<b>4.7</b>	<b>Quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular humana e de rato por eletroforese em gel de agarose.</b>	<b>23</b>
<b>4.8</b>	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida 6%.</b>	<b>24</b>
<b>4.9</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>5.1</b>	<b>A eficiência da proteólise (rendimento) da cartilagem articular de ratos à degradação pelo complexo enzimático PROLAV</b>	<b>27</b>
<b>5.2</b>	<b>Quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular de ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA)</b>	<b>28</b>
<b>5.3</b>	<b>A eficiência da proteólise (rendimento) da cartilagem articular do quadril de seres humanos à degradação pelo complexo enzimático PROLAV</b>	<b>29</b>
<b>5.4</b>	<b>Quantificação dos GAGs extraídos da cartilagem articular do quadril após eletroforese em gel de agarose</b>	<b>30</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação da massa molar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa do quadril</b>	<b>31</b>
<b>5.6</b>	<b>Avaliação da eficiência da proteólise da cartilagem articular em pacientes submetidos à artroplastia</b>	<b>32</b>
<b>5.7</b>	<b>Quantificação do CS extraído da cartilagem articular em pacientes submetidos à artroplastia</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>38</b>

<b>ANEXO</b>	<b>44</b>
<b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. Cartilagem Articular

A cartilagem articular (CA) é a cartilagem hialina que reveste as superfícies articulares, tornando-as lisas, polidas e esbranquiçadas. Além de revestir e proteger as extremidades ósseas contra atritos e lesões, a cartilagem articular absorve, distribui e transmite as forças compressivas incidentes sobre ela (MARTEL-PELLETIER et al., 2008). Sua espessura e composição são influenciadas por fatores como: superfície óssea; posição anatômica; espécie (SIMON, 1970). No adulto, sua espessura praticamente não se altera, embora apresente uma leve redução com a idade.

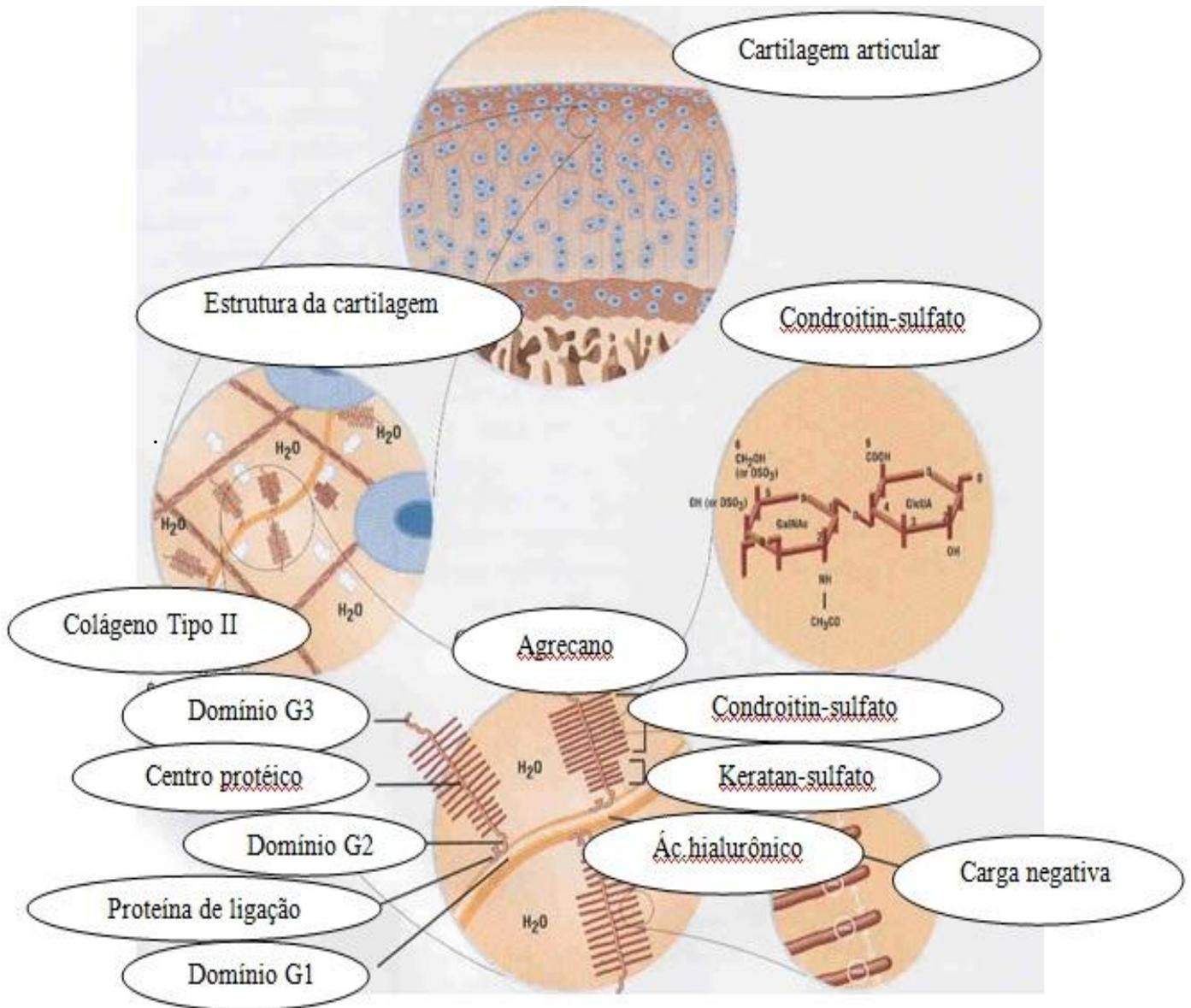
Caracterizada por ser um tecido aneural e avascular, a cartilagem articular é constituída por condrócitos dispersos em uma matriz extracelular (MEC) abundante, de aspecto homogêneo e translúcido formada por matriz orgânica e fluido intersticial. Correspondendo a 20-30% do peso úmido, a matriz orgânica é composta por colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas (Figura 1). Quanto ao fluido intersticial, a água é o seu principal constituinte, correspondendo a 60-80% do peso total. Constituindo cerca de 1-10% do peso úmido, os condrócitos são responsáveis pela síntese e degradação da MEC (ESPANHA, 2010).

Responsável pela resistência, o colágeno é a macromolécula mais abundante na cartilagem articular. Sua distribuição varia de acordo com a profundidade da cartilagem, sendo mais concentrada nas camadas superficiais. Sintetizado pelos condrócitos, colágeno tipo II é o principal componente da fibra colágena, estando disperso na matriz (sob a forma de fibrilas) e colaborando para a integridade estrutural da cartilagem. Entretanto, colágenos do tipo III, IX, XI e outros podem ser observados em menor quantidade (EYRE et al., 2002; GOLDRING & GOLDRING, 2005).

Embora ocorram diferenças na sua estrutura e composição, a cartilagem articular pode ser dividida em quatro regiões ou zonas: superficial, camada em contato com o líquido sinovial caracterizada pela abundância de colágeno e escassez de proteoglicanos; média, caracterizada pela presença de fibras colágenas dispostas quase obliquamente e proteoglicanos dispostos uniformemente; radiada, caracterizada por fibras dispostas paralelamente e abundância de proteoglicanos; calcificada, caracterizada pelo contato direto

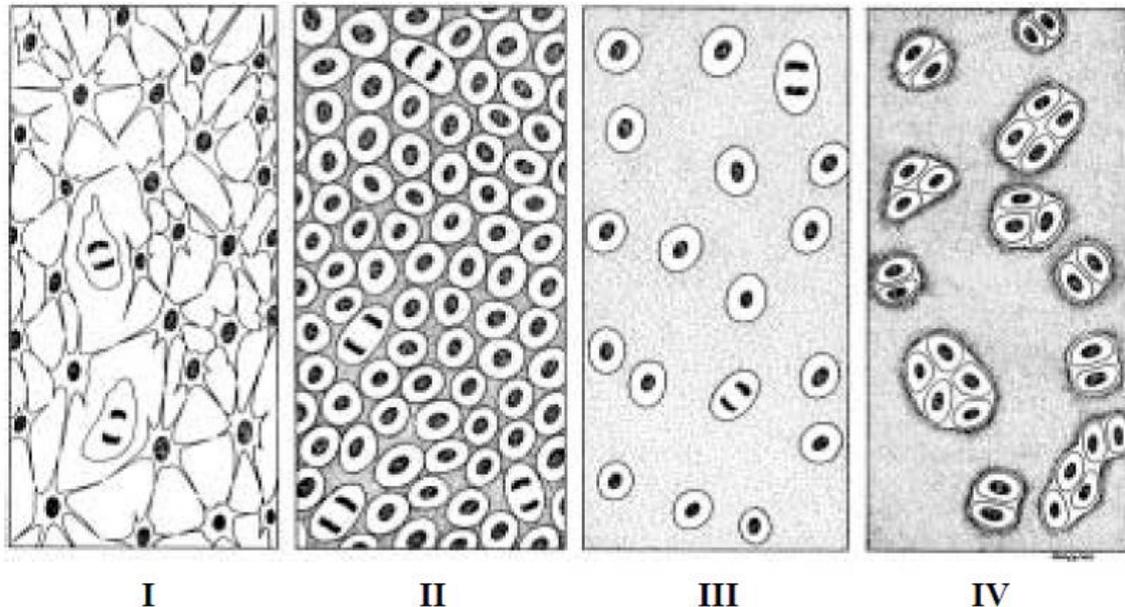
com o osso subcondral e presença de matriz mineralizada e pobre em proteoglicanos (SIMON, 1970) (Figura 2)

**Figura 1 - Visão macroscópica e microscópica da matriz cartilaginosa.**



Fonte: <http://fisioliferodrigorivelino.blogspot.com.br/2011/04/dad-cartilagem-articular.html>

**Figura 2 - Estrutura da matriz cartilaginosa em suas diferentes zonas ou camadas. Superficial ou tangencial (I), média ou de transição (II), radiada ou profunda (III) e calcificada (IV).**



Fonte: JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008.

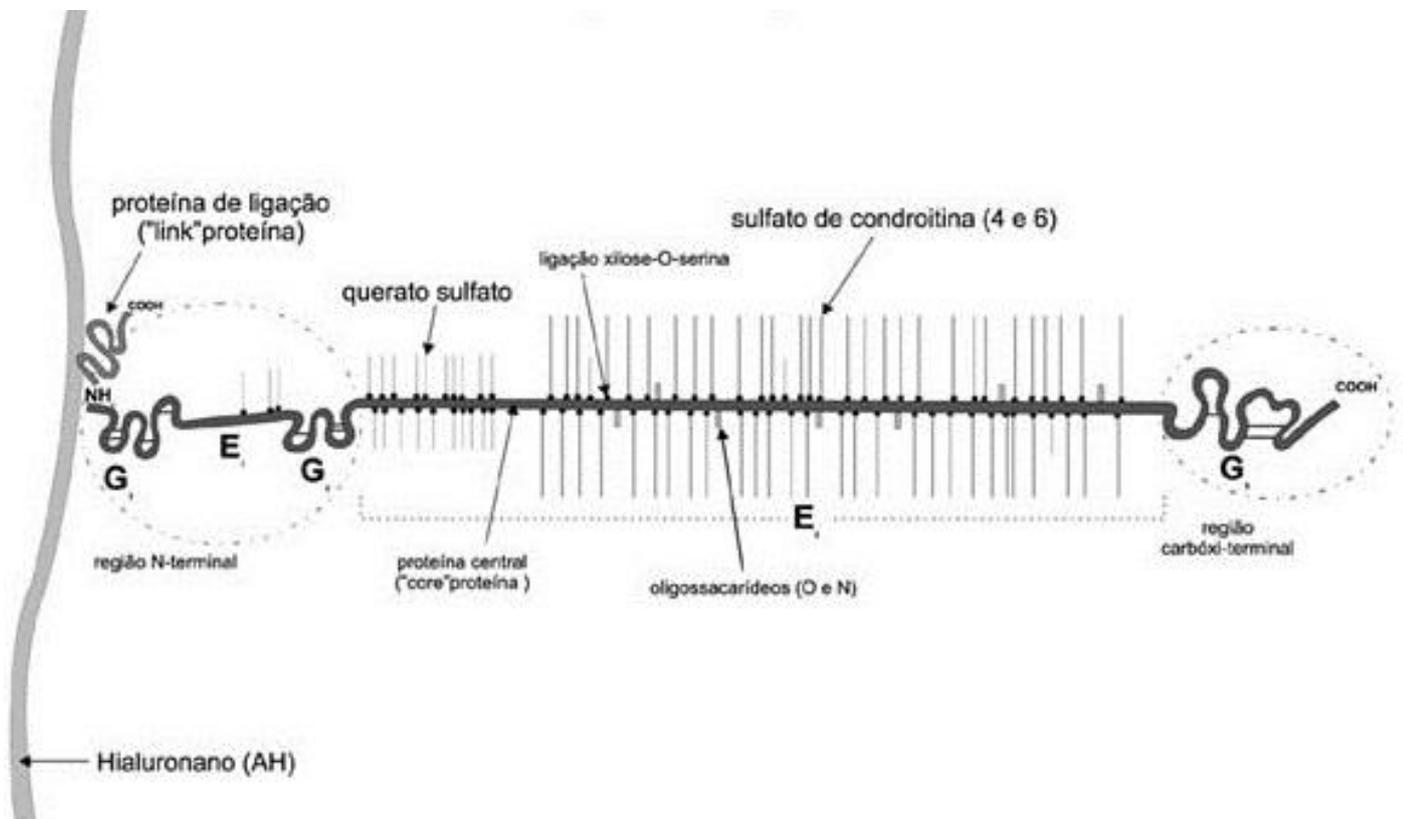
### 1.1.2. Proteoglicanos

Os proteoglicanos são moléculas formadas por um eixo protéico no qual se ligam covalentemente cadeias laterais de GAGs. A ligação desses ao centro protéico envolve o tetrassacarídeo, xilose-galactose-galactose-ácido glucurônico (GAG-GluGalGalXyl-O-CH<sub>2</sub>-proteína ou xilose-o-serina), ou o N-asparaginil (LINCECUM et al., 1999; GANDHI & MANCERA, 2008). Sua estrutura, representada por uma proteína central (*core protein*) na qual se ligam perpendicularmente cadeias laterais de GAGs, associada à repulsão dessas cadeias pelas cargas negativas do ácido carboxílico e sulfato dos GAGs, contribuem para o aspecto de “escova de tubo de ensaio” dos proteoglicanos.

Em condições normais, proteoglicanos formam grandes agregados ligados de forma não covalente ao ácido hialurônico e proteína de ligação (*link protein*) (CARNEY & MUIR, 1988; HEINEGARD, 2009). Suas funções compreendem: regulação da atividade de moléculas sinalizadoras; controle do tráfego de células e moléculas; co-receptores; interação com proteínas fibrosas da matriz; proliferação celular; seletividade da membrana basal; adesão e migração celular (SOUZA & PINHAL, 2011). Proteoglicanos como agrecano, decorina, biglican, perlecan, versican são encontrados na cartilagem articular, em maior ou menor concentração.

Considerado como o principal proteoglicano da cartilagem articular, o agregano é formado por uma proteína nuclear ou axial com duas regiões globulares próximas da região amino-terminal (G1 e G2) (SAAMANEN, 1989). G1, o maior dos complexos globulares, liga-se especificamente ao ácido hialurônico e proteína de ligação, conforme visto na figura 3. Entre as regiões G2 e G3 (terceiro domínio globular localizado na região carbóxi-terminal), há uma região extensa de ligação aos GAGs (WATANABE et al., 1998). Entretanto, a estrutura do agregano pode variar em decorrência de alterações do comprimento, posição de sulfatação e substituição das cadeias de GAGs com a idade (LOESER,2009).

**Figura 3 - Estrutura do proteoglicano**



Fonte:FELICE et al.,1985.

### 1.1.3. Glicosaminoglicanos (GAGs)

Glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos lineares, não-ramificados, constituídos de unidades dissacarídicas que se repetem, formadas por um açúcar aminado (N-acetil-glicosamina ou N-acetil-galactosamina) e ácido urônico (ácido glicurônico ou idurônico). Todavia, Keratan-sulfato e heparina apresentam uma galactose no lugar do ácido urônico e glicosamina na posição do açúcar aminado respectivamente (Tabela 1). Eles se classificam de acordo com a composição monomérica, tipo de ligações glicosídicas e grau e

posição da sulfatação. Os GAGs que compõem a grande maioria dos proteoglicanos são: condroitin-sulfato, dermatan-sulfato, heparan-sulfato, queratan-sulfato, heparina e ácido hialurônico (TAYLOR & GALLO, 2006).

O condroitin-sulfato (CS) é o GAG presente em maior quantidade na cartilagem articular. A sulfatação da N-acetil-galactosamina na posição C-4 ou C-6 origina o condroitin-4-sulfato (C4S) ou condroitin-6-sulfato (C6S), respectivamente (SAAMANEN, 1989). Ambos são componentes do agrecano, contribuindo para a eletronegatividade desse proteoglicano e consequente retenção de líquido no tecido. Estudo de Bayliss et al (1999) mostrou alteração da proporção de C4S e C6S com a idade.

## 1.2. Idade

A idade é um dos principais responsáveis pela alteração da matriz cartilaginosa. A espessura da cartilagem do joelho diminui com a idade, demonstrando uma perda gradual da matriz (HUDELMAIER et al.,2001).A presença dos condrócitos senescentes com o envelhecimento articular é um componente importante (SHANE ANDERSON & LOESER,2010),posto que os condrócitos são responsáveis pela síntese dos componentes da MEC.A formação dos produtos finais da glicação avançada (Advanced glycation end-products (AGEs)), produzidos pela glicação de proteínas diante da redução de açúcares (glicose, frutose e ribose), também colabora para a alteração da matriz (VERZIIL et al., 2003). O acúmulo de AGE parece contribuir para o desenvolvimento de osteoartrite (OA) (DEGROOT et al., 2004; VERZIIL et al., 2003), alteração das propriedades biomecânicas (CHEN et al., 2002), aumento da suscetibilidade à fadiga (BANK et al., 1998) e diminuição da atividade anabólica da cartilagem.

O processo de envelhecimento da matriz cartilaginosa promove ainda alterações do tamanho, estrutura, sulfatação e síntese do agrecano (BUCKWALTER, 1994; WELLS et al.,2003;VERBRUGGEN et al.,2000), comprometendo a hidratação da cartilagem (WELLS et al.,2003). Com a idade, há aumento na clivagem do colágeno (HOLLANDER et al., 1995; MOURITZEN et al., 2003), calcificação da matriz (WILKINS et al., 1983;ROSEN et al., 1997) e diminuição da ação de fatores de crescimento (BLANEY et al., 2005; CHUBINSKAYA et al., 2002;FORTIER et al.,2011). Ainda, a capacidade de adaptação da cartilagem ao estresse diminui com o processo de envelhecimento, o que pode ser observado em pacientes idosos com artropatias inflamatórias apresentando degradação rápida da cartilagem (BUKHARI et al., 2007).

Tabela 1- Características estruturais dos principais glicosaminoglicanos.

Glicosaminoglicano	Massa molar média (g/mol) <sup>1</sup>	Monossacarídeo	Posição do sulfato	Ligação
Condroitin-4-sulfato	2-5x10 <sup>4</sup>	N-acetil-galactosamina	4	β(1-4)
		ácido glicurônico	-	β(1-3)
Dermatan-sulfato	2-5x10 <sup>4</sup>	N-acetil-galactosamina	4	β(1-4)
		Ácido idurônico	-	β(1-3)
		ácido glicurônico	-	β(1-3)
Condroitin-6-sulfato	2-7x10 <sup>4</sup>	N-acetil-galactosamina	6	β(1-4)
		ácido glicurônico	-	β(1-3)
Ácido hialurônico	5x10 <sup>5</sup> -5x10 <sup>7</sup>	N-acetil-glicosamina	-	β(1-4)
		ácido glicurônico	-	β(1-3)
Keratan-sulfato	1-3x10 <sup>4</sup>	N-acetil-glicosamina	6	β(1-3)
		Galactose	-/6	β(1-4)
Heparan-sulfato	1-6x10 <sup>4</sup>	Glicosamina	2/6	α(1-4)
		N-acetil-glicosamina	-/6	α(1-4)
		ácido glicurônico	-	β(1-4)
		ácido idurônico	-	α(1-4)
Heparina	5x10 <sup>3</sup> -5x10 <sup>4</sup>	Glicosamina	2/6	α(1-4)
		ácido glicurônico	-	β(1-4)
		ácido idurônico	2	α(1-4)

Fonte: JERÔNIMO, 1994.<sup>1</sup> A massa molar média varia neste intervalo, segundo a fonte dos glicosaminoglicanos

### 1.3. Osteoartrite (OA)

A osteoartrite (OA) é uma doença articular crônica degenerativa que acomete a população idosa, embora seja geralmente associada à degradação da cartilagem, afeta toda a articulação (LOUGHLIN, 2005; SHANE ANDERSON & LOESER, 2010). A doença é promovida por fatores mecânicos e biológicos que desequilibram os processos de síntese e degradação na cartilagem e osso subcondral. Considerada como uma doença multifatorial, a OA acomete a cartilagem articular, membrana sinovial, osso subcondral, ligamentos, cápsula e músculos periarticulares (GHOSH & CHERAS, 2001; KEUTTNER & GOLDBERG, 1995).

A OA apresenta alterações morfológicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas nas células e matriz extracelular (MEC) que levam à fibrilação, ulceração, perda da cartilagem articular e esclerose e exposição do osso subcondral (POOLE, 1999; MARTIN et al., 1997). A degradação do colágeno, particularmente o do tipo II, resulta na fibrilação irreversível, hipertrofia, aumento da hidratação e enfraquecimento das fibras de colágeno. A quantidade de agregano e o teor de ácido hialurônico diminuem progressivamente com a gravidade da doença. A participação de metaloproteinases que degradam a matriz extracelular é um evento importante no desenvolvimento dessas alterações.

Em determinado estágio da OA, admite-se que os condrócitos se tornam incapazes de compensar a perda de proteoglicanos, mesmo com a sua síntese aumentada. A produção e degradação dos proteoglicanos variam em diferentes regiões da cartilagem como resultado da diferença do estresse mecânico a que ela é submetida. Como tentativa de reparação, o condrócito sintetizaria agregano, cuja composição se assemelha à da cartilagem jovem (CS-SZABO et al., 1995). Nas fases iniciais da OA, matriz metaloproteinases (MMPs) são expressas predominantemente nas zonas de transição e profunda da cartilagem, ao passo que agreganases são expressas na zona superficial da cartilagem (CHAMBERS et al., 2001; FERNANDES et al., 1998).

A clivagem do agregano por MMPs e agreganases promove a liberação dos GAGs, levando à perda da função (STRUGLICS et al., 2006). A degradação do agregano pode ainda ser mediada pelas metaloproteinases Disintegrin and Metalloproteinase With Thrombospondin Motif (ADAMTS), particularmente pelas ADAMTS-4 e ADAMTS-5 (LITTLE et al., 2002; SANDY & VERSCHAREN, 2001).

## 2. JUSTIFICATIVA

A osteoartrite (OA) é uma doença articular caracterizada pela inflamação sinovial, degradação progressiva da cartilagem articular e esclerose do osso subcondral, levando à dor crônica e comprometimento funcional das articulações afetadas. O fato da OA acometer principalmente a população a partir dos 45 anos de idade, associado ao processo de envelhecimento populacional e à inexistência de um fármaco que altere definitivamente o curso da doença evidenciam a necessidade de se compreender sua fisiopatologia para se buscar melhores terapias.

O processo de avaliação do dano à cartilagem articular é passível de ser estudado, em parte pela quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs) presentes nesse tecido. Originalmente descrito por Ramos et al. (2001), a técnica consiste na purificação dos GAGs após proteólise enzimática. Atualmente, o nosso grupo de pesquisa utiliza um produto chamado PROLAV 750<sup>R</sup>, um complexo proteolítico que tem nos permitido degradar a porção protéica da matriz da cartilagem articular com um bom rendimento. Considerado como um método fácil, objetivo e reprodutível, fornece material para a identificação dos GAGs e avaliação da sua mobilidade (massa molar).

Utilizando-se essa técnica, o grupo mostrou aumento de GAGs e alteração da sua massa molar aos 70 dias de transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) em ratos (SILVA et al., 2009), considerado um modelo de osteoartrite (OA). Nesse modelo de OA, o perfil de alteração é semelhante ao encontrado em seres humanos, incluindo perda de proteoglicanos, aumento da atividade da colagenase (STOOP et al., 2001) e grave dano à cartilagem com formação de osteófitos (AMEYE & YOUNG, 2006).

Baseado nos estudos do nosso grupo relacionados à quantificação, identificação e avaliação qualitativa de GAGs em modelo de TLCA, associado à necessidade de caracterização quantitativa e qualitativa dos GAGs da cartilagem humana acometida por OA, haja vista a possibilidade da descoberta de um biomarcador para a doença (Attur et al., 2013). Decidiu-se estudar os GAGs da cartilagem humana, sob os aspectos quantitativos e qualitativos, demonstrados previamente nos ratos (Silva et al., 2009).

### **3 Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar as alterações quantitativas e qualitativas dos glicosaminoglicanos provenientes da cartilagem articular humana e de ratos acometidos ou não por osteoartrite (OA).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Investigar a eficiência da proteólise (Rendimento: % de massa degradada) da cartilagem articular humana e de rato ao complexo enzimático PROLAV 750<sup>R</sup>;
- Quantificar e comparar os GAGs da cartilagem articular de ratos submetidos ou não à transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA);
- Quantificar e comparar os GAGs da cartilagem articular humana normal ou acometida por OA.
- Avaliar o perfil de mobilidade de GAGs da cartilagem articular humana normal ou acometida por OA.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta do material biológico humano

Foram incluídos neste estudo pacientes internados a serem submetidos ao procedimento de artroplastia, que consiste na substituição do membro por uma prótese. A inclusão no estudo se baseou na presença de osteoartrite (OA) grave ou sem a doença (Controle) no membro que seria submetido à artroplastia, independente da idade, sexo ou área acometida. Vale salientar que a indicação do procedimento não sofreu nenhuma interferência de nenhum dos membros do protocolo, fazendo-se a coleta após tomar-se ciência da marcação da cirurgia, com prévia assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo paciente ou seu representante legal, conforme as Boas Práticas Clínicas. O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC, sob o número (090.12.08). A coleta de dados abordou aspectos como: presença ou não de OA, idade, região anatômica, comorbidades e uso de medicamentos. Entretanto, apenas a idade e diagnóstico ou não da doença foram abordados aqui. As amostras foram recolhidas após a assinatura do TCLE. Foram coletadas amostras de 30 pacientes, sendo 16 de pacientes com fratura e 14 de OA (Tabela 2). As amostras foram obtidas de quadril, ombro e joelho (Tabela 3). A faixa etária dos pacientes envolvidos na pesquisa variou entre 25 e 92 anos.

**Tabela 2 - Número de pessoas por grupo, sexo e faixa etária.**

Grupo	Sexo	Faixa etária		
		<60	60-79	≥80
Osteoartrite	Masculino	1	2	1
	Feminino	2	6	2
Controle	Masculino	4	1	2
	Feminino	1	4	4

Fonte: o próprio autor.

**Tabela 3. Número de pessoas por grupo, sexo, membro e faixa etária.**

Grupo	Sexo	Área	Faixa etária		
			<60	60-79	≥80
<b>Osteoartrite</b>	Masculino	Quadril	1	2	1
	Feminino	Ombro		1	1
		Joelho		2	
		Quadril		2	
<b>Controle</b>	Masculino	Ombro	2	1	1
		Quadril	2		
	Feminino	Ombro		1	2
		Quadril	1	3	2

Fonte: o próprio autor.

#### **4.2. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos (150-180g) fornecidos pelo Biotério Central da UFC. Os animais foram submetidos à temperatura adequada (22-25°C), com 12h de ciclo claro/escuro e livre acesso à água e ração. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com todos os esforços feitos para minimizar o sofrimento dos animais. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEPA da UFC. Os animais utilizados no experimento estão compilados na tabela 4.

**Tabela 4 - Número de animais por grupo e experimento.**

Números de Animais	Grupo		
	Naive*	Sham*	OA*
Rendimento ou eficiência da proteólise * (% de massa degradada)	6	7	6
Avaliação da quantidade de condroitin-sulfato (CS)*	7	4	7

Fonte: o próprio autor.\* Ratos Wistar machos com pesos (180-200 g) e idades (51-55 dias) provenientes do biotério central da Universidade Federal do Ceará foram utilizados durante os experimentos. *Naive*: sem intervenção cirúrgica. *Sham*: sem excisão do ligamento cruzado anterior. *OA*: com excisão do ligamento cruzado anterior.

#### **4.3. A indução da osteoartrite (OA) por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) em ratos**

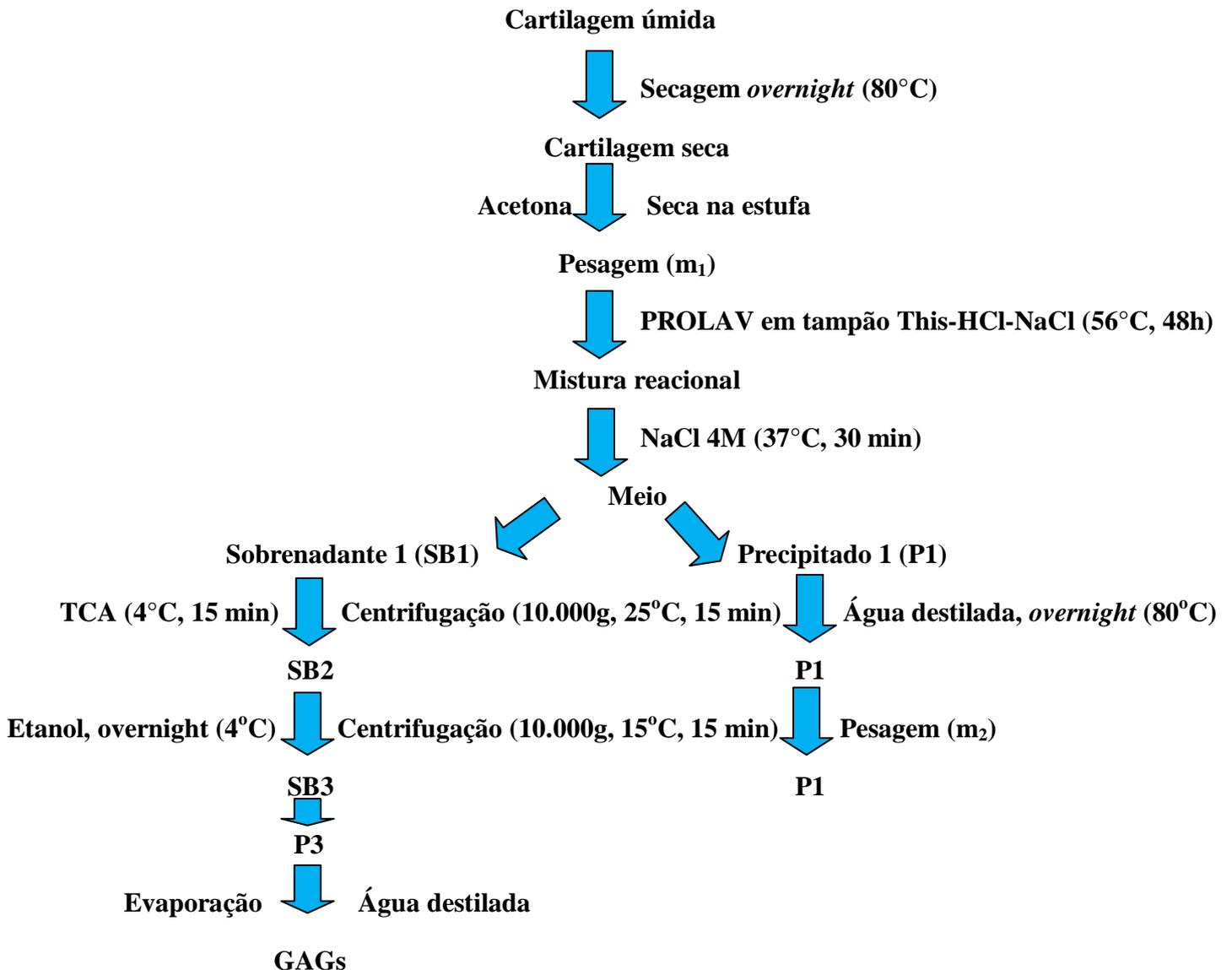
Após anestesia (hidrato de cloral – 400 mg/kg; i.p), ratos foram submetidos à depilação do joelho direito e assepsia local. Uma incisão parapatelar foi feita, seguida pelo deslocamento lateral da patela, permitindo acesso ao espaço articular. O ligamento cruzado anterior (LCA) foi visualizado e cirurgicamente excisado. O aumento do deslocamento anterior da tíbia em relação ao fêmur foi usado como forma de se confirmar a transecção do ligamento. O grupo *sham* foi submetido ao procedimento cirúrgico, sem excisão do LCA. Os animais foram sacrificados após 70 dias da transecção (CASTRO et al., 2006). O grupo *naive* não foi submetido a qualquer intervenção cirúrgica.

#### **4.4. Extração de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular humana e de ratos**

A cartilagem foi removida cirurgicamente das articulações, devidamente pesada (massa inicial -  $m_1$ ), após secagem *overnight* a 80°C, e homogeneizada em acetona. A acetona retira os lipídios presentes na matriz. Em seguida, uma suspensão da enzima PROLAV 750<sup>R</sup> em tampão Tris-HCl/NaCl (4 mg enzima/mL tampão) foi adicionada ao pó cetônico e o material foi digerido em banho-maria (56°C) por 48 horas. A mistura reacional obtida foi retirada do banho e teve a concentração de NaCl corrigida com NaCl 4M. A saturação do meio com NaCl promove a sedimentação das substâncias que possuem baixa solubilidade. O meio foi transferido para um banho-maria (37°C) por 30 minutos. O sobrenadante (SB1) foi coletado e o precipitado (P1) submetido à lavagem com água destilada e colocado na estufa *overnight* a

80°C para evaporação da água. Após evaporação, o material foi pesado para a obtenção da massa final ( $m_2$ ). O ácido tricloroacético (concentração final de 10% w/v) é usado para a precipitação de macromoléculas tais como: proteínas, DNA e RNA, e foi adicionado ao sobrenadante (SB1), agitado a 4°C por 15 minutos e centrifugado (10.000 g, 15 min, 25°C). O sobrenadante (SB2) foi coletado e descartado o precipitado (P2). Em seguida, foi adicionado etanol para precipitar os GAGs do sobrenadante (SB2) e a solução foi mantida *overnight* a 4°C, sendo novamente centrifugada (10.000 g, 15 min, 15°C). O sobrenadante (SB3) foi descartado. O precipitado (P3), contendo os GAGs, foi colocado em fluxo para total evaporação do etanol. Após esse processo, o P3 foi dissolvido em água destilada (Figura 4).

**Figura 4 – Esquema do protocolo de extração de glicosaminoglicanos da cartilagem articular.**



#### **4.5. Determinação do rendimento da degradação da cartilagem articular humana e de ratos**

A quantidade de cartilagem degradada ( $\Delta m$ ) foi obtido pela diferença entre a massa inicial ( $m_1$ ) e final ( $m_2$ ), em mg, da cartilagem articular. O rendimento ou eficiência da proteólise (EP) foi obtido conforme descrito abaixo:

$$\Delta m = m_1 - m_2 \quad (1)$$

$$EP (\%) = \Delta m \times 100 / m_1 \quad (2)$$

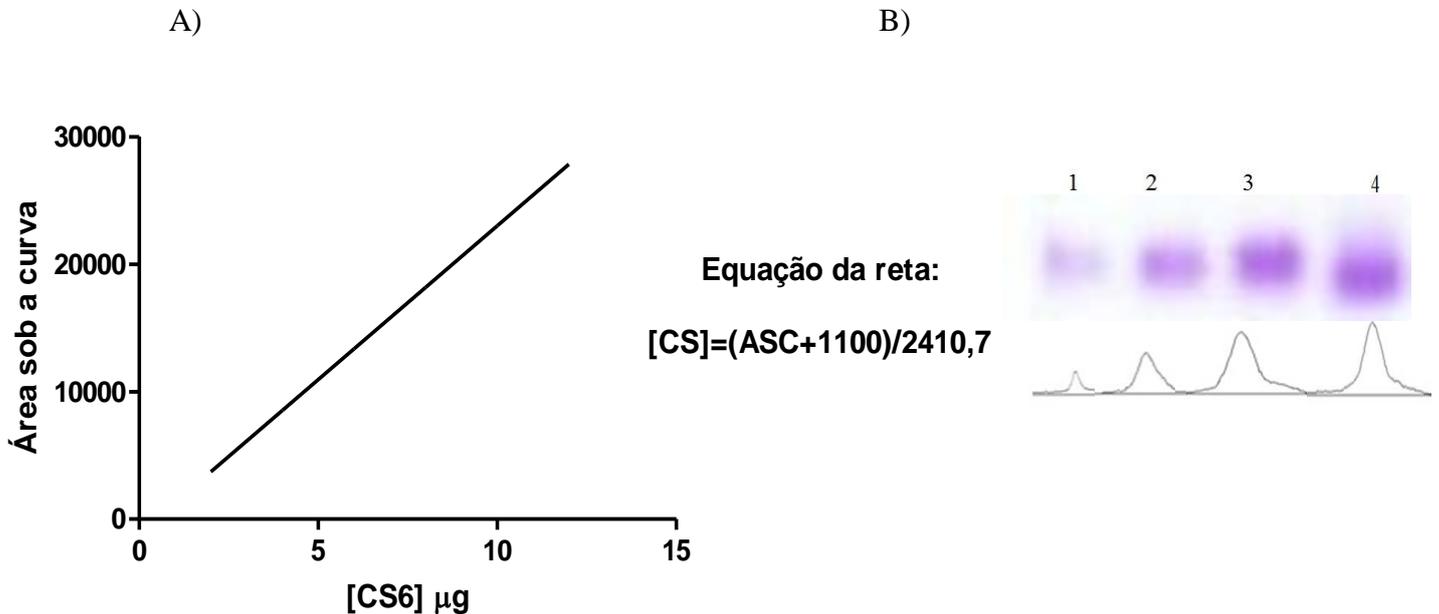
#### **4.6. Identificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular humana por eletroforese em gel de agarose**

Um volume de 5  $\mu$ L de padrões de condroitin-sulfato (CS) e heparan-sulfato (HS) na concentração (2  $\mu$ g GAG/ $\mu$ L de cresol 0,5% diluído em sacarose 50%) e amostras de GAGs dos pacientes foram aplicadas no gel de agarose (0,6%), após o que foi iniciada a eletroforese (100V, 1h) em tampão de diamino-propano (pH = 9). Em seguida, o gel foi submergido em solução de CTV (0,1%), por 24h. Após fixação, o gel foi devidamente secado e corado com azul de toluidina (0,1%), por 15min. Ao final do processo, o excesso de corante foi removido pela sua submersão em solução descorante. Após esse processo, as bandas eletroforéticas das amostras foram comparadas às dos padrões.

#### **4.7. Quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular humana e de ratos por eletroforese em gel de agarose**

O C6S nas respectivas concentrações (2, 4, 6, 8, 10 e 12  $\mu$ g em 5  $\mu$ L) foi utilizado para a obtenção da equação da reta e consequente quantificação dos GAGs. As amostras de GAGs dos pacientes foram obtidas de uma solução contendo 8  $\mu$ L da amostra e 2  $\mu$ L cresol 0,5% (diluído em sacarose 50%). Dessa solução, 5  $\mu$ L foram aplicados em gel de agarose (0,6%) e, em seguida, foi iniciada a eletroforese (100V, 1h) em tampão de diamino-propano (pH = 9). Em seguida, o gel foi submergido em solução de CTV (0,1%), por 24h. Após fixação, o gel foi devidamente secado e corado com azul de toluidina (0,1%), por 15min. Ao final do processo, o excesso de corante foi removido pela sua submersão em solução descorante (ácido acético (1% v/v) e etanol (50% v/v)). Após esse processo, o gel foi escaneado e as bandas eletroforéticas do padrão e amostras foram analisadas, através do software Image J (versão 1.37) disponibilizado gratuitamente pelo U.S. National Institutes of Health (Rasband, 2006), para a determinação da intensidade luminosa e cálculo da densidade ótica (D.O) relativa. Para

amostras diluídas, a concentração obtida pela densidade ótica foi multiplicada pelo fator de diluição correspondente. Os dados obtidos foram expressos em  $\mu\text{g}$  de GAG/mg de cartilagem seca.



**Figura 5- Quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular em gel de agarose (0,6%).** (A) Cálculo da área sob a curva para obtenção da equação da reta de C6S gerada pelo programa Image J.1- C6S (2  $\mu\text{g}$ ); 2- C6S (4  $\mu\text{g}$ ); 3- C6S (6  $\mu\text{g}$ ); 4 – C6S (8  $\mu\text{g}$ ). (B) Padrões de condroitin-sulfato (C6S) em gel de agarose. (Coloração por azul de toluidina).

#### 4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Procedeu-se à eletroforese em gel de poliacrilamida para avaliação indireta da massa molar dos GAG extraídos da cartilagem femoral. 10  $\mu\text{g}$  de GAG foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% w/v, e submetidos à eletroforese vertical (100 V), em tampão barbital, por 1 h. Os GAG no gel foram corados por azul de toluidina durante 15 min. O excesso de corante foi removido por imersão em ácido acético a 1% v/v por 3 horas. Para proceder à secagem, o gel foi imerso em solução de glicerol 5% v/v por 30 min, e colocado entre duas folhas úmidas de celofane, sob tensão, por 48 h. Os filmes obtidos a partir dos géis foram digitalizados e analisados pelo software ImageJ 1.37v, disponibilizado gratuitamente pelo U. S. National Institutes of Health (RASBAND, 2006). Para cada banda do gel de agarose, determinou-se a densidade ótica (DO) relativa (Figura 6A). Para avaliação da migração do GAG em gel de

poliacrilamida, determinou-se a mobilidade eletroforética relativa ao condroitin-4-sulfato (C4S) (DIETRICH & DIETRICH, 1976), o padrão de menor massa molar ponderal utilizado ( $4,55 \times 10^4$  g/mol) (Figura 6B):

$$\text{Mobilidade relativa} = \frac{\text{posição do pico da banda}}{\text{Posição do pico de C4S}}$$

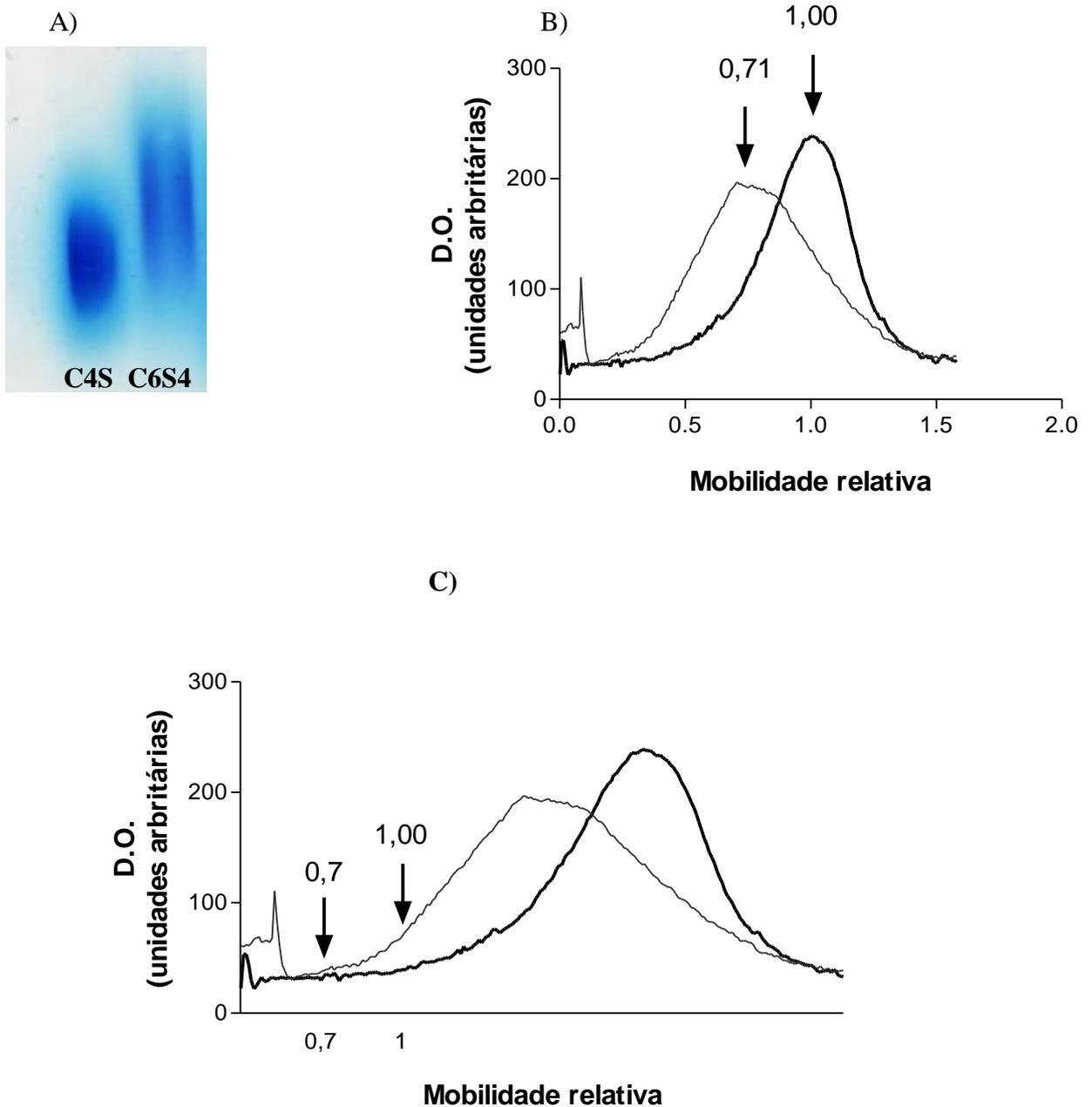
Outra forma para avaliar a mobilidade é a análise do gráfico pela origem das curvas. Esse método é aplicado quando a diferença entre amostras não está no pico da curva, mas na região do vale (Figura 6C). Neste caso, seguimos a equação abaixo:

$$\text{Mobilidade relativa} = \frac{\text{posição de início da banda}}{\text{Posição de início de C4S}}$$

Obs:quanto menor o valor da mobilidade relativa maior é a massa molar.

#### **4.9. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Para comparações múltiplas entre médias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Para comparações entre duas médias, foi utilizado o teste “t” de Student ( $P < 0,05$ ). O programa utilizado foi o GraphPad versão 5.0.

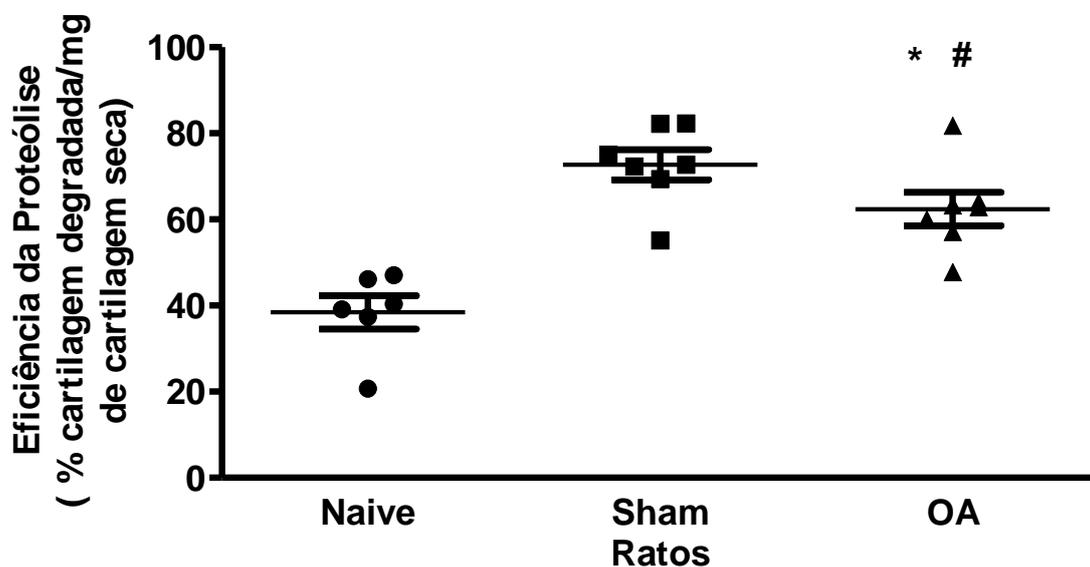


**Figura 6: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (6% w/v) de condroitin-4-sulfato (C4S) e condroitin-6-sulfato (C6S).** (A) 10  $\mu\text{g}$  de cada GAG foram submetidos à eletroforese (100V) em tampão barbital 60mM (pH 8,60). (B) Análise de pico. (C) Análise da origem. Distribuições obtidas pela leitura das bandas no software ImageJ 1.37 v. As massas molares ponderais de C4S (negrito) e C6S são  $4,55 \times 10^4$  g/mol e  $5,88 \times 10^4$  g/mol, respectivamente. As setas indicam a mobilidade relativa de cada GAG.

## 5. Resultados

### 5.1. A eficiência da proteólise (rendimento) da cartilagem articular de ratos à degradação pelo complexo enzimático PROLAV

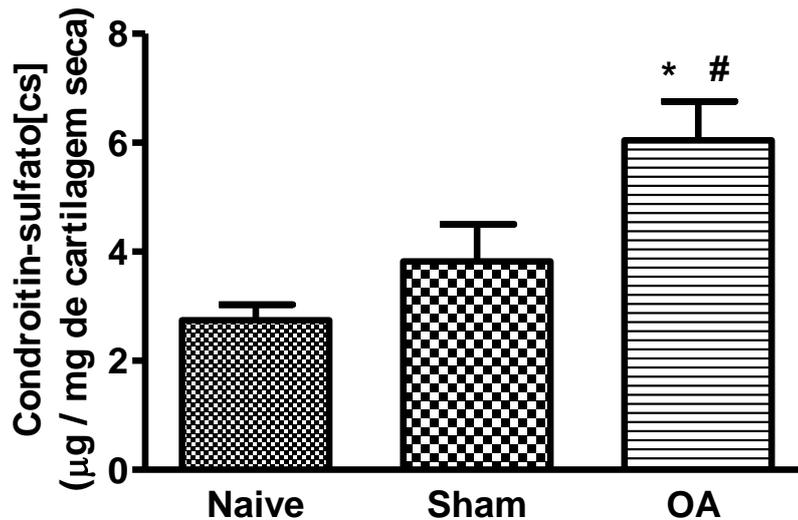
A indução da osteoartrite por Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA) nesses animais mostrou uma diminuição significativa da eficiência da proteólise após 70 dias da transecção ( $P < 0,05$ ) (Figura 7).



**Figura 7 – A eficiência da proteólise (rendimento) após 70 dias de experimento.** Ratos foram submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA), sendo sacrificados após 70 dias. Grupo *sham* representa os animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem excisão do LCA. Grupo *naive* representa os animais que não foram submetidos à qualquer procedimento cirúrgico. O percentual da massa degradada foi obtido pela diferença entre a massa inicial ( $m_1$ ) e final ( $m_2$ ), em mg, da cartilagem articular degradada. Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. do % da massa degradada em mg de cartilagem degradada. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo *naive* DO; # $P < 0,05$  comparado ao grupo *sham* D70 (ANOVA seguida de teste de Tukey).

## 5.2. Quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular de ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA)

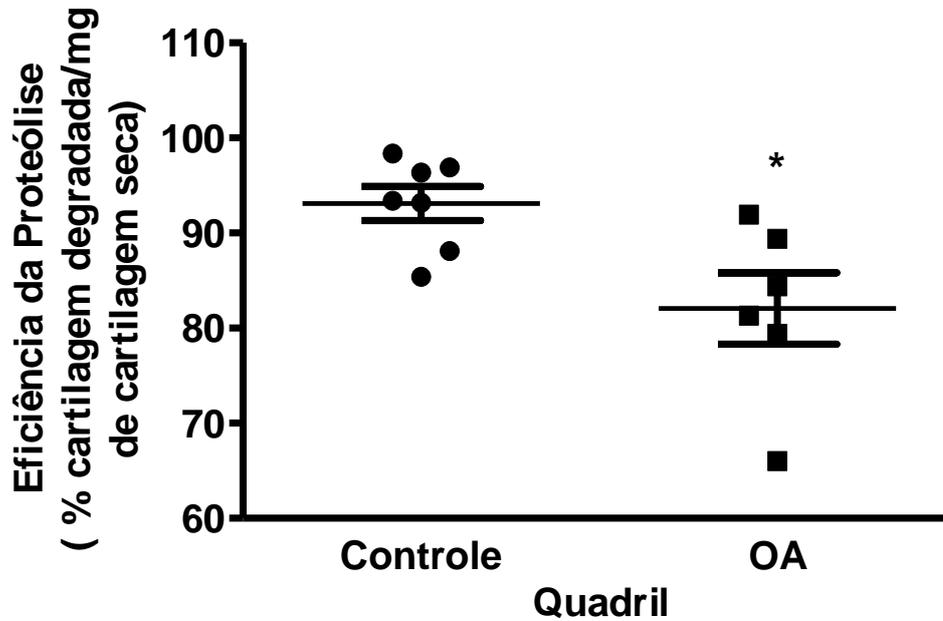
A indução da osteoartrite aumentou significativamente a quantidade de GAGs da cartilagem quando comparada a dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico sem a transecção (grupo *sham*) ( $P < 0,05$ ) (Figura 8).



**Figura 8 – Cinética da quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular de ratos submetidos ou/não à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA).** Ratos foram submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA), sendo sacrificados após 70 dias. A quantidade de glicosaminoglicanos (GAGs) foi obtida da cartilagem articular do joelho direito. Grupo *sham* representa os animais que foram submetidos ao procedimento cirúrgico sem excisão do LCA. Grupo *naive* representa os animais que não foram submetidos a qualquer procedimento cirúrgico. Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. da quantidade de condroitin-sulfato em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de cartilagem seca. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo *naive*; # $P < 0,05$  comparada ao grupo *sham*. (ANOVA seguida de teste de Tukey).

### 5.3. A eficiência da proteólise (rendimento) da cartilagem articular do quadril de seres humanos à degradação pelo complexo enzimático PROLAV

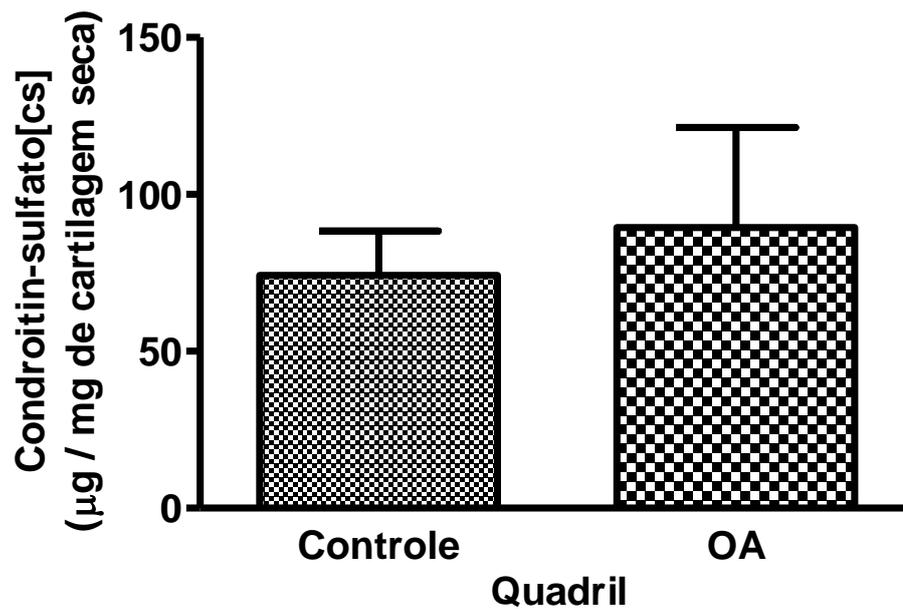
A percentagem de massa degradada diminuiu de forma significativa em pacientes com OA de quadril pela PROLAV, quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Figura 9).



**Figura 9 - Avaliação da eficiência da proteólise da cartilagem articular do quadril.** Os pacientes submetidos à artroplastia por OA de quadril ou fratura foram divididos em grupos. O percentual da massa degradada foi obtido pela diferença entre a massa inicial ( $m_1$ ) e final ( $m_2$ ), em mg, da cartilagem articular degradada. Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. do % da massa degradada em mg de cartilagem degradada. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle (Student's "t" test).

#### 5.4. Quantificação dos GAGs extraídos da cartilagem articular do quadril após eletroforese em gel de agarose

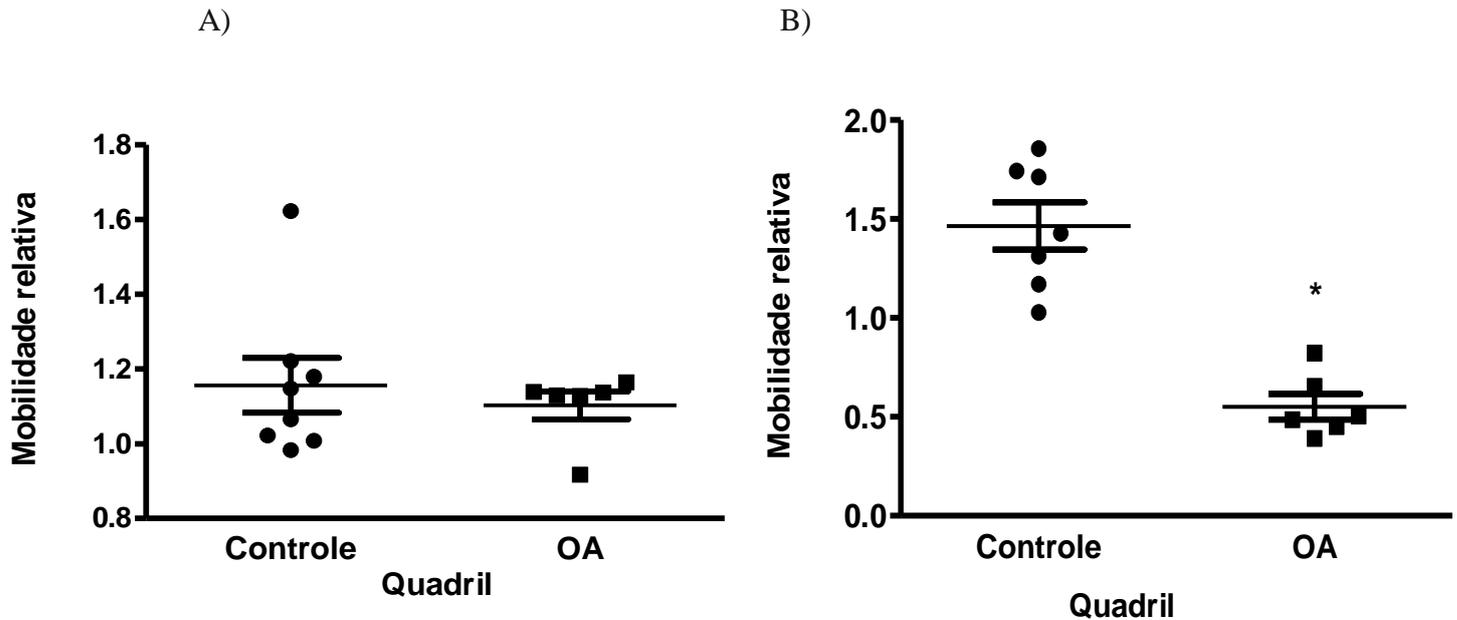
A quantidade de GAGs na cartilagem não altera de forma significativa em pacientes com OA de quadril, quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Figura 10).



**Figura 10 - Avaliação da quantidade do CS extraído da cartilagem articular do quadril.** Os pacientes submetidos à artroplastia por OA de quadril ou fratura foram divididos em grupos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. da quantidade de condroitin-sulfato em  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de cartilagem seca.

### 5.5 Avaliação da massa molar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa do quadril

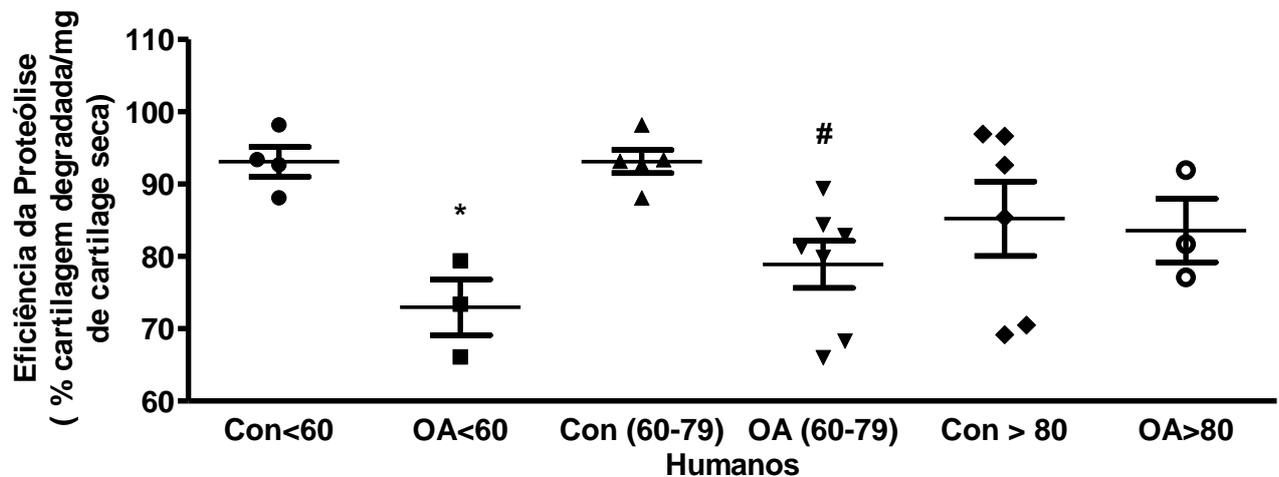
A figura 11B mostra que a mobilidade relativa do CS de seres humanos com osteoartrite de quadril foi significativamente menor, quando comparada com o grupo de controle (\* $P < 0,05$ ). Esse fato não ocorreu quando analisamos pelo pico (Figura 11A).



**Figura 11 – Mobilidade relativa dos glicosaminoglicanos (GAGs) extraídos da cartilagem articular do quadril, na presença ou não de osteoartrite (OA), em gel de poliacrilamida.** Pacientes foram submetidos à artroplastia do quadril por OA ou fratura. Glicosaminoglicanos (GAGs) da cartilagem articular desses pacientes foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (6%). Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. da migração de GAGs (Teste t de Student). (A) Os valores representam a relação entre o pico das curvas de imagens digitalizadas a partir de géis de poliacrilamida. (B) Os valores representam a relação entre a posição de início das curvas de imagens digitalizadas a partir de géis de poliacrilamida. O C4S arbitrariamente fixados em 1.0. Como comparação o C6S, sob as mesmas condições, apresenta uma mobilidade relativa de 0,708. \* $P < 0,05$  comparado com o grupo de controle (Student teste "t").

### 5.6 Avaliação da eficiência da proteólise da cartilagem articular em pacientes submetidos à artroplastia

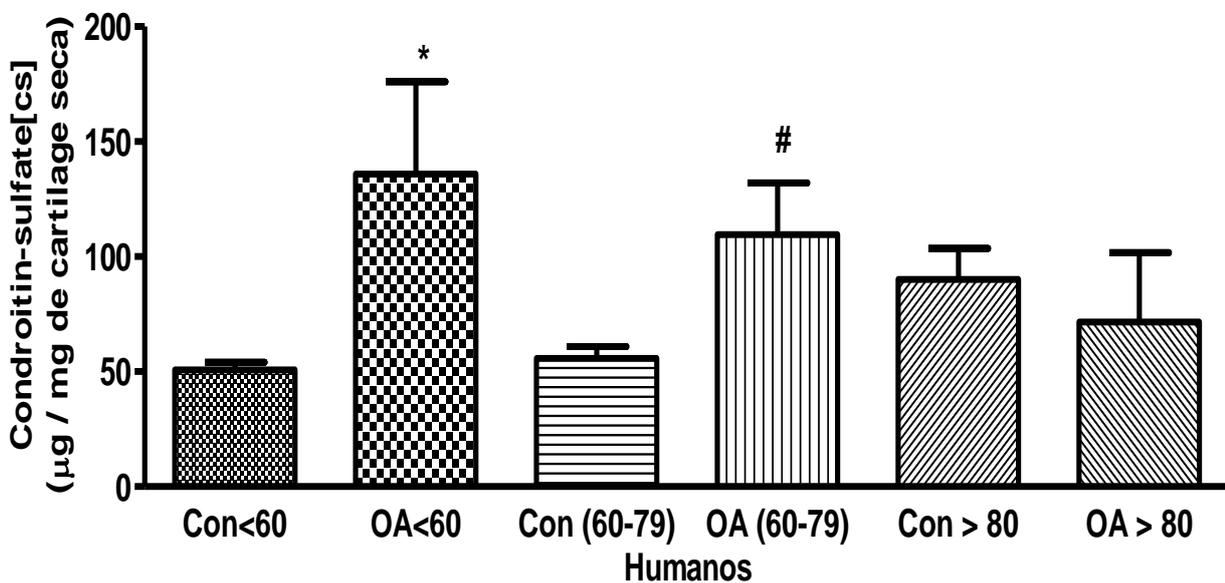
A presença de cartilagem osteoartrite reduziu significativamente a eficiência da degradação proteolítica da matriz, quando comparada com o grupo controle abaixo de 80 anos na mesma faixa etária (\* $P > 0,05$ ) (#  $P > 0,05$ ).



**Figura 12 -Avaliação da eficiência da proteólise da cartilagem articular por faixa etária e independente da área em pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.** Os pacientes submetidos à artroplastia por OA ou fratura foram divididos em grupos por faixa etária. Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. do % da massa degradada em mg de cartilagem degradada. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle menor que 60 anos; # $P < 0,05$  comparada ao grupo controle com idade entre 60 e 79 anos; OA  $\geq 80$  maior ou igual a 80 anos. (ANOVA seguida de teste de Tukey).

### 5.7 Quantificação do CS extraído da cartilagem articular em pacientes submetidos à artroplastia

A figura 13 mostra que as articulações de pacientes com OA mostram um aumento significativo na quantidade de glicosaminoglicanos (GAG), quando comparado com o grupo controle na mesma faixa etária (\*P <0,05) (#P < 0,05). Contudo, o grupo com OA na idade igual ou superior a 80 anos, a quantidade de CS medida por densitometria não revelou diferença se comparado ao grupo controle.



**Figura 13 – Avaliação da quantidade de condroitin-sulfato na cartilagem articular com idade e independente da área em pacientes submetidos à artroplastia.** Os pacientes submetidos à artroplastia por OA ou fratura foram divididos em grupos por faixa etária. Os dados foram expressos como média ± e.p.m. da quantidade de condroitin-sulfato em µg/mg de cartilagem seca. \*P<0,05 comparado ao grupo controle menor que 60 anos; #P<0,05 comparada ao grupo controle com idade entre 60 e 79 anos; OA ≥ 80 maior ou igual a 80 anos. (ANOVA seguida de teste de Tukey).

## 6 Discussão

Os animais submetidos à TLCA mostraram uma redução significativa na eficiência à proteólise quando comparada ao grupo sham. Entretanto, esperávamos uma maior eficiência da proteólise quando comparado ao grupo sham, pois teríamos um importante componente catabólico agindo sobre a matriz cartilaginosa, que seria a osteoartrite. Especulamos que o menor rendimento poderia decorrer de um desequilíbrio inicial da homeostase, ou seja, após 70 dias de experimento o catabolismo já exerce seus efeitos devido ao envelhecimento dos animais. Por outro lado, a cartilagem encontra-se na fase de intenso anabolismo em resposta ao catabolismo exercido pela osteoartrite induzida experimentalmente. O anabolismo consiste em parte na síntese de componentes da matriz, como a síntese de proteoglicanos e consequente aumento de CS em resposta ao estresse mecânico da transecção. A síntese de componentes da matriz e consequente anabolismo é passível de avaliação através da quantificação de GAGs. O resultado obtido da quantificação de GAGs mostrou um aumento significativo aos 70 dias da TLCA, colaborando com o de Silva et al. (2009)

Outro fator que sustenta essa hipótese é o fato de que estudo *in vitro* com explantes de cartilagens mostrou uma degradação inicial do agrecano em relação ao colágeno (PRATTA et al., 2003). Ainda, a perda do agrecano por ação das agrecanases é reversível, mas a degradação do agrecano e colágeno tipo II por matriz metaloproteinasas diminuem a capacidade dos condrócitos repararem o dano (FELL et al., 1976; KARSDAL et al., 2008). Com o exposto acima, sugerimos que a síntese de componentes da matriz reduziria a vulnerabilidade de proteoglicanos ao ataque enzimático e as ações catabólicas (MARTELL-PELLETIER et al., 2008), e consequentemente de outras enzimas que agissem por essa via ou vias comuns de degradação das proteínas, neste aspecto afetando o comportamento das enzimas que compõem a PROLAV<sup>R</sup> no nosso estudo.

Diante do exposto acima, a eficácia da proteólise e a quantidade de CS são alteradas na presença da OA experimental. Como a eficácia da proteólise e a quantificação do CS são passíveis de avaliação também na cartilagem humana. Resolvemos investigá-los nos pacientes com OA.

Para a cartilagem humana, observamos uma redução da eficiência da proteólise nos pacientes acometidos por OA. Esses resultados validam o método de extração dos GAGs e o modelo da TLCA, como um bom método, já que nos experimentos animais foi possível obter uma distinção de rendimento entre a presença ou não de OA.

A redução da eficiência da proteólise nos animais encontra-se associada ao aumento de CS. Nos seres humanos, a redução da eficiência também estava acompanhada do aumento da quantidade de CS. Corroborando com os achados experimentais, observamos uma tendência quando avaliamos apenas o quadril e cancelamos a diferença quando analisamos de acordo com a faixa etária. O aumento do conteúdo de CS da cartilagem articular nos estágios iniciais da OA provavelmente reflete o aumento da síntese de GAGs. Porém, nos estágios avançados da doença, a concentração de GAGs diminui, apesar do aumento da produção pelos condrócitos, refletindo o intenso catabolismo (SILVA et al., 2009). Esses dados revelam que aumento do conteúdo de CS da cartilagem articular nos estágios iniciais da OA é possível e esse comportamento já foi observado em outros experimentos (NELSON et al., 2006; BRAUNSTEIN et al., 1990; LE GRAVERAND et al., 2010; HOSSEININIA et al., 2013). Na literatura, essa capacidade é conhecida como reparo hipertrófico (VIGNON et al., 1983. ADAMS & BRANDT, 1991). Entretanto, após os 80 anos não houve diferença entre as amostras humanas normais e osteoartríticas. Acreditamos que o catabolismo na cartilagem osteoartrítica associado à presença de condrócitos senescentes, que tem como características o declínio da proliferação e resposta anabólica a fatores de crescimento (MARTIN et al., 1997; MESSAI et al., 2000; BOBACZ et al., 2003; CHUBINSKAYA et al., 2002), que estimulam a síntese de proteoglicanos pelos condrócitos, podem ter seu efeito reduzido em condrócitos humanos senescentes justificando a redução na quantidade de GAGs observado após 80 anos. Ademais, estudos com cartilagens humanas e de ratos mostraram declínio no número de células e síntese de agregano com a idade (VIGNON et al., 1976; JALLALI et al., 2005; VERBRUGGEN et al., 2000). Segundo Del Carlo e Loeser (2003), condrócitos senescentes podem contribuir para a redução da densidade celular na matriz cartilaginosa devido ao aumento na morte celular pela produção de espécies reativas de oxigênio com a idade.

Silva et al. (2009) revelaram que o aumento da quantidade de CS nos animais submetidos à OA experimental encontrava-se associado a síntese de GAGs de alta massa molecular e conseqüente menor mobilidade. Levando em consideração que as alterações referidas nos animais com relação à alteração na eficiência da proteólise e quantidade de CS foram reproduzidas também em seres humanos. O próximo passo foi investigar a possibilidade de alterações na massa molar nos pacientes com OA.

O resultado do estudo com cartilagem humana mostrou alteração no padrão de mobilidade dos GAGs em pacientes com osteoartrite. Esse dado demonstra uma diferença

qualitativa entre as cartilagens normais e acometidas por OA. Também, subsidia uma nova linha de pensamento que as alterações ocorridas nos proteoglicanos provenientes da cartilagem osteoartrite vão além da simples mudança na proporção dos GAGs que os compõem (CS-SZABO et al.,1995;MARTEL-PELLETIER et al.,2008).Mas, alterações intrínsecas nos GAGs poderiam estar envolvidas na OA.Diante da caracterização do tipo de alteração estrutural envolvida nos GAGs em OA, permitirá a possibilidade de propor um novo biomarcador para a doença, haja vista que os disponíveis até o presente momento não se baseiam em alterações qualitativas.

Inferimos com o exposto acima que tanto a cartilagem proveniente de pacientes acometidos por OA quanto animais submetidos à OA experimental apresentam alteração na eficiência da proteólise, na quantidade de CS e massa molar.

## 7. Conclusões

A partir dos resultados aqui demonstrados com amostras de cartilagem humana e de ratos, as seguintes conclusões podem ser obtidas:

- A indução do modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) em ratos reduz a eficiência da proteólise na cartilagem;
- A presença de osteoartrite (OA) de seres humanos interfere no rendimento da proteólise da cartilagem articular à degradação;
- A técnica de isolamento pelo complexo enzimático PROLAV 750<sup>R</sup> e quantificação de GAGs em gel de agarose são eficazes para a cartilagem humana;
- A TLCA em ratos promove alteração na quantidade de GAGs após 70 dias de transecção;
- A quantidade de GAGs da cartilagem humana é alterada pela osteoartrite;
- A semelhança dos GAGs da cartilagem de ratos, o padrão de mobilidade dos GAGs provenientes de seres humanos pode ser estudado em gel de poliacrilamida;
- A semelhança dos GAGs da cartilagem de ratos submetidos à osteoartrite experimental, a OA de quadril altera o padrão de migração dos GAGs da cartilagem humana.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS ME, BRANDT KD: Hypertrophic repair of canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *J Rheumatol*, v.18, n.3, p.428–435, 1991.
- AMEYE LG, YOUNG MF. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the “Holy Grail”. *Curr Opin Rheumatol*, n.18, v.5, p.537–547, 2006.
- ATTUR M, KRASNOKUTSKY-SAMUELS S, SAMUELS J, ABRAMSON SB. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. v.1, p.136-144, 2013.
- BANK RA, BAYLISS MT, LAFEVER FP, MAROUDAS A, TEKOPPELE JM. Ageing and zonal variation in post-translational modification of collagen in normal human articular cartilage. The age-related increase in non-enzymatic glycation affects biomechanical properties of cartilage. , v.15, p.15345-51, 1998.
- BAYLISS M.T., OSBORNE D., WOODHOUSE S., DAVIDSON C. Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. *J. Biol. Chem*, v.274 , n.22 ,p.15892–15900, 1999.
- BERNFELD M, GÖTTE M, PARK PW, REIZES O, FITZGERALD ML, LINCECUM J, ZAKO M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* ,v.68,p.729-77,1999
- BEZERRA MM, BRAIN SD, GREENACRE S, JERÔNIMO SM, DE MELO LB, KEEBLE J, DA ROCHA FA. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *Br J Pharmacol*, v.141, n.1, p.172-82, 2004.
- BLANEY DAVIDSON EN, SCHARSTUHL A, VITTERS EL, VAN DER KRAAN PM, VAN DEN BERG WB. Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther*, v.7, n.6, p.1338-47, 2005.
- BOBACZ K, GRUBER R, SOLEIMAN A, ERLACHER L, SMOLEN JS, GRANINGER WB. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis Rheum*, v.48, n.9, p.2501-8, 2008.
- BRANDT KD, BRAUNSTEIN EM, VISCO DM, O'CONNOR B, HECK D, ALBRECHT M. Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *J. Rheum.*, v.18, n.3, p 436-446, 1991
- BRAUNSTEIN EM, BRANDT KD, ALBRECHT M: MRI demonstration of hypertrophic articular cartilage repair in osteoarthritis. *Skeletal Radiol*, v.19, n.5, p.335–339, 1990.
- BUCKWALTER JA, ROUGHLEY PJ, ROSENBERG LC. Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech*, v.28, v.5, p.398-408, 1994.

BUKHARI M, LUNT M, BARTON A, BUNN D, SILMAN A, SYMMONS D. Increasing age at symptom onset is associated with worse radiological damage at presentation in patients with early inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis.*, v.66, n.3, p.389-93,2007.

CARNEY SL, MUIR H. The Structure and Function of Cartilage Proteoglycans. *Physiol Rev*, v.68, n.3 , p.858-910,1988.

CASTRO RR,CUNHA FQ,SILVA FSJ,ROCHA FA. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis:evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.14, n.8 , p.769-776, 2006.

CHAMBERS MG, COX L, CHONG L, SURI N, COVER P, BAYLISS MT, MASON RM. Matrix metalloproteinases and aggrecanases cleave aggrecan in different zones of normal cartilage but colocalize in the development of osteoarthritic lesions in STR/ort mice. *Arthritis Rheum*, v.44, n.6 ,p.1455-65, 2001.

CHEN AC, TEMPLEMM, NG DM, VERZIIL N, DEGROOT J, TEKOPPELE JM, ET AL.Induction of advanced glycation end products and alterations of the tensile properties of articular cartilage. *Arthritis Rheum*, v.46, n.12, p.3212-7, 2002.

CHUBINSKAYA S, KUMAR B, MERRIHEW C, HERETIS K, RUEGER DC, KUETTNER KE. Age-related changes in cartilage endogenous osteogenic protein-1 (OP-1). *Biochim Biophys Acta*, v.1588, n. 2, p.126-34, 2002.

CS-SZABO G, ROUGHLEY PJ, PLAAS AH & GLANT TT. Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Arthritis Rheum*, v.38, n.5, p.660-668,1995.

DEGROOT J, VERZIIL N, WENTING-VAN WIJK MJ, JACOBS KM, VAN EL B, VAN ROERMUND PM, BANK RA, BIJLSMA JW, TEKOPPELE JM, LAFEBER FP. Accumulation of advanced glycation end products as a molecular mechanism for aging as a risk factor in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, v.50, n.4, p.1207-15, 2004

DEL CARLO JR M, LOESER RF. Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: Correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis Rheum*, v.48, n.12, p.3419-30, 2003.

ESPANHA MM. Articular cartilage: structure and histochemical composition.*Acta Reumatol Port*, v.35, n.5, p.424-33, 2010.

EYRE DR, WU, JJ, APON S. Growing family of collagens in articular cartilage: Identification of 5 genetically distinct types. *J Rheumatol*, v.14, p.25-26, 1987.

FELICE JC, CHAHADE WH, CATTAI MC. Osteoartrose (OA). *Rev Bras Med*, v.42, p.372-387, 1985.

FELL HB,BARRATT MEJ,WELLAND H, GREEN R,POOLE AR, The capacity of pig articular cartilage in organ culture to regenerate after breakdown induced by complement-sufficient antiserum to pig erythrocytes, *Calcif. Tissue Res*, v.20, n.1, p.3-21, 1976.

FERNANDES JC, MARTEL-PELLETIER J, LASCAU-COMAN V, MOLDOVAN F, JOVANOVIĆ D, RAYNAULD JP, PELLETIER JP. Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol.*, v.25, n.8, p.1585-94, 1998.

FORTIER LA, BARKER JU, STRAUSS EJ, MCCARREL TM, COLE BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.*, v.469, n.10, p.2706-15, 2011.

GANDHI NS, MANCERA RL. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des.*, v.72, n.6, p.455-82, 2008

GHOSH, P., CHERAS, P.A. Vascular mechanisms in osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 15, n. 5, p. 693-709, 2001.

GOLDRING SR, GOLDRING MB. Biology of the normal joint. In: HARRIS Jr et al. *Kelley's textbook of rheumatology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 2005.

HAYAMI T, PICKARSKI M, ZHUO Y, WESOLOWSKI GA, RODAN GA, DUONG LE T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone.*, v.38, n.2, p.234-43, 2006.

HEINEGÅRD D. Proteoglycans and more – from molecules to biology. *Int J Exp Pathol.*, v.90, n.6, p.575–586, 2009.

HEINEGÅRD D, SAXNE T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.*, v.7, n.1, p.50-6, 2011. Review

HOLLANDER AP, PIDOUX I, REINER A, RORABECK C, BOURNE R, POOLE AR. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* v.96, n.6, p.2859-69, 1995.

HOSSEININIA S, LINDBERG LR, DAHLBERG LE. Cartilage collagen damage in hip osteoarthritis similar to that seen in knee osteoarthritis; a case-control study of relationship between collagen, glycosaminoglycan and cartilage swelling. *BMC Musculoskeletal Disorders*, v.14, n.18, p.1-7, 2013.

HUDELMAIER M, GLASER C, HOHE J, ENGLMEIER KH, REISER M, PUTZ R, ECKSTEIN F. Age-related changes in the morphology and deformational behavior of knee joint cartilage. *Arthritis Rheum.*, v.44, n.11, p.2556-61, 2001.

JALLALI N, RIDHA H, THRASIVOULOU C, UNDERWOOD C, BUTLER PE, COWEN T. Vulnerability to ROS-induced cell death in ageing articular cartilage: the role of antioxidant enzyme activity. *Osteoarthritis Cartilage*, v.13, n.7, p.614-22, 2005.

JERÔNIMO SMB, Alterações no conteúdo e na estrutura dos glicosaminoglicanos urinários ácidos em tecidos e na urina de pacientes portadores de neoplasias. 1994. 120f. Tese

(Doutorado em ciências)-Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal do Rio Grande do Norte,Natal,1994.

JUNQUEIRA & JOSE CARNEIRO.Histologia básica.Guanabara Koogan.11° Ed.São Paulo, 2008.

KARSDAL MA,MADSEN SH,CHRISTIANSEN C, HENRIKSEN K, FOSANG AJ, SONDERGAARD BC, Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity, *Arthritis Res. Ther.*, v.10, n.3, R63, 2008.

KEUTTNER K, GOLDBERG V M.(ed.) (1995). *Osteoarthritic Disorders*. Rosemont: American Academy of Orthopedic Surgeons.

LE GRAVERAND MP, BUCK RJ, WYMAN BT, VIGNON E, MAZZUCA SA, BRANDT KD, PIPERNO M, CHARLES HC, HUDELMAIER M, HUNTER DJ, ET AL: Change in regional cartilage morphology and joint space width in osteoarthritis participants versus healthy controls: a multicentre study using 3.0 Tesla MRI and Lyon-Schuss radiography. *Ann Rheum Dis*, v.69, n.1, p.155–162, 2010.

LI.G.,SUGGS,J,GILL,T.The effect of anterior cruciate ligament injury on knee joint function under a simulated muscle load;a three-dimensional computational simulation.*Ann.Biomed.Eng.*,v.30, n.5, p.713-720, 2002.

LITTLE CB,HUGHES CE,CURTIS CL,JANUSZ MJ,BOHNE R, WANG-WEIGAND S,TAIWO OY, MITCHELL PG,OTTERNESS IG, FLANNERY CR,CATERSON B,Matrixmetalloproteinases are involved in C-terminal and interglobular domain processing of cartilage aggrecan in late stage cartilage degradation, *Matrix Biol.*, v.21, n.3,p.271–288, 2002.

LOESER RF.Aging and osteoarthritis:the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage*. v.17, n.8, p.971-9, 2009.

LOUGHLIN, J. The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. *Expert reviews in Molecular Medicine*, v. 7, n. 9, p. 1-12, 2005.

MARTEL-PELLETIER J,BOILEAU C,PELLETIER JP,ROUGHLEY PJ.Cartilage in normal and osteoarthritis conditions.*Best Pract Res Clin Rheumatol.*, v.22, n.2, p.351-84, 2008.

MARTIN JA, ELLERBROEK SM, BUCKWALTER JA. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res*, v.15, n.4, p.491-8, 1997.

MARTIN, K., LETHBRIDGE-CEJKU, M., MULLER, D.C., ELAHI, D., ANDRES, R., TOBIN, J.D., HOCHBERG, M.C. Metabolic correlates of obesity and radiographic features of knee osteoarthritis: data from the Baltimore longitudinal study of aging. *Journal of Rheumatology*, v. 24, n. 4, p. 702-707, 1997.

MESSAI H, DUCHOSSOY Y, KHATIB A, PANASYUK A, MITROVIC DR. Articular chondrocytes from aging rats respond poorly to insulin-like growth factor- 1: an altered signaling pathway. *Mech Ageing Dev*, v. 115, p.21-37, 2000.

MOURITZEN U, CHRISTGAU S, LEHMANN HJ, TANKO LB, CHRISTIANSEN C. Cartilage turnover assessed with a newly developed assay measuring collagen type II degradation products: influence of age, sex, menopause, hormone replacement therapy, and body mass index. *Ann Rheum Dis*, v.62, n.4, p.332-6, 2003.

NELSON F, BILLINGHURST RC, PIDOUX I, REINER A, LANGWORTHY M, MCDERMOTT M, MALOGNE T, SITLER DF, KILAMBI NR, LENCZNER E, ET AL: Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of the anterior cruciate ligament. *Osteoarthritis Cartilage*, v.14, n.12, p.114–119, 2006.

POOLE, A.R. An introduction of the pathophysiology of osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience*, v. 4, p. 662-670, 1999.

PRATTA MA, YAO W, DECICCO C, TORTORELLA MD, LIU RQ, COPELAND RA, MAGOLDA R, NEWTON R, TRZASKOS JM, ARNER EC, Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage, *J. Biol. Chem.* v.278, n.46, p.45539–45545, 2003

RAMOS AMO. ET AL. Artrite induzida por zymosan em ratos: estudos histológicos, histoquímicos e bioquímicos dos glicoconjugados da cartilagem articular. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.41, n.4, p.205-212, 2001.

RASBAND WS. Image J. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/il1997-2006>>.

ROSEN F, MCCABE G, QUACH J, SOLAN J, TERKELTAUB R, SEEGMILLER JE, LOTZ M. Differential effects of aging on human chondrocyte responses to transforming growth factor beta: increased pyrophosphate production and decreased cell proliferation. *Arthritis Rheum.*, v.40, n.7, p.1275-81, 1997.

SÄMÄNEN AM. Articular cartilage proteoglycans and joint loading. A study in young rabbits and dogs. Thesis. Publications of the University of Kuopio, Medicine, Original Reports, v.7, p. 1-67, 1989.

SANDY JD, VERSCHAREN C, Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo, *Biochem. J.* 358 (Pt 3), p.615–626, 2001.

SHANE ANDERSON A, LOESER RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol.*, v.24, n.1, p.15-26, 2010.

SIMON W. Scale effects in animal joints. I. Articular cartilage thickness and compressive stress. *Arthritis Rheum*, v.13, n.3, p.244-255, 1970.

SILVA FS JR, YOSHINARI NH, CASTRO RR, GIRÃO VC, POMPEU MM, FEITOSA JP, ROCHA FA. Combined glucosamine and chondroitin sulfate provides functional and structural benefit in the anterior cruciate ligament transection model. *Clin Rheumatol*, v.28, n.2, p.109-17, 2009.

SOUZA RS, PINHAL MA. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, v.36, n.1, p. 48-54, 2011

STOOP R, BUMA P, VAN DER KRAAN PM, HOLLANDER AP, BILLINGHURST RC, MEIJERS TH, POOLE AR, VAN DEN BERG WB. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthritis Cartilage.*, v.9, n.4, p.308-15, 2001.

STRUGLICS A, LARSSON S, PRATTA MA, KUMAR S, LARK MW, LOHMANDER LS. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage.*, v.14, n.2, p.101-13, 2006.

TAYLOR KR, GALLO RL. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.*, v.20, n.1, p.9-22, 2006.

VERBRUGGEN G, CORNELISSEN M, ALMQVIST KF, WANG L, ELEWAUT D, BRODDELEZ C, DE RIDDER L, VEYS EM. Influence of aging on the synthesis and morphology of the aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.*, v.8, n.3, p.170-9, 2000.

VERZIJL N, BANK RA, TEKOPPELE JM, DEGROOT J. AGEing and osteoarthritis: a different perspective. *Curr Opin Rheumatol.*, v.15, n.5, p.616-22, 2003.

VIGNON E, ARLLOT M, HARTMANN D, MOYEN B, VILLE G: Hypertrophic repair of articular cartilage in experimental osteoarthrosis. *Ann Rheum Dis*, v.42, n.1, p.82-88, 1983.

VIGNON E, ARLLOT M, PATRICOT LM, VIGNON G. The cell density of human femoral head cartilage. *Clin Orthop*, v.121, p.303-8, 1976.

WATANABE, H; YAMADA, Y; KIMATA, K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J. Biochem.*, v.124, n.4, p.687-693, 1998.

WELLS T, DAVIDSON C, MORGELIN M, BIRD JL, BAYLISS MT, DUDHIA J. Age-related changes in the composition, the molecular stoichiometry and the stability of proteoglycan aggregates extracted from human articular cartilage. *Biochem J*, v.370, p.69-79, 2003.

WILKINS E, DIEPPE P, MADDISON P, EVISON G. Osteoarthritis and articular chondrocalcinosis in the elderly. *Ann Rheum Dis*, v.42, n.3, p.280-4, 1983.

.

.

.

.

.



