



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO-SENSU EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS**

CHRISTINE MARIA MUNIZ SILVA

OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL
EFEITO ANALGÉSICO E CONDROPROTETOR DE UM POLISSACARÍDEO DE
ELEVADO PESO MOLECULAR

FORTALEZA

2016

CHRISTINE MARIA MUNIZ SILVA

**OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL
EFEITO ANALGÉSICO E CONDROPROTETOR DE UM POLISSACARÍDEO DE
ELEVADO PESO MOLECULAR**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto-sensu* em Cirurgia, da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para qualificação ao grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.
Área de concentração: Metabolismo, fisiologia e biologia celular no estresse

Orientador: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S579o Silva, Christine Maria Muniz.

Osteoartrite experimental : efeito analgésico e condroprotetor de um polissacarídeo de elevado peso molecular / Christine Maria Muniz Silva. – 2017.

68 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Alberto Dias Leite.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha.

1. Goma guar. 2. Viscosuplementação. 3. osteoartrite. I. Título.

CDD 617

CHRISTINE MARIA MUNIZ SILVA

**OSTEOARTRITE EXPERIMENTAL
EFEITO CONDROPROTETOR DE UM POLISSACARÍDEO DE ELEVADO PESO
MOLECULAR**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto-sensu* em Cirurgia, da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas. Área de concentração: Metabolismo, fisiologia e biologia celular no estresse.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Alberto Dias Leite (orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profª. Dra. Maria Luzete Costa Cavalcante
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Carlos Ewerton Maia Rodrigues
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

À Deus, razão de tudo.

Aos meus pais, que sempre me proporcionaram todo amor, apoio e acesso ao estudo.

À minha família, que tão paciente e compreensivamente soube entender minha pouca disponibilidade de tempo.

Especialmente à minha querida filha, Ana Clara, que no florescer da vida teve que, precocemente, entender uma mãe que por vezes teve de priorizar o estudo e o trabalho em detrimento de outras atividades.

Ao meu marido, Airton, fonte de estímulo e inspiração eterna, sem o qual eu não teria força para alcançar esse vôo e pelo muito ensinado.

AGRADECIMENTOS

Ao professor José Alberto Dias Leite que, além de me estimular nesse caminho, desde longa data, me inspira com seu entusiasmo pela docência.

A todos os colegas do laboratório de investigação em osteoartropatias, especialmente Ana Carolina Matias Dinelly Pinto, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves e Rodolfo de Melo Nunes, pelo apoio logístico e paciência em me imiscuir no mundo científico.

Às professoras doutoras Margarida Maria de Lima Pompeu e Virgínia Cláudia Carneiro Girão pelo apoio com a histologia e pelo carinho.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, alunos e professores, por terem compartilhado seus conhecimentos e pela colaboração na minha formação científica.

Especialmente, agradeço às queridas Maria Luciene Vieira Oliveira e Magda Fontenele de Sousa, secretárias do programa de cirurgia, pela disponibilidade e ajuda.

RESUMO

Osteoartrite é a principal causa de dor articular no mundo. Embora existam diversas modalidades terapêuticas, ainda não há uma droga capaz de reduzir ou recuperar os danos estruturais causados pela doença. Com o objetivo de investigar se um polissarídeo de goma guar (GG) desproteinado (DGG) promoveria analgesia e ou obteria efeito de minimização nas alterações da cartilagem decorrentes da osteoartrite, mesmo após alteração molecular. A DGG foi oxidado (DGGOX) ou sulfatado (DGGSU) através da inserção de novos grupos no C6 da manose ou C6 da galactose para se obter oxidação e sulfatação, respectivamente. As novas moléculas foram submetidas a testes químicos a fim de confirmar suas modificações. A seguir, foram avaliados quanto a dois parâmetros: dor e dano condral. Então, ratos, que foram submetidos a um modelo experimental de osteoartrite através da transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) do joelho direito, foram tratados por via intraarticular com salina ou com uma solução de 100µg de DGG, DGGOX ou DGGSU. Para inferir dor, usou-se o teste de incapacitação articular entre 4 e 7 dias após a TLCA e para estimar o dano estrutural foi feito histologia e bioquímica através da quantificação do sulfato de condroitina (CS) na cartilagem. A avaliação da massa molar do CS das amostras foi feita comparando sua mobilidade eletroforética relativa com um padrão de CS. Nos grupos destinados a investigação do grau de lesão articular, submetidos à TLCA, os animais receberam uma solução de 100µg DGG ou salina semanalmente do dia 7 ao dia 70. A administração de DGG promoveu analgesia significativa, ao passo que DGGOX e DGGSU não promoveram analgesia. O tratamento com DGG reverteu significativamente o aumento de CS, restarando a mobilidade eletroforética similar à normal do CS e preveniu as alterações histológicas secundárias à TLCA, quando comparado ao grupo tratado com salina. Em conclusão, podemos dizer que o efeito terapêutico obtido pelo composto DGG em osteoartrite experimental depende da estrutura da molécula.

Palavras-chave: Osteoartrite. goma guar. Ligamento cruzado anterior. Viscosuplementação.

ABSTRACT

Osteoarthritis is the leading cause of joint pain in the world. Although there are many treatment modalities, there is no drug able to reduce or recover structural damage. With the purpose of investigate if a protein-free guar gum (DGG) polyssacharide could promote chondral protection and or analgesic effects from osteoarthritis, even after molecular modifications, it was oxidized (DGGOX) or sulfated (DGGSU) by insertion of new groups in C-6 (manose) and C-6 (galactose), for DGGOX and DGGSU, respectively. Pain and chondral damage were evaluated. The new molecules were tested to confirm its alterations. Then, rats were subjected to anterior cruciate ligament transection (ACLT) of the righth knee, were submted to a treatment with intraarticular 100 µg DGG, DGGOX or DGGSU solutions and saline. The joint pain was evaluated using the articular incapacitation test, at days 4–7 after ACLT and joint damage was assessed using histology and biochemistry as the chondroitin sulfate (CS) content of cartilage. The molar mass of CS samples was obtained by comparing their relative electrophoretic mobility to standard CS. Another two groups that were done to investigate joint damage, undergone ACLT, received a solution of 100µg DGG or saline weekly, from days 7 to 70. DGG administration, but not DGGOX or DGGSU, significantly inhibited joint pain. DGG significantly reversed the increase in CS, its reduced electrophoretic mobility, and histological changes following ACLT, as compared to vehicle. Structural integrity accounts for DGG benefits in experimental osteoarthritis.

Keywords: Osteoarthritis. Guar gum. Cruciate anterior ligament. Viscosupplementation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	– Classificação radiográfica de Ahlbäck para OA do joelho e sistema da graduação e Kellgren and Lawrence modificada (Petersson,1997).....	16
Figura 1	– Curva-padrão de condroitin -6-sulfato	32
Figura 2	– Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (6% p/v) de condroitin-4-sulfato (C4S) e condroitin-6-sulfato (C6S).....	33
Figura 3	– Transecção do Ligamento Cruzado Anterior.....	34
Figura 4	– Animais deambulando no sistema para avaliação da incapacitação articular ..	35
Quadro 2	– Sistema OARSI para avaliação da cartilagem OA – grau.....	37
Quadro 3	– Sistema OARSI para avaliação da cartilagem OA – estágio.....	38
Figura 5	– Espectro FTIR da goma guar purificada (DGG) e seus derivados, oxidada (DGGOX) e sulfatada (DGGSU).....	40
Figura 6	– Espectro RNM C ¹³ da goma guar purificada e seus derivados, oxidada (DGGOX) e sulfatada (DGGSU).....	41
Figura 7	– Espectro HSQC de ¹ H- ¹³ C obtido para DGG e DGGOX.....	42
Figura 8	– Espectro DEPT ¹³⁵ da DGG sulfatada.....	43
Figura 9	– Estrutura química da goma guar purificada (DGG: C) e seus derivados: oxidada (DGGOX: B) e sulfatada (DGGSU: A).	44
Figura 10	– Cromatografia das curvas do gel de permeação da goma guar purificada e seus derivados, oxidada (DGGOX) e sulfatada (DGGSU).	45
Figura 11	– Efeito terapêutico local de preparações quimicamente modificadas de goma guar sobre a dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos.....	47
Figura 12	– Tratamento terapêutico intra-articular com goma guar previne alterações do condroitin-sulfato da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos.	48
Figura 13	– Efeito terapêutico intra-articular da goma guar sobre as alterações histopatológicas na osteoartrite induzida por TLCA em ratos	49
Figura 14	– Ilustração dos cortes das lâminas coradas com H-E (à esquerda) e azul de toluidina (à direita) com magnificação 40x, de joelho de ratos submetidos à transecção do ligamento cruzado anterior, após sacrifício ao septuagésimo dia de acompanhamento.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas da goma guar após modificação estrutural.....	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOS	American Academy of Orthopedic Surgery
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif
ACR	American College of Reumatology
ANOVA	análise de variância
CA	cartilagem articular
CEUA	Comissão de ética em uso de animais
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
CS	sulfato de condroitina
C4S	condrotina-4-sulfato
C6S	condroitina-6-sulfato
µCs/mg	micrograma de condroitin sulfato por miligrama
DEPT135	Incremento sem distorção por transferência de polarização na RNM
DGG	goma guar purificada
DGGOX	goma guar purificada oxidada
DGGSU	goma guar purificada sulfatada
ESCEO	The European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases
EtOH	etanol
EULAR	European League Against Rheumatism
FT-IR	Espectrofotometria de infravermelho
GAG	glicosaminoglicanos
GG	goma guar
GS	grau de substituição
i.art.	via intrarticular
KBr	Brometo de potássio
LABPOL	Laboratório de polímeros do departamento de química orgânica e inorgânica da Universidade Federal do Ceará
LIO	Laboratório de investigação em osteoartropatias do departamento de medicina clínica da Universidade Federal do Ceará
MEC	matriz extracelular
NaBr	Brometo de sódio
NaCl	cloreto de sódio

NaOH	hidróxido de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaNO ₃	nitrato de sódio
NT	não tratado
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PROLAV®	coquetel de enzimas proteolíticas
RID A6	detector de índice refrativo
RMN H ¹	ressonância nuclear magnética do hidrogênio ¹
RMN C ¹³	ressonância nuclear magnética de carbono ¹³
RPM	rotações por minuto
SYSADOA	droga sintomática de ação lenta para OA
TEMPO	<i>N</i> -oxil-2,3,6,6-tetrametilpiperidina
PET	tempo de elevação da pata

LISTA DE SÍMBOLOS

η viscosidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Osteoartrite (OA)	14
1.1.1	Tratamento da Osteoartrite	17
1.1.2	Viscossuplementação.....	19
1.2	Osteoartrite e inflamação	21
1.3	Cartilagem Articular	22
1.3.1	Proteoglicanos	23
1.3.2	Glicosaminoglicanos (GAG)	24
1.4	Polissacarídeo de GOMA GUAR	25
1.5	Modelos experimentais em Osteoartrite	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivos Gerais	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Material químico	29
3.2	Animais	29
3.3	Sulfatação da goma guar	29
3.4	Oxidação da goma guar.....	30
3.5	Caracterização dos derivados da goma guar	30
3.6	Análise de Glicosaminoglicanos (GAG) da Cartilagem Articular	31
3.7	Modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)	33
3.8	Mensuração da dor articular	34
3.9	Histopatologia	35
3.10	Manipulação farmacológica	38
3.11	Estatística	39
4	RESULTADOS	40
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Osteoartrite (OA)

OA é a principal causa de dor articular no mundo, sendo responsável por grande impacto social e econômico. Estima-se, com base em dados dos Estados Unidos da América, que 35% dos indivíduos acima de 65 anos de idade apresentem OA em qualquer das suas apresentações clínicas e que sua incidência esteja em crescimento, dado o envelhecimento populacional (NEOGI, 2013). Além da alta prevalência, a OA tem grande importância econômica, uma vez que é uma das mais frequentes causas, direta ou indiretamente, de absenteísmo ao trabalho, causando grande impacto social, gerando altos custos e incapacidade laborativa disponível em: <http://www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis.html>. 01/12/2016, acesso: 26/09/2016.

Apesar de tão comum, ainda existem muitas demandas não atendidas, tais como a descrição de fenótipos para caracterizá-la adequadamente, biomarcadores para diagnóstico mais preciso e existência de tratamentos que possam modificar seu curso.

Por muito tempo, descreveu-se a doença como um desequilíbrio entre a degradação e o reparo da cartilagem articular, sendo, portanto, considerada uma lesão degenerativa, relacionada ao envelhecimento da articulação. Os termos artrose ou osteoartrose, ainda comumente usados, foram por muito tempo utilizados, dado o entendimento de ser uma doença mecânica, relacionada ao envelhecimento e desgaste articular. Entretanto, a partir dos anos 90, ganhou ênfase a compreensão de que o componente inflamatório é importante na sua fisiopatologia. A partir dessa época, começou-se a descrever a participação de mediadores inflamatórios, evidenciado pela liberação de prostanoídes e citocinas em modelos experimentais e em humanos portadores de OA, particularmente a partir de estudos em OA dos joelhos. Esses mediadores, assim como espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, promoveriam dano tecidual via migração e ativação de células residentes como sinoviócitos, mas também células migradas para o foco inflamatório, com papel relevante para macrófagos. Um dos mecanismos de lesão seria pela ativação de metaloproteinases que fragmentariam a cartilagem articular e osso subcondral por aumento da reabsorção óssea via ativação de osteoclastos. Nesse contexto, alterações no osso subcondral e presença de sinovite, mesmo que menos exuberante se comparada à observada em outras artropatias crônicas inflamatórias como a artrite reumatóide, revelaram que, para além da cartilagem, a articulação como um todo seria o “órgão” atingido na OA, evidenciado por uma

lenta, mas persistente, inflamação local com dano tecidual progressivo. A associação de portadores de OA com outras doenças como obesidade, dislipidemia, síndrome metabólica e aterosclerose levou à proposição de que a OA faria parte de uma síndrome inflamatória, cujo maior impacto seria nas articulações. Essa proposição aventou a idéia de que o tratamento da OA envolveria abordagem sistêmica dessa síndrome, associada a medidas locais para alívio de sintomas, permitindo melhor locomoção. (BERENBAUM,2013).

Qualquer articulação pode ser acometida por OA, mas sabe-se que mãos, joelhos, quadris e coluna são os sítios mais envolvidos. Alguns fatores de risco são responsáveis por maior prevalência e/ou gravidade da doença, como: obesidade, sexo feminino, trabalhador braçal, hereditariedade e trauma. Um componente genético é aventado para seu desencadeamento, haja vista situações como a existência de animais geneticamente modificados que desenvolvem OA ao longo da vida e a maior prevalência de OA de mãos em mulheres de uma mesma família. (BERENBAUM, 2015).

O diagnóstico clínico da lesão é feito a partir da história, em que o paciente refere dor, edema e limitação da função articular, inicialmente, após uso da articulação. Com a evolução do quadro, tal dor pode ser progressiva, aparecendo mesmo no repouso e evoluindo com deformidade, que leva paulatinamente à perda de sua função articular. Ao exame físico, confirma-se o edema e crepitação, sendo que em quadros mais avançados também pode haver grave limitação da amplitude de movimento.

A radiografia simples ainda permanece como o exame de imagem padrão para o diagnóstico e estadiamento da OA na grande maioria dos pacientes. Entretanto, a popularização das técnicas de ressonância nuclear magnética pode vir a ser útil na realização de diagnóstico mais precoce, viabilizando intervenções com objetivo de prevenir progressão de dano estrutural. Entretanto, há necessidade de estudos de validação de protocolos de imagem à ressonância nuclear magnética que permitam reprodutibilidade na prática clínica. (HOCHBERG, 2013).

Existem diversas classificações descritas quanto à localização, podendo ser considerada primária ou secundária, no primeiro caso quando não se identificam fator(es) que tenha levado a dano articular ou pós-trauma, por exemplo, no segundo caso. A etiologia é desconhecida, a despeito de se conhecerem fatores que, embora considerados desencadeantes da OA talvez sejam fatores agravantes da evolução do dano articular.

As classificações mais utilizadas se baseiam nas características descritas no exame radiográfico simples. No caso do joelho, existem várias classificações disponíveis e testadas quanta à sua reprodutibilidade e comparação com achados artroscópicos (PETERSSON,

1997). No entanto, duas classificações são consagradas pelo uso, a saber: Kellgren- Lawrence e Ahlbäck (quadro 1).

Quadro 1 – Classificação radiográfica de Ahlbäck para OA do joelho e sistema da graduação e Kellgren and Lawrence modificada (Petersson,1997).

Allbäck grau	Definição	Kellgreen-Lawrence grau	Definição
Grau I	Estreitamento do espaço articular < 3mm	Grau 0 ausente	Ausência de características de OA radiográfica
Grau II	Obliteração do espaço articular	Grau 1 duvidoso	Osteófito em formação
Grau III	Mínimo atrito articular (0-5mm)	Grau 2 leve	Osteófito definido, espaço articular preservado
Grau IV	Moderado atrito articular (5-10mm)	Grau 3 moderado	Múltiplos osteófitos, moderada diminuição do espaço articular, esclerose, deformidade óssea leve
Grau V	Grave atrito articular (>10mm)	Grau 4 grave	Osteófitos grandes, acentuada diminuição do espaço articular, esclerose grave, deformidade óssea definitiva

Fonte: Petersson,1997

Essas classificações não apenas permitem o diagnóstico de OA de joelhos, mas também estadiar clinicamente conforme a exuberância de alterações encontradas na radiografia. Vale comentar, entretanto, que não há associação clara entre gravidade clínica, ou sintomas, da OA de joelhos e imagem à radiografia, o que representa uma limitação na interpretação dessas classificações. Isso é ilustrado pela característica peculiar da doença que torna ainda mais desafiador seu estadiamento preciso e principalmente o desenvolvimento de novas medicações, que é a frequente dissociação clínico-radiológica. Associado a isso, a inexistência de biomarcadores diagnósticos e de atividade da doença dificulta, por vezes, a identificação de quadros de progressão mais rápida, bem como os casos de evolução mais grave, ainda que lentamente (TAKAHASHI, 2004)

Vários estudos associam a expressão de alguns genes com maior susceptibilidade à OA, bem como maior gravidade da doença. A variabilidade na expressão de genes de receptores vanilóides TRPV1, associados a mecanismos de dor pelo sistema nervoso não-adrenérgico/não-colinérgico, e da Interleucina (IL) -1 ou do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) foi incluída como associada a maior gravidade à doença. Entretanto, pelo menos até o momento, não se vislumbra aplicação prática de genotipagem, quer para identificação de indivíduos predispostos à OA, quer aqueles com quadro clínico mais grave e tendência de rápida progressão (HOCHBERG, 2013).

O acesso ao tratamento da OA, a exemplo do que ocorre com outras doenças, é mais difícil para indivíduos com menor poder aquisitivo. Isso decorre não apenas para medicamentos, apesar de carecermos de drogas que de forma efetiva impeçam ou retardem a evolução da doença, mas não menos importante, para tratamento com medidas não-farmacológicas, cujo custo também pode ser alto. Acesso a medidas fisioterápicas, reabilitação, uso de órteses e atividades que possam reduzir o impacto clínico da OA representa uma necessidade não-atendida dos pacientes. O custo unitário na maioria das vezes é razoável, mas, por necessitar uso de longo prazo e modificar hábitos, gera despesas indiretas, que complicam sua efetivação. Ainda, há carência de equipamentos públicos para atividades recreativas, desportivas e fisioterápicas necessárias ao tratamento da OA. Quando os pacientes com OA têm indicação para substituição cirúrgica de juntas (artroplastia), no Brasil, esse acesso é diretamente influenciado pelo poder aquisitivo. Essa situação leva a uma consideração que se repete com outros problemas de saúde no Brasil, posto que indivíduos portadores de OA têm sua evolução afetada pela situação sócio-econômica, que também se reflete quando submetidos a artroplastia, uma vez que estão mais sujeitos a complicações pós-cirúrgicas como infecção e reabsorção óssea, provocando necessidade de reoperação mais frequentemente.

1.1.1 Tratamento da Osteoartrite

O tratamento da doença, assim como toda doença que afeta o sistema músculo-esquelético, inicialmente é voltado para o controle dos sintomas e educação do doente, objetivando mudanças de comportamento e estimulando a prática de atividades físicas regulares. Essas têm como objetivo também o ganho de massa muscular. Considerando que o envelhecimento se associa à perda de massa muscular (sarcopenia), é fundamental aliar uma dieta com baixo teor de gorduras a exercícios para ganho ou, pelo menos, preservação da

massa muscular, resultando inclusive em ganho de propriocepção, mais desenvoltura na marcha, menos dor à deambulação e menor risco de quedas, reduzindo também o risco de fraturas por osteoporose.

Embora haja apenas dois estudos bem conduzidos sobre órteses, esses merecem destaque, até porque foram ambos conduzidos em serviços de reumatologia brasileiros. Em um estudo controlado, randomizado, mostrou-se que o uso de palmilhas com reforço medial reduz significativamente a dor, quer em repouso, quer em movimento, em indivíduos com OA de joelhos, quando comparado a uso de palmilha neutra. Um outro estudo avaliou o alívio de sintomas pelo uso de bengala em indivíduos com OA de joelhos e concluiu, embora com pequeno “tamanho de efeito”, que há melhora significativa comparando a não usar bengala. Ambos estudos foram incorporados no último guia de conduta da OARSI (MCALINDON, 2014). O destaque a esses estudos, além da boa qualidade na sua realização, deve-se também à documentação da eficácia de medidas não-farmacológicas no tratamento da OA dos joelhos, fundamentando-se em medicina baseada em evidências. Essas medidas não-farmacológicas são associadas com redução de sintomas e podem retardar a progressão da doença. Ainda, estimulam a participação do paciente na condução e implementação do próprio tratamento, com baixo risco de eventos adversos, levando a melhora nos índices de qualidade de vida. (MCALINDON, 2014).

O tratamento medicamentoso pode ser didaticamente dividido em alternativas para alívio de sintomas e aquelas para interferir na progressão do dano estrutural da articulação.

No primeiro grupo, há vários fármacos, incluindo analgésicos como o paracetamol, anti-inflamatórios não-hormonais e mesmo analgésicos opióides considerados menos potentes como o tramadol e a codeína, sejam em uso isolado ou associado ao paracetamol, o que pode levar a sinergia no alívio de dor. Anti-inflamatórios não-esteroidais continuam a ser usados, muitas vezes por iniciativa dos pacientes, posto que quase todos são de fácil aquisição no Brasil. Vale destacar que persiste a recomendação para cuidado na prescrição dessa classe de medicamentos a pacientes que tenham comorbidades cardiovasculares, particularmente aqueles com antecedente ou risco real de doença coronariana. Nesse caso, talvez o único anti-inflamatório seguro seja o naproxeno, uma vez que há estudos documentando que não aumenta o risco cardiovascular, inclusive não elevando a pressão arterial sistêmica. No outro ponto, há a questão da proteção ao risco de sangramento do trato gastrointestinal, seja de origem no trato gastrointestinal superior ou inferior. Isso porque já há farta documentação que antiinflamatórios não-esteroidais podem levar a

hemorragia digestiva baixa. Conquanto esse último evento não seja passível de proteção, é recomendada a administração concomitante de inibidor de bomba de prótons, mormente quando do uso dos classificados como não-seletivos para ciclooxigenase tipo II. Entretanto, em pacientes com alto risco de hemorragia digestiva alta, com antecedente de episódio desse tipo, é possível que a melhor alternativa seja combinar um anti-inflamatório não-hormonal seletivo para ciclooxigenase tipo II (coxibe) a um inibidor de bomba de prótons (MCALINDON, 2014).

O tratamento que se propõe à inibição da progressão estrutural da doença permanece um desafio. Nutracêuticos, drogas sintomáticas de ação lenta para OA (SYSADOAs) e viscosuplementação são prescritos com esse objetivo, embora ainda haja pouca evidência para suportar completamente tais medicações (BRUYÈRE et al., 2014; HOCHBERG et al., 2012; MCALINDON et al., 2014). Quando os sintomas são fortes e a doença já está avançada, especialmente, na OA do quadril e do joelho, pode-se indicar artroplastias. Esses são procedimentos de indicação crescente, devido à melhora dos materiais e ao envelhecimento da população. Cerca de 90% das articulações substituídas atualmente são decorrentes de OA. No entanto, esses são procedimentos dispendiosos, com risco de complicações e com meia-vida ainda relativamente curta, fazendo com que especialmente em indivíduos abaixo de 50 anos de idade não seja uma solução definitiva. Não menos importante, cerca de 20% dos pacientes continuam a sentir alguma forma de dor articular, mesmo após artroplastias bem-sucedidas (<http://www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis.htm>), (VAN DER KRAAN, 2016).

Diante do exposto, pode-se concluir que existem ainda muitas demandas não atendidas para o tratamento da OA e o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que possam prevenir ou tratar o dano estrutural e melhorar os sintomas se faz necessário. Tratamentos personalizados, com estratégias específicas para o paciente, requerem biomarcadores que os estratifiquem baseando-se em subtipos de OA e os específicos processos fisiopatológicos envolvidos, levando em consideração que tais processos possivelmente tenham peculiaridades individuais durante a progressão da doença (GOLDRING, 2015).

1.1.2 Viscosuplementação

Há uma modalidade para tratamento da OA chamada de viscosuplementação. Consiste na infiltração intra-articular de derivados de ácido hialurônico de alto peso molecular

que, segundo se aventava, graças às suas características reológicas, proporcionariam melhora das propriedades viscoelásticas do líquido sinovial, aliviando a dor e, portanto, melhorando a deambulação (MAHEU, 2016). Existem no mercado várias preparações, com compostos de diferentes pesos moleculares, uma vez que é aventado que essa variação influenciaria o benefício clínico.

O Hilano G-F20® é um desses agentes de viscosuplementação, formado pela associação de dois polissacarídeos constituindo um composto de alto peso molecular. É um líquido viscoelástico estéril e apirogênico, injetável, para uso intra-articular. Derivado do sal sódico do ácido hialurônico, constitui-se de unidades sequenciais de dissacarídeos de N-acetilglicosamina e glicuronato de sódio, sendo biologicamente similar ao hialuronato. O hialuronato é um glicosaminoglicano que está presente na cartilagem articular e no líquido sinovial, responsável por sua viscoelasticidade. Suas propriedades mecânicas (viscoelasticidade) são, entretanto, superiores à do líquido sinovial e de soluções de hialuronato de concentrações comparáveis. Os hilanos são degradados pelo organismo através das mesmas vias do hialuronato sendo os produtos resultantes não-tóxicos (CASTRO, 2007).

A rigor, a viscosuplementação tem sido proposta como um termo para indicar a recuperação das propriedades fisiológicas do líquido sinovial após a infiltração intra-articular de uma solução de ácido hialurônico de alto peso molecular ou seus análogos (HUNTER, 2015). Apesar da controvérsia no resultado de estudos clínicos, vários guias de conduta atuais de tratamento da OA a recomendam como uma alternativa terapêutica, especialmente em pacientes portadores de OA do joelho (HOCHBERG, 2012; MCALINDON, 2014). As revisões sistemáticas e meta-análises atualmente disponíveis carecem de resposta definitiva quanto ao papel da viscosuplementação. Talvez a justificativa para isso seja a falta de padronização dos pacientes incluídos nos protocolos, variabilidade de compostos usados e na seleção adequada dos artigos (JEVSEVAR, 2015). Tampouco foi demonstrado o mecanismo responsável pela atividade biológica dos agentes de viscosuplementação, apesar do alegado benefício que compostos de maior peso molecular teriam, bem como o estado em gel, com viscosidade intrínseca elevada (BANNURU, 2015). Como exemplo, hilanos de alto peso molecular (em torno de 10^6 g/mol) tiveram eficácia semelhante quando comparados a compostos de baixo peso molecular ($5-7.5 \times 10^5$ g/mol) em promover alívio da dor na OA de joelhos (PASQUALI RONCHETTI, 2001). O alívio clínico sustentado pode ser obtido após uma série de 3-5 injeções ou mesmo após dose única do composto que pode perdurar até 8-12 meses (KIRWAN, 2001) o que vai de encontro à explicação do efeito terapêutico baseado

em sua capacidade reológica. Isso é particularmente intrigante se considerarmos que o clearance de ácido hialurônico endógeno na junta é estimado em 20 horas e que na articulação com OA deve ser ainda mais rápido. Assim, é possível que o hialuronato administrado exogenamente permaneça menos de um dia na cavidade articular (HUNTER, 2015).

1.2 Osteoartrite e inflamação

Por muito tempo, a OA foi considerada uma doença decorrente do desgaste mecânico por aumento de pressão na articulação ou fragilidade da matriz articular. Progressos na biologia molecular, na década de noventa, modificaram profundamente esse paradigma. A liberação de mediadores inflamatórios solúveis como citocinas e prostaglandinas aumentaria a expressão de genes e ativação de metaloproteinasas da matriz, que são produzidas por condrócitos e sinoviócitos. Uma “teoria inflamatória” contemplaria esse mecanismo fisiopatológico, abrindo novas possibilidades terapêuticas (BERENBAUM, 2013). Evidências crescentes mostram reação inflamatória no tecido sinovial de pacientes com OA (FELSON, 2006), sugerindo a participação ativa da sinovite e sistema imune no desenvolvimento e progressão da doença (KLEIN-WIERINGA, 2016). Com o advento das técnicas de ressonância, passou-se a perceber a participação precoce da sinovite nessa doença, bem, como seu impacto na dor. Algum grau de sinovite está presente desde as fases iniciais da OA, sendo caracterizada por hiperplasia, hipertrofia e angiogênese. Exames histológicos, que são o padrão ouro para o diagnóstico, da sinovite da OA revelam: espessamento da camada basal, aumento da vascularidade e infiltrados de células inflamatórias, com participação de macrófagos e linfócitos T e B (WENHAM, 2010). Didaticamente, foi proposto um estadiamento da OA, a saber: Estágio 1, em que ocorreria proteólise enzimática da matriz da cartilagem, seguindo-se pelo Estágio 2, em que se perceberia fibrilação e erosão da superfície cartilaginosa, que é acompanhada por liberação de produtos da degradação no líquido sinovial. Em um Estágio 3, a inflamação da sinóvia progride, sendo amplificada pela fagocitose de produtos de degradação da cartilagem levando à ativação das células inflamatórias residentes e migradas na sinóvia, liberando-se espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e ativação de proteases que amplificariam a degradação da matriz da cartilagem em um ciclo vicioso (MARTEL-PELLETIER, 2004).

Estudos mostram níveis aumentados de citocinas tais como IL-1 β , IL-8, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- α) e Interferon- γ em articulações acometidas por OA e sugerem uma associação entre esses mediadores e a destruição da cartilagem. A rigor, IL-

le TNF- α tem sido proposto como os principais mediadores envolvidos na patogênese da OA, assim como na inflamação sinovial e ativação dos condrócitos, mas isso ainda está por ser estabelecido (BONDESON, 2006).

Embora o grupo de citocinas inflamatórias seja o mais importante grupo de compostos participantes na patogênese da OA, com participação de IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-15, IL-17 e IL-18, outros mediadores também contribuem nesse mecanismo. Além do desequilíbrio da homeostase metabólica sobre as células, essas citocinas promovem ainda processos destrutivos e catabólicos, com alteração nas vias sinalizadoras intracelulares. Há também participação, embora com menos importância, de citocinas consideradas anti-inflamatórias, a saber: IL-4, IL-10, and IL-13, na patogênese da OA, o que ilustra a complexidade da fisiopatologia da doença (WOJDASIEWICZ, 2014). O fato de não se ter demonstrado eficácia no tratamento da OA em pacientes que receberam bloqueadores de IL-1 ou TNF, como se conseguiu no tratamento de outras artrites crônicas, questiona sua relevância no processo inflamatório (MCALLINDON, 2014). Ademais, é possível que fragmentos da matriz da cartilagem, frutos em parte de distúrbios mecânicos à junta, possivelmente via ativação de padrões de receptores associados a dano (DAMP), portanto ativando receptores da resposta imune inata, possam ativar sinoviócitos e células migradas para a sinóvia, mantendo continuamente esse processo (SAITO, 2002). A possibilidade de que produtos da matriz da cartilagem articular causem ativação de sinoviócitos e dano associados à OA ainda está por ser completamente demonstrada, apesar das evidências recentes. Ainda, é possível que alterações do fenótipo de componentes da matriz articular sejam úteis como biomarcadores na avaliação dessa doença e venham a atender a necessidade de um parâmetro reprodutível para mensurar atividade de doença, permitindo melhor avaliar o efeito de intervenções terapêuticas.

1.3 Cartilagem Articular

A cartilagem articular não é uma superfície de carga homogênea, inerte e simples, mas um tecido vivo e complexo. Tem a capacidade de promover diminuição da superfície de fricção, participa da lubrificação articular e distribui as cargas para o osso subcondral. É um importante componente das articulações sinoviais, dando-lhes aspecto liso e esbranquiçado, contribuindo para diminuição do atrito durante a locomoção e distribuição das cargas na articulação durante a ortostase, minimizando assim o estresse sobre o osso subcondral (BUCKWALTER, 1998).

Caracterizada por ser um tecido aneural e vascular, a cartilagem é constituída por condrócitos dispersos em uma matriz extracelular (MEC) abundante, de aspecto homogêneo e translúcido. A MEC é formada por fluido intertiscial e matriz orgânica composta principalmente por colágeno tipo II, proteínas não colágenas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAG) e glicoproteínas, os quais conferem à MEC suas propriedades mecânicas e biológicas. Quanto ao fluido intersticial, a água é o seu principal constituinte.

Os condrócitos, células da cartilagem, produzem e regulam a homeostase dessa matriz, através da expressão de enzimas proteolíticas tais como metaloproteinases (MMP) e A Disintegrin And Metalloproteinase with a ThromboSpondin motif (ADAMTS) (MARTEL-PELLETIER et al.,2008).

Um dos sinais iniciais da OA consistiria em alterações da MEC da cartilagem articular, com alteração na quantidade de proteoglicanos, ruptura da rede de colágeno e um aumento da hidratação, levando a insuficiência progressiva das propriedades biomecânicas da cartilagem, comprometendo seu complexo funcionamento (ESPANHA, 2010).

A melhor compreensão da composição molecular de tecidos como a cartilagem tem promovido um grande suporte para o estudo das alterações na OA. Em estudos de fragmentação das moléculas presentes na matriz extracelular, foi demonstrado que componentes dessa degradação poderiam induzir a produção de citocinas por células sinoviais, bem como levar à secreção e ativação der enzimas proteolíticas, promovendo aumento na degradação da MEC (HEINEGARD, 2009).

1.3.1 Proteoglicanos

Os proteoglicanos são moléculas formadas por um eixo protéico ao qual se ligam covalentemente cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAG), carregadas negativamente. São componentes importantes da MEC da cartilagem articular e contribuem para suas características de elasticidade e resiliência, devido a sua forte capacidade de atrair água (BERNFELD, 1999; HEINEGARD, 2009). O mais abundante dos proteoglicanos da MEC da cartilagem articular é o Agrecano.

Em condições normais, proteoglicanos formam grandes agregados ligados de forma não covalente ao ácido hialurônico e à proteína de ligação (*link protein*). Eles têm padrão de distribuição que varia a depender da profundidade (zonas) da cartilagem articular. Por exemplo, o Agrecano, (tanto seu domínio G1, bem como os domínios G2 e G3), Proteína

de ligação, Condroadarina e Osteoadarina apresentam uma marcante presença na zona profunda, enquanto Mimecano e Trombospondina-1 só aparecem na camada média da cartilagem (MULLER, 2014; BAYLISS, 1983).

1.3.2 Glicosaminoglicanos (GAG)

GAG são polissacarídeos lineares, não-ramificados, constituídos de unidades dissacarídicas que se repetem. São formados por um açúcar aminado (N-acetil-glicosamina ou N-acetil-galactosamina) e ácido urônico (ácido glicurônico ou idurônico). A composição dos GAG varia de maneira que queratan-sulfato e heparan-sulfato, por exemplo, apresentam galactose na posição do ácido urônico e glicosamina na posição do açúcar aminado, respectivamente. Eles se classificam de acordo com a composição monomérica, tipo de ligações glicosídicas, grau e posição da sulfatação. Os GAG que compõem a maioria dos proteoglicanos da cartilagem articular são: condroitin-sulfato, queratan-sulfato, dermatan-sulfato, heparan-sulfato e ácido hialurônico (TAYLOR & GALLO, 2006).

GAG têm propriedades biológicas importantes, como o heparan sulfato, que participa na transdução de sinal intercelular, mediando a atividade de fatores de crescimento e da antitrombina III, além de agir como cofator de heparina e participar na ligação de selectinas de leucócitos, contribuindo para a quimiotaxia dessas células a sítios inflamatórios. Condroitin sulfato e dermatan sulfato regulam a atividade do fator de transformação de crescimento β e são um modulador alternativo de cofator de heparina tipo II. Dermatan sulfato induz a expressão de moléculas de adesão como a Molécula de Adesão Intercelular (ICAM-1) em células endoteliais também contribuindo ao recrutamento de leucócitos via aumento da expressão de selectinas em sua membrana. O ácido hialurônico (Hialuronato) também participa no recrutamento de leucócitos através de ligação ao receptor CD44, cuja expressão em células inflamatórias, particularmente macrófagos, leva à sua ativação, com liberação de mediadores inflamatórios, potenciando a inflamação. Mais recentemente, demonstrou-se que hialuronato pode agir como molécula padrão associada a dano (DAMP), através de ligação e sinalização por receptores Toll do tipo 4, com ativação de células dendríticas e células endoteliais, com importante repercussão na apresentação de antígenos de classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade e liberação de citocinas (TAYLOR&GALLO, 2006).

O condroitin-sulfato (CS) é o GAG presente em maior quantidade na cartilagem articular. Apresenta sulfatação da N-acetil-galactosamina na posição C-4 ou C-6, o que permite a identificação como condroitin-4-sulfato (C4S) ou condroitin-6-sulfato (C6S), respectivamente (SAAMANEN, 1989).

1.4 Polissacarídeo de GOMA GUAR

A fim de investigar se polissacarídeos de origem vegetal poderiam ter efeito semelhante ao obtido na viscosuplementação, como os de origem animal, entrou-se em contato com o Laboratório de Polímeros do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (LABPOL). A partir de estudo desenvolvido no Laboratório de Investigação em Osteoartropatias do Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará (LIO), em parceria com o LABPOL, obteve-se um polissacarídeo extraído da goma guar, uma goma comercialmente disponível.

A goma guar é um polissacarídeo altamente viscoso derivado do endosperma da semente da planta *Cyamopsis tetragonolobus*. É predominantemente composta de uma cadeia central de galactomanana com resíduos de manose, ligados por uma ligação glicosídica tipo β (1 \rightarrow 4) e resíduos de galactose com ligação tipo α (1 \rightarrow 6) ao resíduo central da manana.

Tem sido amplamente utilizada na indústria farmacêutica e cosmética como espessante por suas propriedades reológicas e na indústria alimentícia como fibra solúvel. Várias características concorrem para tanto: substância de baixo custo, abundante, com pH entre 5 e 7, biocompatível e termoestável, características que a tornam interessante para utilização como medicamento. Através de reações de precipitação e proteólise, chegou-se a um polissacarídeo composto de uma cadeia principal de galactomanana e cadeias laterais de manose e hexose.

A goma guar, a exemplo de outras gomas isoladas do endosperma de sementes vegetais, habitualmente tem contaminantes protéicos. Em um processo de purificação desse polissacarídeo, obteve-se uma substância livre de contaminantes protéicos, solúvel em salina. Considerando que a propriedade farmacológica dos agentes de viscosuplementação está ligada a polissacarídeos, o LIO, em cooperação com o LABPOL, fez a purificação da goma guar comercialmente disponível, para torná-la livre de proteínas. Tal purificação foi promovida através de quatro métodos diferentes, a fim de reduzir as impurezas, especialmente resíduos de proteína, para posterior avaliação de sua utilização como medicação para uso

intra-articular, uma vez que a presença de contaminantes proteicos poderia limitar o uso clínico (CUNHA, 2007).

Uma vez que o efeito terapêutico dos agentes de viscosuplementação é creditado às suas propriedades reológicas, sendo géis com alta viscosidade, o polissacarídeo isolado da goma guar foi submetido a um processo de reticulação com glutaraldeído, de sorte a se obter preparações com viscosidade intrínseca semelhante à do Hilano G-F20®, permitindo que se pudesse estudar a influência das propriedades reológicas do polissacarídeo na sua atividade terapêutica.

Em estudos conduzidos no LIO, o polissacarídeo de goma guar, na sua forma em gel (viscosidade intrínseca semelhante à do Hilano G-F20®) ou solúvel em salina, foi administrado ao joelho de animais submetidos à OA do joelho, induzida experimentalmente por transecção do ligamento cruzado anterior. Naquele estudo, foi evidenciado que a administração do polissacarídeo de goma guar, quer solúvel em salina, quer reticulado (gel), promoveu analgesia no modelo experimental de OA de joelho em ratos, similar à obtida com a administração de hilano G-F20 (CASTRO, 2007). Ou seja, tanto o polissacarídeo hidrossolúvel, quanto o reticulado (viscoso) promoveram analgesia, na mesma magnitude. Dessa forma, sugeriu-se que uma atividade farmacológica independente das propriedades reológicas estaria implicada no efeito analgésico do polissacarídeo (CASTRO, 2007).

Esse resultado sugeriu que a atividade antinociceptiva de polissacarídeos não depende de suas características reológicas, sendo possivelmente promovida por atividade farmacológica. Assim, a partir desse estudo surgiu a ideia de se investigar se a modificação das propriedades farmacológicas da goma concorreria para modificar seu efeito farmacológico.

1.5 Modelos experimentais em Osteoartrite

Uma melhor compreensão dos mecanismos inflamatórios e fisiopatológicos da OA vem sendo desenvolvida através de modelos experimentais animais. São utilizados animais dos mais variados tamanhos e espécies, de acordo com o objetivo específico da investigação. Para o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas novas ou desenvolvimento de novas tecnologias, o uso de animais de grande porte representa uma vantagem comparativa, facilitando a translação dos novos conhecimentos para sua aplicação em humanos (MADRY, 2015).

Existem vários modelos que objetivam reproduzir os fenótipos específicos e investigar aspectos diferentes da doença, tais como os modelos mecânicos, cirúrgicos ou induzidos por drogas. Os mecanismos moleculares da lesão estrutural articular e da dor podem ser distintos em modelos animais de OA induzidos ou iniciados por diferentes métodos, sem prejuízo da avaliação crítica sobre a limitação da extrapolação de dados obtidos em animais para a doença em humanos. Para os modelos de OA são utilizados principalmente: camundongo, rato, cobaia, coelho, carneiro, cabra e cavalo. Para avaliação de técnicas cirúrgicas, os modelos em animais de grande porte têm mais espaço. (LITTLE & ZAKI, 2012).

Classicamente os modelos experimentais são divididos em espontâneos e induzidos. Podem também ser agrupados em OA primária ou pós-traumática, que pode ser considerada um subtipo da AO secundária. Esses modelos e suas divisões relacionam-se com os diferentes fenótipos de OA. O fenótipo pós-traumático pode ser estudado através de modelos pós-traumáticos. O fenótipo metabólico é melhor estudado em modelos animais de ocorrência natural, o que reproduziria mais fielmente os efeitos da obesidade e das causas metabólicas, tais como o desequilíbrio estrogênico. Os modelos espontâneos são os mais reprodutíveis para a AO relacionada ao envelhecimento, por isso o uso de camundongo knock-out tem ganhado cada vez mais espaço para se investigar OA do idoso.

O ligamento cruzado anterior é responsável por evitar que a tíbia translate anteriormente em relação ao fêmur. Quando ele é rompido, cria-se um ambiente de instabilidade articular que pode resultar em OA. O modelo experimental de OA em ratos a partir da transecção do ligamento cruzado anterior (LCA) foi estabelecido por Stoop (2001). Sendo o fenótipo genético mais bem reproduzido por esse modelo. O LIO tem larga experiência com esse modelo e anteriormente propôs um método para avaliação quantitativa da hipernocicepção (dor) nesse modelo, padronizando a cinética da dor desencadeada a partir da lesão do ligamento cruzado anterior (CASTRO, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Demonstrar que modificações na estrutura química de um polissacarídeo derivado da goma guar alteram sua atividade biológica.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar derivados sulfatados ou oxidados de um polissacarídeo de Gomaguar.

Avaliar o efeito condroprotetor da administração intra-articular de um polissacarídeo derivado da goma guar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material químico

Todos os reagentes, a menos que informado de outra maneira, foram adquiridos da Sigma-Aldrich do Brasil, São Paulo, Ltda. A goma guar foi submetida à purificação para tornar-se livre de proteínas (DGG) de acordo com o procedimento de Fehling, com uma razão manose/galactose de 1,61 (CUNHA, 2005).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos da espécie Wistar, com peso variando de 180 a 200g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Cada grupo foi composto por seis animais. Os animais foram mantidos em grupos de seis por gaiola, em salas com controle de temperatura e do ciclo claro/escuro, com livre acesso a água e comida. Ao início do experimento, tinham 2,5 meses de idade. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e seu sacrifício foi realizado com deslocamento cervical, após sedação. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (número do protocolo 113/07).

3.3 Sulfatação da goma guar

A solução de goma guar purificada (DGG) foi sulfatada através do método descrito por Moura Neto, Maciel, Cunha, de Paula e Feitosa (2011) e recentemente usado para a sulfatação de uma galactomanana de *Dimorphandra gardneriana* (MOURA NETO, 2014). Algumas modificações foram feitas, como se segue: uma massa de 3g de solução de goma guar (DGG) foi dissolvida em 225ml de formaldeído por uma noite, seguindo-se administração de 60 ml de piridina. A solução foi resfriada à 4°C e foram acrescentados 18 ml de ácido clorosulfônico por um período de três horas. A proporção de massa molar do reagente de sulfatação para a unidade de açúcar foi mantida em 14,6. Após doze horas, a solução foi resfriada a 13°C e neutralizada com NaHCO₃, seguindo-se diálise contra água. O precipitado sólido foi lavado várias vezes com etanol e filtrado. O produto seco foi denominado DGGSU.

3.4 Oxidação da goma guar

A solução de goma guar purificada (DGG) foi oxidada seguindo o método descrito por Sierakowski, Milas, Desbrièes, Rinaudo (2000) e Cunha e colaboradores (2007), como segue: uma massa de dois gramas de DGG foi dissolvida em um litro de água destilada, sob agitação, por uma noite. A solução foi resfriada em banho gelado. Hipoclorito de sódio (9 mL) foi adicionado, ajustando o pH para 9.2, seguindo-se adição dos reagentes TEMPO (18,4mg) e NaBr (160mg), para promoção da oxidação. A oxidação foi realizada em pH constante, ajustado com NaOH. Hidreto de Boro (50 mL) foi incluído a fim de parar a reação. O pH foi ajustado para 7 e a goma foi precipitada com EtOH e após 12 horas em refrigerador, foi filtrada e lavada com EtOH. DGGOX é a denominação do produto obtido nessa preparação.

3.5 Caracterização dos derivados da goma guar

Os derivados sulfatados e oxidados da DGG foram analisados por quatro técnicas, para sua caracterização química: espectrofotometria de infravermelho (FT-IR), Ressonância nuclear magnética (RNM), reologia, massa molar e dispersão de luz estática.

A porcentagem de nitrogênio e enxofre foi determinada por microanálise elementar em um microanalisador Carlo Erba EA1108 e a porcentagem de N relacionada ao conteúdo de proteína através do fator de conversão de 5,87 (AZERO, 2002). O nível de sulfatação foi calculado a partir da equação proposta por Melo, Feitosa, Freitas e de Paula (2002). O nível de oxidação foi determinado por titulação em potenciômetro com NaOH 0,1mol/L. A FT-IR foi determinada em estado sólido usando o “precipitado” de KBr com um modelo de espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige 21 entre 400 e 4000 cm^{-1} .

A posição dos grupos introduzidos foi definida usando análise de Ressonância Nuclear Magnética (RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT 135), com técnicas uni ou bidimensionais (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, ^1H - ^{13}C HMQC). A goma foi dissolvida em água deuterada por 12 horas e analisada em um espectrômetro Bruker model Avance-DMX-500.

A medida de dispersão da luz estática, que reflete a medida do peso molecular médio, foi realizada em um fotômetro multiangulado Malls Dawn Wyatt Technology Corporation, trabalhando com um laser He-Ne (632,8 nm). As concentrações da goma variaram de $3,0 \times 10^{-4}$ a $1,15 \times 10^{-3}$ g/mL em NaNO_3 0,1mol/L, usada após filtração

através de membranas de Millipore de 0,2 e 0,45m. A viscosidade aparente foi determinada em solução aquosa a 1% (p/v) com taxa de cisalhamento 200 s^{-1} e temperatura de 25°C , pelo uso de um Reômetro modelo Brookfield cone-plate LV-DVIII.

A viscosidade intrínseca foi calculada pelo tempo de fluxo da solução em um viscosímetro capilar Ubbelohde da Cannon Instruments modelo 1 I-71. O solvente usado foi NaCl 0,1mol/L e a temperatura foi controlada a 25°C . Um gráfico de Huggins foi usado para a determinação.

A distribuição da massa molar foi estimada pela cromatografia em gel de permeação em um equipamento Shimadzu e detector de índice refrativo (RID-6A). Uma coluna de ultrahidrogel linear ($7,8 \times 300 \text{ mm}$, limite de exclusão $7,0 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, WatersTMCorporation), 0,1mol/L de NaNO_3 como solvente, fluxo de 0.5 mL/min , e temperatura ambiente foram as condições experimentais para análise de GPC.

3.6 Análise de Glicosaminoglicanos (GAG) da Cartilagem Articular

A eletroforese de proteínas em gel de agarose foi usada para determinação semi-quantitativa dos GAG extraídos de cartilagem femoral: $5,0 \mu\text{L}$ da solução aquosa de GAG foram aplicados em gel de agarose 0,6% p/v, e separados por eletroforese vertical (100V), em tampão diaminopropano-acetato, por 1 h. Os GAG foram fixados no gel por imersão em solução de brometo de cetil-trimetilamônio 0,1% w/v durante 2 horas. Após secagem sob calor e ventilação, o filme obtido foi imerso em azul de toluidina 0,1% p/v durante 15 min. O excesso de corante foi removido por imersão em solução descorante por 5 min. A quantificação de GAG no gel de agarose deu-se mediante comparação da densitometria óptica relativa, frente a uma curva padrão de condroitin-6-sulfato (C6S) ($2-12 \mu\text{g}$). Para avaliação da migração do GAG em gel de poliacrilamida, determinou-se a mobilidade eletroforética relativa ao condroitin-4-sulfato (C4S) (DIETRICH & DIETRICH, 1972), que tem o padrão de menor massa molar ponderal utilizado ($4,55 \times 10^4 \text{ g/mol}$).

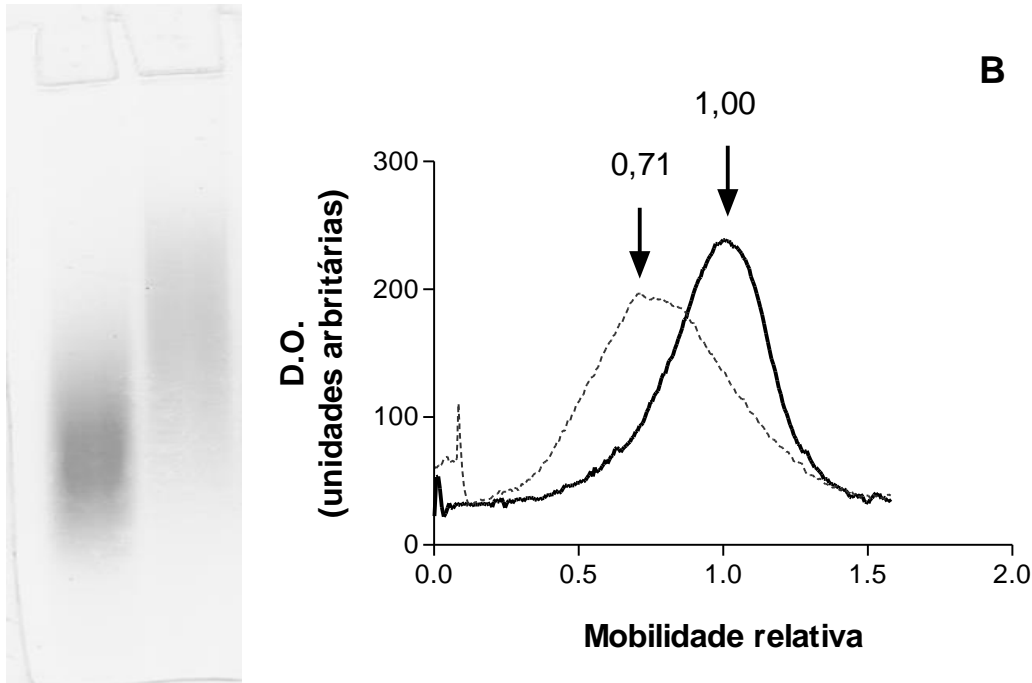
Figura 1 – Curva-padrão de condrotin -6-sulfato (C6S). (A) Eletroforese de diferentes quantidades de C6S em gel de agarose, tampão diaminopropano-acetato 50 mM, pH 9,00 (2-12 µg).



Fonte: LIO

Após coloração com azul de toluidina à 0,1% p/v, os géis foram digitalizados e analisados com o programa ImageJ 1.37 V (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>), disponibilizado gratuitamente pelo U. S. National Institutes of Health, que permite comparar as amostras em relação a padrões de CS e determinar a distribuição das curvas para as amostras de GAG.

Figura 2 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (6% p/v) de condroitin-4-sulfato (C4S) e condroitin-6-sulfato (C6S). (A) 10 µg de cada GAG foram submetidos à eletroforese (100V) em tampão barbital 60mM (pH 8,60). (B) Distribuições obtidas pela leitura das bandas no programa ImageJ 1.37 v. As massas molares ponderais de C4S (linha contínua) e C6S (linha descontinua) 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.

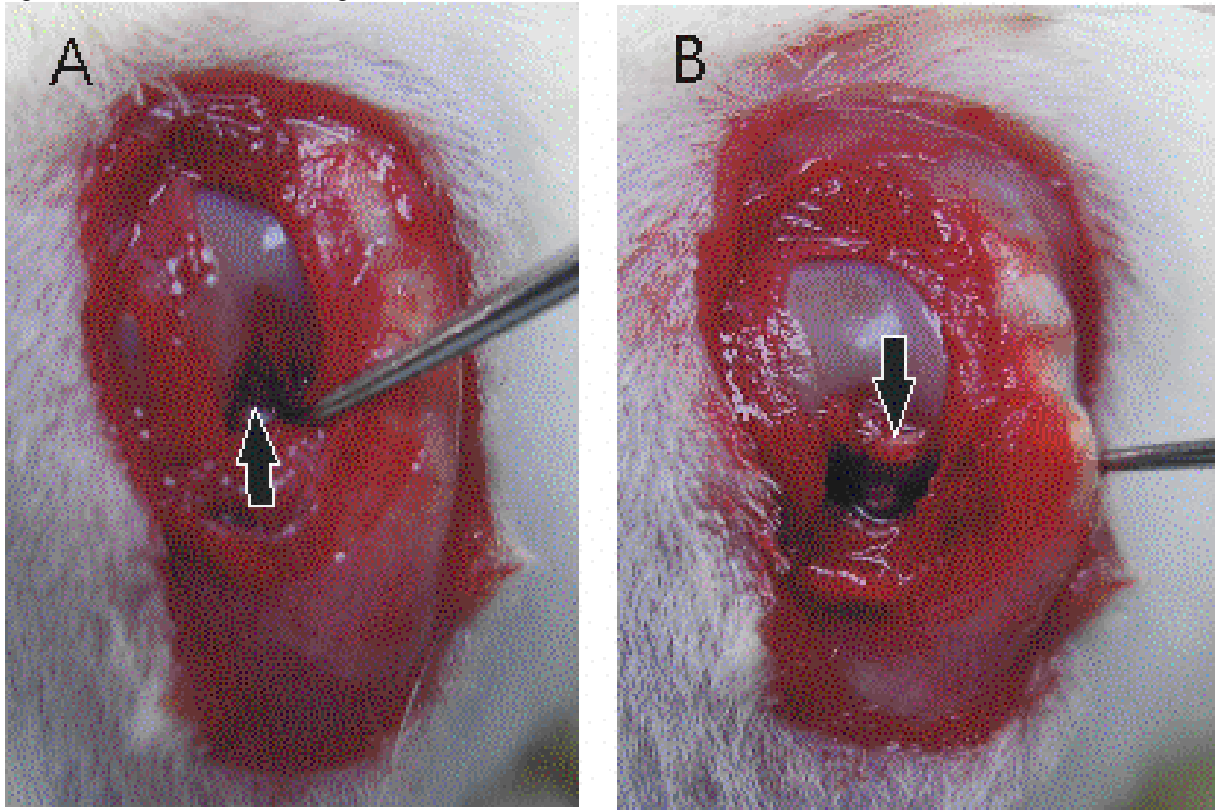


Fonte: LIO

3.7 Modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA)

Foram utilizados grupos de seia animais. Os ratos foram anestesiados com uma solução de ketamina (50 mg/kg) e xilazina intra-muscular (10 mg/kg). A pele foi preparada com assepsia, depilada e um acesso parapatelar anterior foi executado, seguido por luxação lateral da patela, possibilitando o acesso ao espaço articular. O ligamento cruzado anterior (LCA) fica, assim, facilmente visível. A seguir, realizou-se uma rotura completa do LCA cautelosamente, para não se promover lesão inadvertida da cartilagem ou dos meniscos. A confirmação da lesão é feita através da realização de um sinal da gaveta anterior (anteriorização da tíbia em relação ao fêmur). A cápsula articular e a pele foram suturadas com fios Vycril (6-0) e mononylon (4-0), respectivamente. Um grupo sham foi submetido a incisão de pele, luxação da patela e exposição da junta, sem lesão do ligamento cruzado anterior, seguido por fechamento da ferida incisional. O grupo naive não sofreu qualquer manipulação (STOOP, 2001).

Figura 3 – Transecção do Ligamento Cruzado Anterior. (A) Animal submetido à artrotomia, porém com o ligamento (seta) intacto. (B) Ligamento seccionado.



Fonte: dissertação doutorado Rondinele Castro

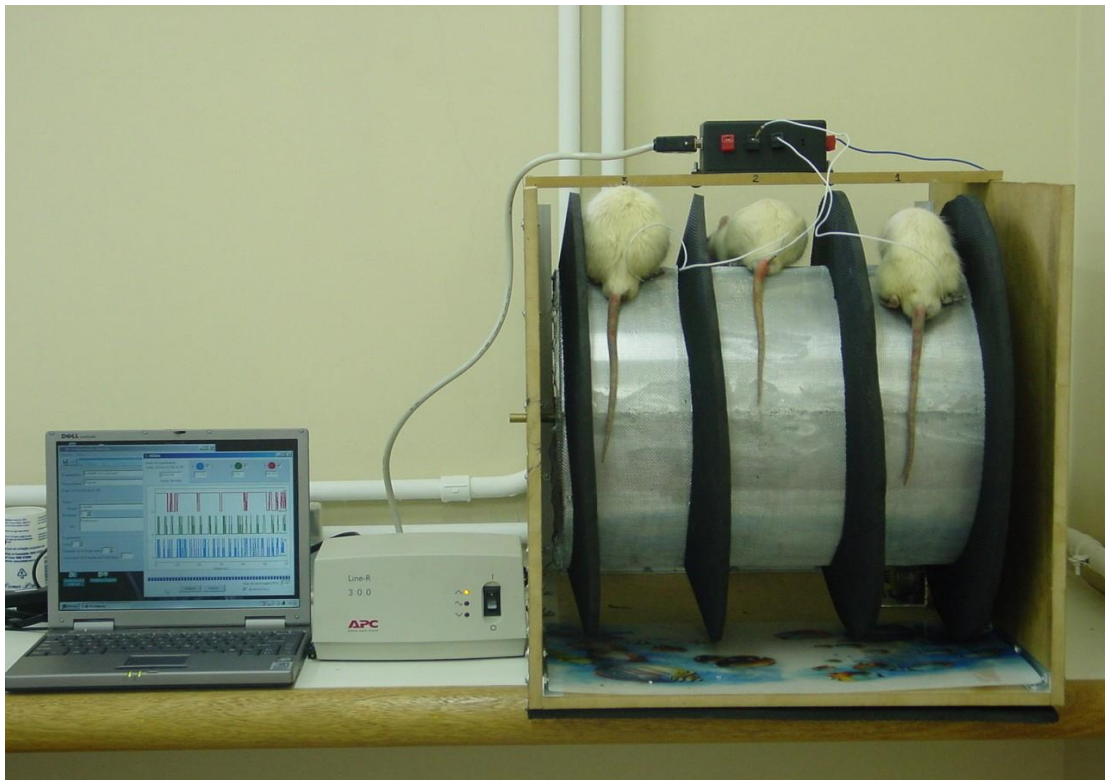
3.8 Mensuração da dor articular

O método de avaliação da incapacitação articular foi descrito anteriormente e usado com algumas modificações (CASTRO, 2006). Os animais foram postos para andar em um cilindro rotatório de metal (30 cm comprimento \times 50 cm diâmetro), que gira a 3 rpm. Sapatilhas de metal especialmente designadas são calçadas em ambas as patas traseiras. Após colocação das sapatilhas, os animais foram postos para andar livremente para se habituar. A sapatilha da pata direita foi conectada através de um circuito simples a um microcomputador para permitir coletar e analisar os dados por um programa desenvolvido no LIO.

O tempo de elevação da pata (PET) significa o tempo em segundos que o animal mantém a pata sem contato com o cilindro, durante um período de avaliação de 10 minutos. A incapacidade articular medida, demonstrado em trabalho publicado anteriormente, é inibida pelo uso de analgésicos clássicos, sugerindo assim expressar dor articular. Para comparação entre os grupos tratados, os resultados são expressos com média do PET medido diariamente, a partir do quarto dia, até o sétimo dia.

Para análise da cinética de mensuração da dor, conforme demonstrado anteriormente em trabalho do nosso grupo (CASTRO, 2006), tomou-se o pico de incapacitação (dor), representado pelo maior valor de PET obtido entre 4 e 7 dias após TLCA. Desprezamos as medidas entre os dias 1 e 3 para reduzir a influência que o trauma cirúrgico provocado pela artrotomia desencadeou na avaliação da dor no modelo. E após o sétimo dia, possivelmente devido ao fato de o animal ser um quadrúpede, o animal se adaptava ao trauma, não havendo mais diferença significativa entre os grupos operado e sham.

Figura 4 – Animais deambulando no sistema para avaliação da incapacitação articular. Ratos Wistar machos, após colocação de sapatilhas metálicas, são postos a deambular sobre um cilindro metálico giratório (3 rpm) por 10 min. O cilindro está conectado a um microcomputador no qual o programa IA – incapacitação articular 1,0 registra o Tempo de Suspensão da Pata (em segundos) para cada animal.



Fonte: dissertação doutorado Rondinele Castro

3.9 Histopatologia

Após fixação em 10% v/v de solução de formaldeído e descálcificação (5% v/v ácido fórmico em 10% v/v solução de formaldeído), as extremidades, distal femoral e proximal tibial (articulação do joelho em bloco), foram processadas por embebição com parafina, depois corada com coloração de hematoxilina-eosina e azul de toluidina. O material foi, então, seccionado em cortes de 5mm no plano sagital a partir da borda externa até a

interna dos c ndilos. A cada décima parte (50 m de distância entre os cortes), uma se o era removida para colora o, com dez partes selecionadas de cada amostra. A análise foi feita de ambos os c ndilos e expressa como um resultado para cada amostra. A gradua o histopatológica foi realizada por dois patologistas independentes (VCCG, MMLP), cegos quanto   aloca o dos grupos. Usou-se o sistema de gradua o e estadiamento histopatológico da Osteoarthritis Research Society International (OARSI), conforme o Quadro 2, que   considerado o padrão ouro para avalia o histológica de dano articular. O escore máximo possível (média das medidas para cada corte) usando o critério OARSI   24 (PRITZKER, 2006). Os resultados foram expressos como valores de mediana (intervalo interquartil - IQR) para cada grupo de tratamento.

Quadro 2 – Sistema OARSI para avaliação da cartilagem OA – grau

Grau (característica principal)	Subgrau	Crítérios associados (reação tecidual)
Grau 0 Superfície e morfologia intactas	Nenhum	Matriz: arquitetura normal Células: intactas, orientação apropriada
Grau 1 Superfície intacta	1,0: células intactas 1,5: necrose	Matriz: zona superficial intacta, edema e/ou fibrilação Células: hipertrofia, proliferação (<i>clusters</i>), perda de polarização. Somente fibrilação superficial.
Grau 2 Descontinuidade superficial	2,0: fibrilação através da zona superficial 2,5: abrasão com perda superficial de matriz	Como acima + descontinuação da zona superficial ± depleção de cloração catiônica (Safranina O ou azul de toluidina) até a zona média ± desorientação dos condrócitos
Grau 3 Fissuras verticais	3,0: fissuras simples 3,5: fissuras angulares ou complexas	Como acima ± depleção de cloração catiônica (Safranina O ou azul de toluidina) até a zona profunda ± neoformação de colágeno (microscopia de luz polarizada, coloração Picro Sirius Red) Células: necrose, proliferação (<i>clusters</i>), especialmente próximo às fissuras
Grau 4 Erosão	4,0: delaminação da zona superficial 4,5: escavação na zona média	Formação cística na matriz da cartilagem
Grau 5 Denudação	5,0: superfície óssea intacta 5,5: presença de fibrocartilagem de reparo	Superfície óssea esclerótica. Microfratura com reparo limitado à superfície óssea.
Grau 6 Deformação	6,0: osteófitos marginais 6,5: osteófitos centrais e marginais	Remodelagem óssea. Deformação do contorno da superfície articular (mais que osteofitose somente) Reparo ósseo estendendo-se acima da superfície prévia

Fonte: PRITZKER, 2006.

Quadro 3 – Sistema OARSI para avaliação da cartilagem OA – estágio

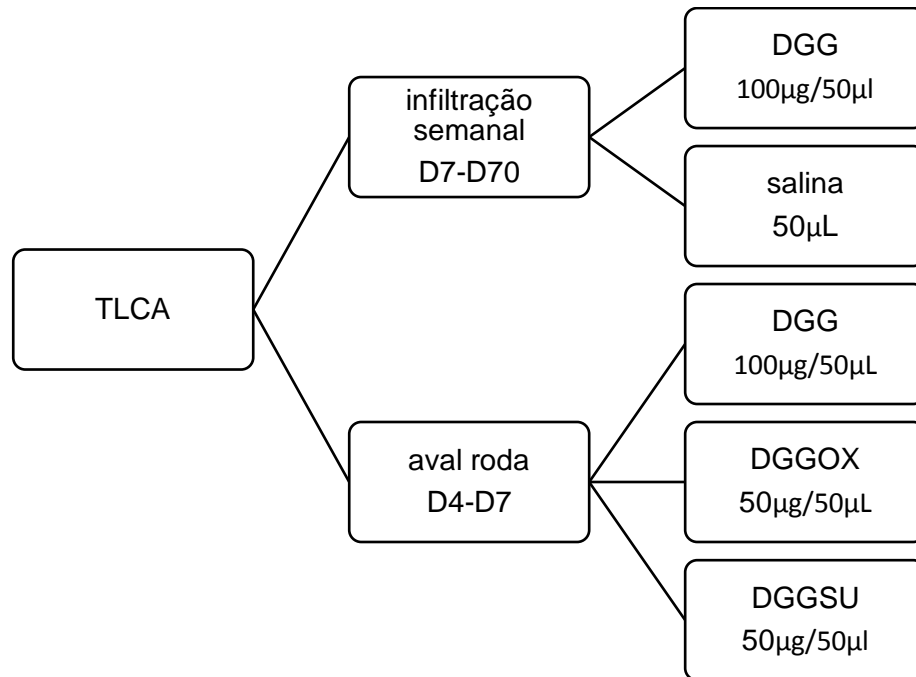
Estágio	Comprometimento superficial
Estágio 0	Sem atividade OA observada
Estágio 1	< 10%
Estágio 2	10-25%
Estágio 3	25%-50%
Estágio 4	>50%

Fonte: PRITZKER, 2006.

3.10 Manipulação farmacológica

O estudo foi conduzido através de duas abordagens. Primeiro, a fim de investigar se a estrutura bioquímica da DGG é relevante na promoção do efeito analgésico obtido pela galactomanana, grupos de seis ratos submetidos à TLCA receberam injeções intra-articulares de 100µg/50µL de solução das substâncias DGG e seus derivados DGGOX e DGGSU, no quarto dia após a realização da cirurgia. O teste da incapacitação articular (sinalizando dor articular) foi medido diariamente, a partir do quarto dia pós-cirúrgico, até o sétimo dia, conforme explicado anteriormente.

Segundo, em outra bateria de experimentos, a fim de avaliar um potencial efeito condroprotetor da galactomanana, que significaria possível benefício estrutural articular, grupos de seis ratos submetidos à TLCA e controle, respectivamente, receberam uma injeção intra-articular de solução de DGG (100µg/50µL) ou salina (50µL), semanalmente, a partir do sétimo dia pós-cirurgia até à décima semana. Ao cabo de dez semanas, os animais foram sacrificados e as articulações dos joelhos operados (extremidade distal do fêmur e proximal da tíbia) foram retiradas para avaliação do conteúdo de GAG, para avaliação bioquímica do dano estrutural à cartilagem articular e avaliação histopatológica da cartilagem, conforme descrito anteriormente.



3.11 Estatística

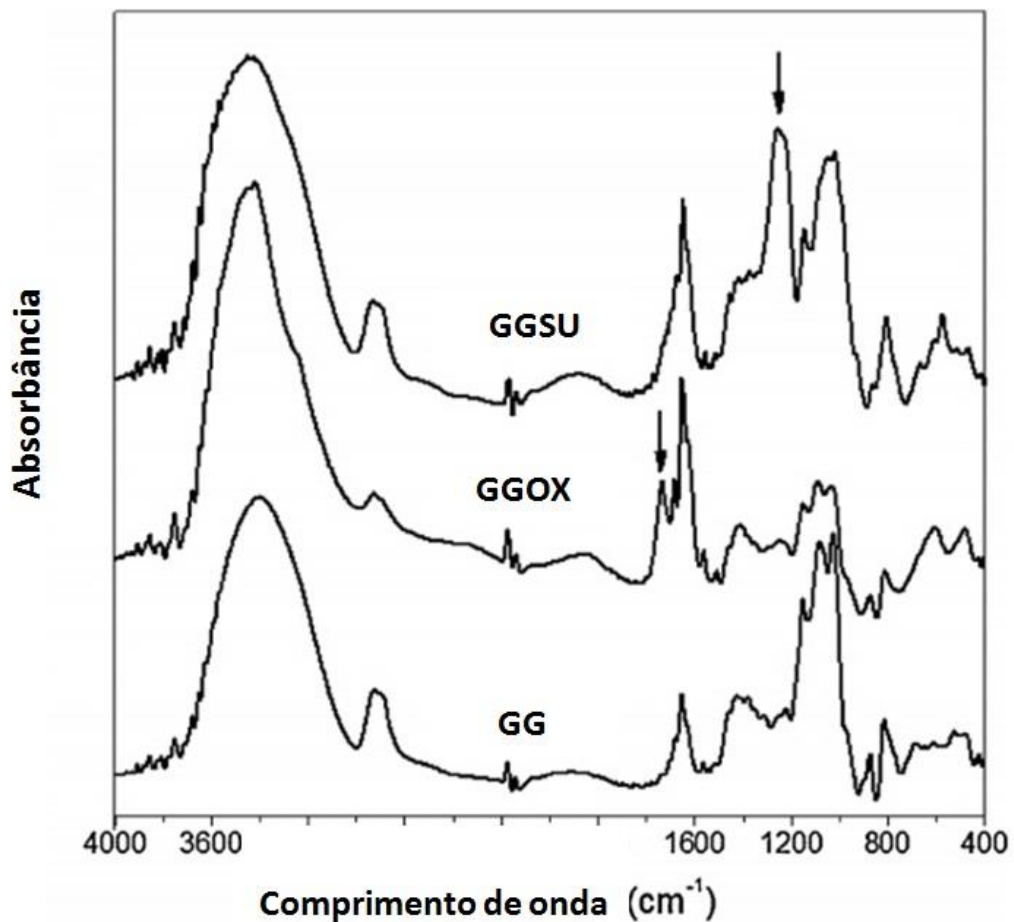
Os resultados são apresentados como média \pm DP (95% de intervalo de confiança) para medida da dor. Avaliação da normalidade dos dados do comportamento doloroso foi feito usando o teste de D'Agostino-Pearson Omnibus. Diferenças entre as médias foram comparadas usando análise de variância univariável (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey; $P < 0,05$ foi considerado significativo.

O escore histológico foi feito em seis animais de cada grupo sendo os dados expressos em mediana (Intervalo interquartil). Para comparação das medianas, o teste Kruskal–Wallis foi usado, seguido pelo teste de Dunn; $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS

Em um dos métodos utilizados para mostrar mudança na molécula dos derivados da DGG, a Espectrofotometria de infra-vermelho FTIR revelou novos picos nos derivados, como ilustrado na figura 5. No composto sulfatado (DGGSU), uma banda nova e intensa apareceu em 1262 cm^{-1} , designando alongamento assimétrico da vibração S=O. Adicionalmente, uma diferença espectral pode ser vista na DGGOX em comparação com DGG não modificada e percebe-se uma banda atribuída à vibração do alongamento para um grupo C=O que está presente no espectro de DGGOX devido à inserção do grupo COOH.

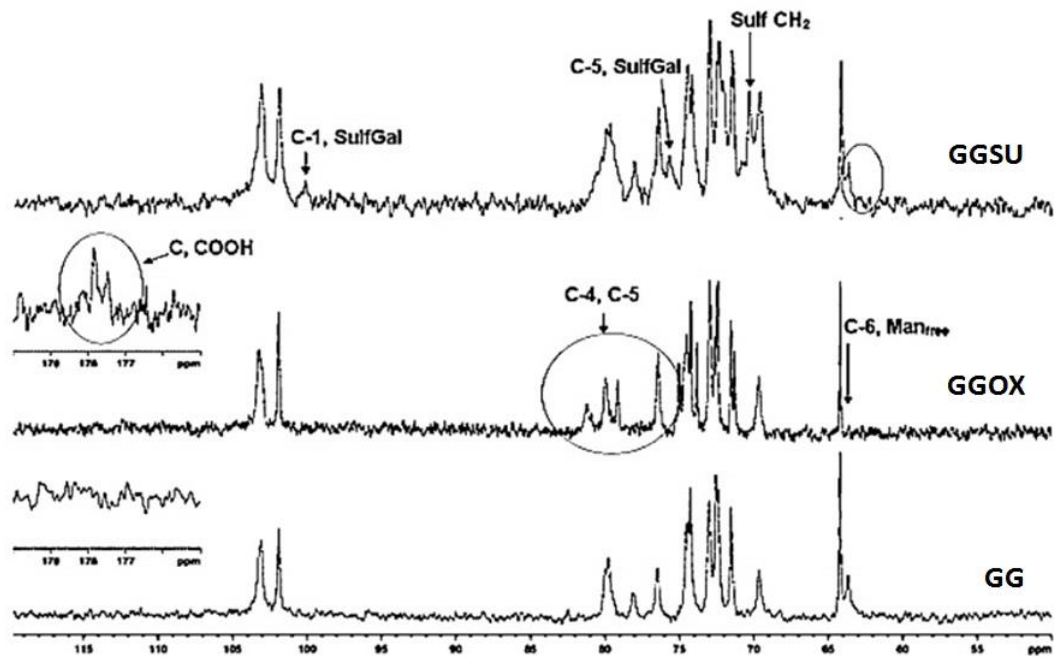
Figura 5 – Espectrofotometria de infra-vermelho (FTIR) da goma guar purificada (DGG) e seus derivados, oxidada (DGGOX) e sulfatada (DGGSU).



Fonte: LABPOL

Os derivados foram analisados por RNM (Fig. 6) a fim de verificar a posição preferencial em que houve sulfatação e oxidação. A comparação entre o espectro da ^{13}C RNM de DGGOX e DGG revelou duas diferenças principais: a ausência de sinal a 63,7 ppm, presente na DGG não modificada, e a presença de dois novos sinais a 177,5 e 177,8 ppm. A ausência de sinal do C-6 da manose livre indica que esse monossacarídeo foi totalmente substituído após a reação de oxidação. Os novos sinais são devido à presença do grupo $\text{C}=\text{O}$ proveniente da COOH .

Figura 6 – Espectro RNM C^{13} da goma guar purificada e seus derivados, oxidada (DGGOX) e sulfatada (DGGSU).

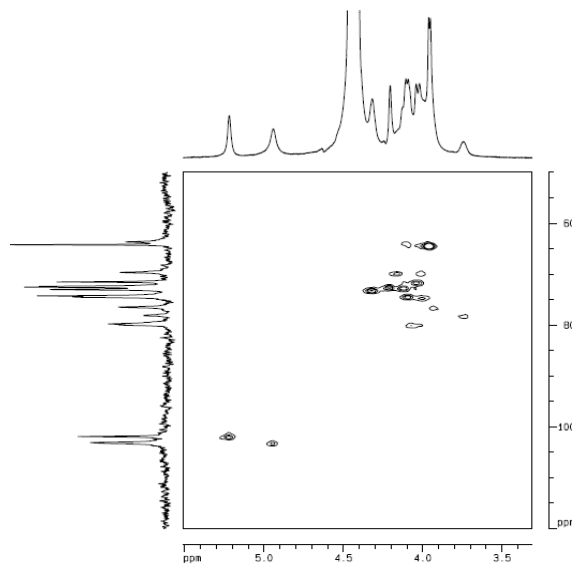


Fonte: LABPOL

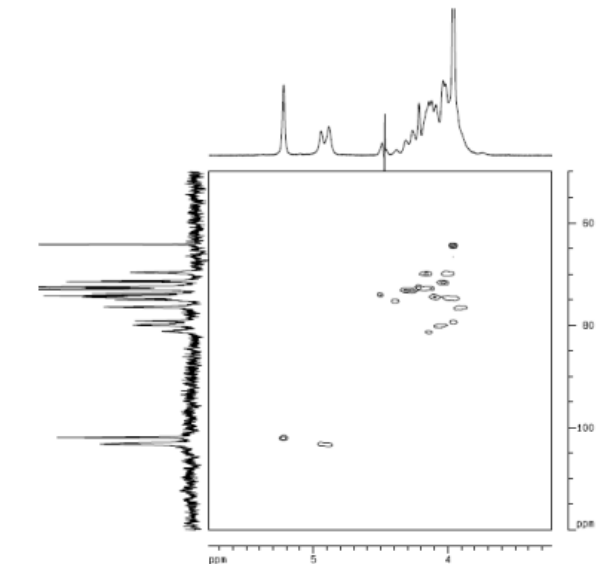
A Ressonância Nuclear Magnética (RNM) foi utilizada para descrever a posição de inserção dos novos radicais, confirmando modificações nas moléculas. O espectro ^1H - ^{13}C HSQC (Fig. 7) exibe um desvio para um valor inferior do δ do próton H-1 do resíduo de manose no DGGOX, o que confirma a substituição do C-6 da manose. Novos sinais a 70,3, 75,6 e 100,5 ppm foram observados no espectro da RNM ^{13}C da goma guar sulfatada. O primeiro é devido à inserção do grupo sulfato no carbono primário. Assim, a RNM bidimensional confirma a substituição do C6 da manose.

Figura 7 – Espectro HSQC de ^1H - ^{13}C obtido para DGG e DGGOX

DGG



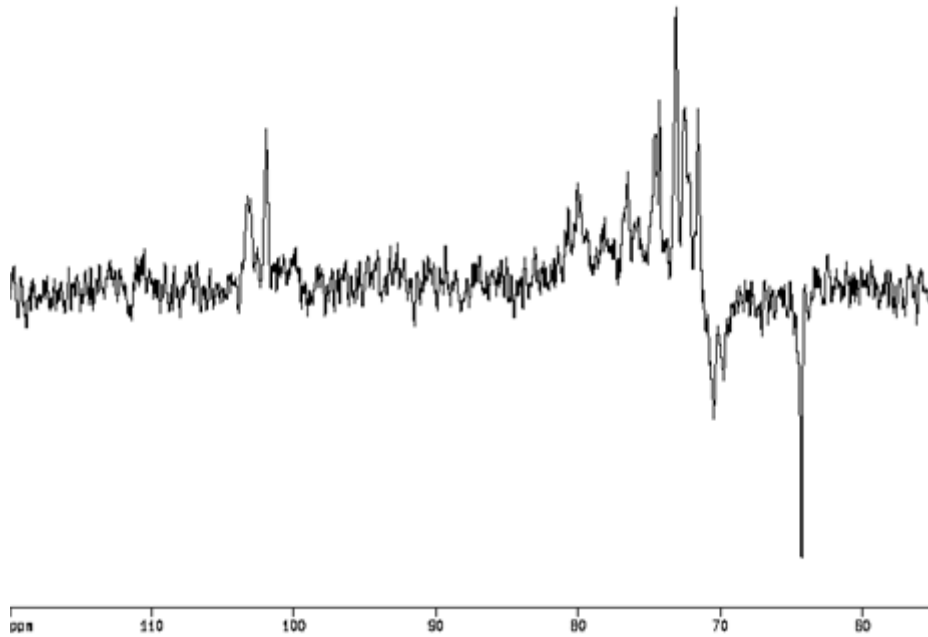
DGGOX



Fonte: LABPOL

Outra ponderação de RNM para confirmar a inserção de um radical CH_2 . A prova de que este novo sinal é atribuído ao novo CH_2 inserido foi obtida a partir da análise em DEPT^{135} (Fig 8). Os sinais de CH_2 aparecem em amplitude oposta àqueles de CH e CH_3 . Os sinais a 75,6 e 100,5 ppm são atribuídos a C-5 e C-1 da galactose sulfatada, desviada do δ original.

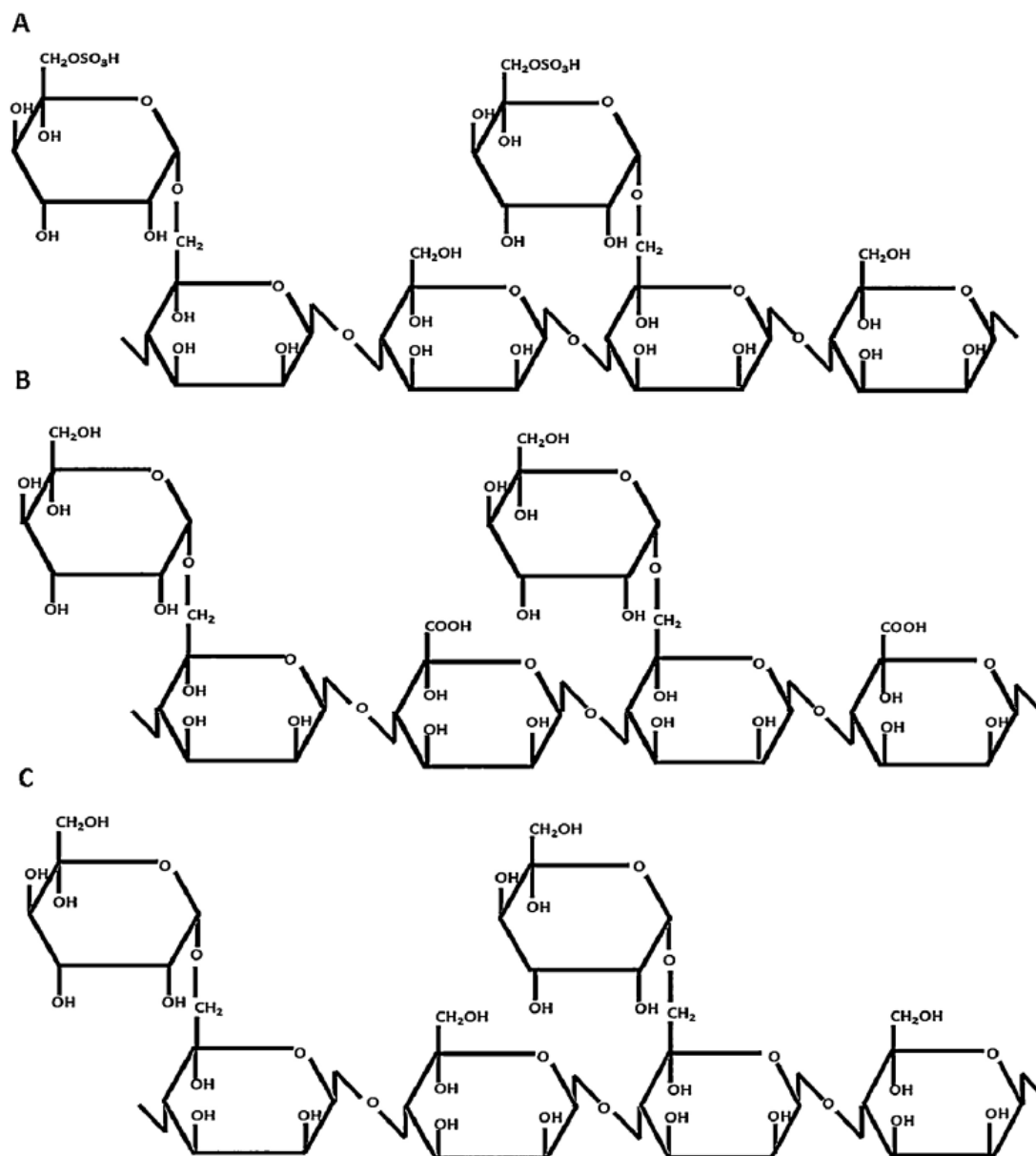
Figura 8 – Espectro DEPT^{135} da DGG sulfatada



Fonte: LABPOL

Demonstração final das moléculas modificadas (DGGOX e DGGSU) comparadas à original DGG. A sulfatação ocorreu preferencialmente no carbono 6 do resíduo da galactose da galactomanana original, enquanto a oxidação ocorreu preferencialmente no carbono 6 do resíduo da manose, como demonstrado abaixo na figura 9.

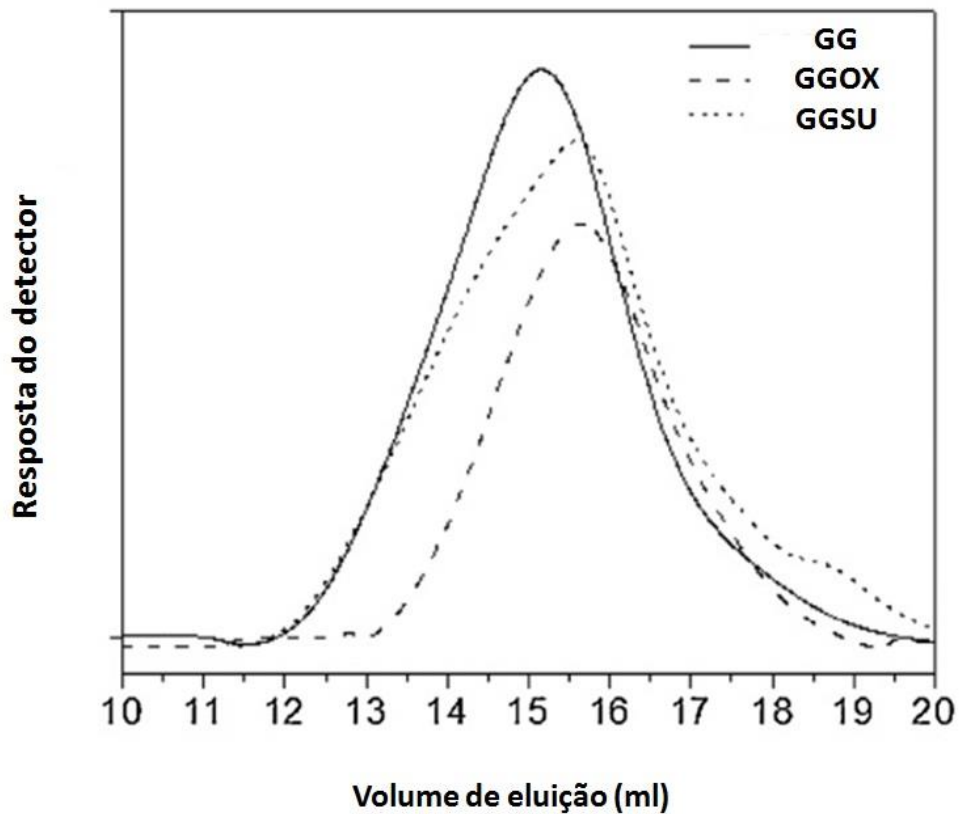
Figura 9 – Estrutura química da goma guar purificada (DGG: C) e seus derivados: oxidada (DGGOX: B) e sulfatada (DGGSU: A).



Fonte: LABPOL

Cálculo da massa molar, através de Cromatografia em Gel de Permeação (GPC). As curvas do gel de permeação, mostradas na figura 10, indicam degradação da cadeia nas amostras oxidada e sulfatada. A goma guar mostra uma distribuição monomodal no volume de eluição de 7,6 mL. O derivado oxidado também mostra uma distribuição monomodal, mas com uma eluição desviada para um volume mais alto de 7,8 mL. Uma massa molar menor é obtida para DGGOX. O perfil da curva de DGGSU é diferente. Um pico principal ocorre a 7,8 mL, mas dois ombros podem ser visualizados a 7,4 e 9,4 mL. A distribuição da massa molar é mais heterogênea, com uma baixa fração de material não sulfatado e uma outra fração com uma cadeia de intensa degradação (9,4 mL).

Figura 10 – Cromatografia das curvas do gel de permeação da goma guar purificada e seus derivados, oxidada (DGGOX) e sulfatada (DGGSU).



Fonte: LABPOL

A tabela 1 mostra o nível de substituição (DS), definido como a fração do monossacarídeo modificado pelo total de unidades.

A DGGOX apresentou a menor viscosidade intrínseca 2,2 dL/g e aparente 9,0 mPas. A DGG não modificada exibiu a maior viscosidade ($\eta = 6,2$ dL/g e $\eta_{app} = 58$ mPas). Valores intermediários foram obtidos para a DGGSU ($\eta = 4,9$ dL/g e $\eta_{app} = 39$ mPas), conforme demonstrado abaixo.

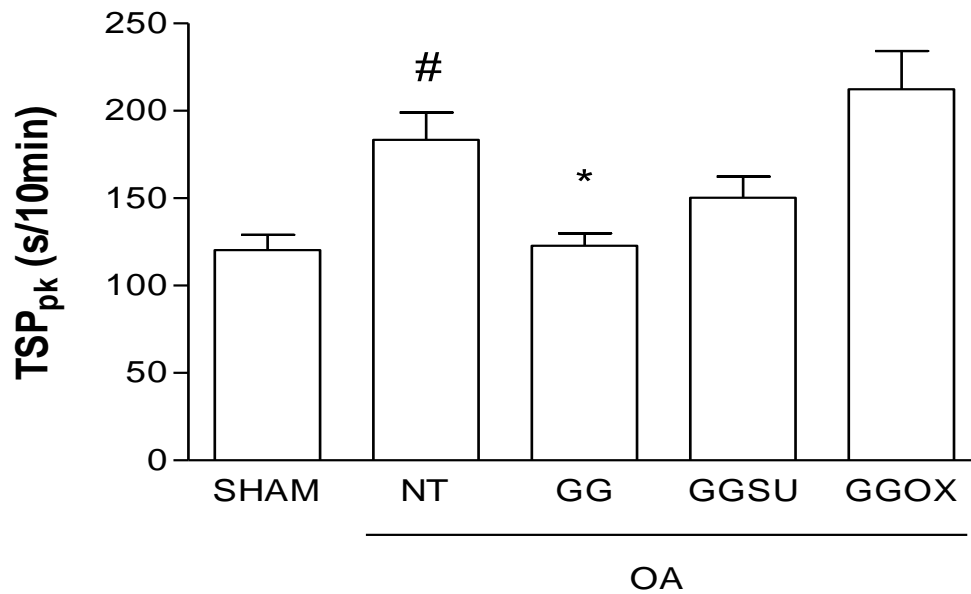
Tabela 1 – Características químicas da goma guar purificada original (DGG) e seus derivados, oxidada (DGGOX) e sulfatada (DGGSU).

Características	DGG Purificada	DGGSU	DGGOX
Grupo inserido	–	-OSO ₃ Na	-COOH
Nível de substituição	0,00	0,60	0,36
Posição da inserção	–	C6 galactose	C6 manose
Viscosidade intrínseca (dL/g) ³	6,2	4,9	2,2
Peso médio da massa molar (g/mol)	3,9x10 ⁵	2,8x10 ⁶	2,6x10 ⁶
Viscosidade aparente (mPas) ^b	58	39	9

Fonte: LIO

As modificações estruturais na solução da goma guar revertem sua atividade analgésica, como ilustrado abaixo.

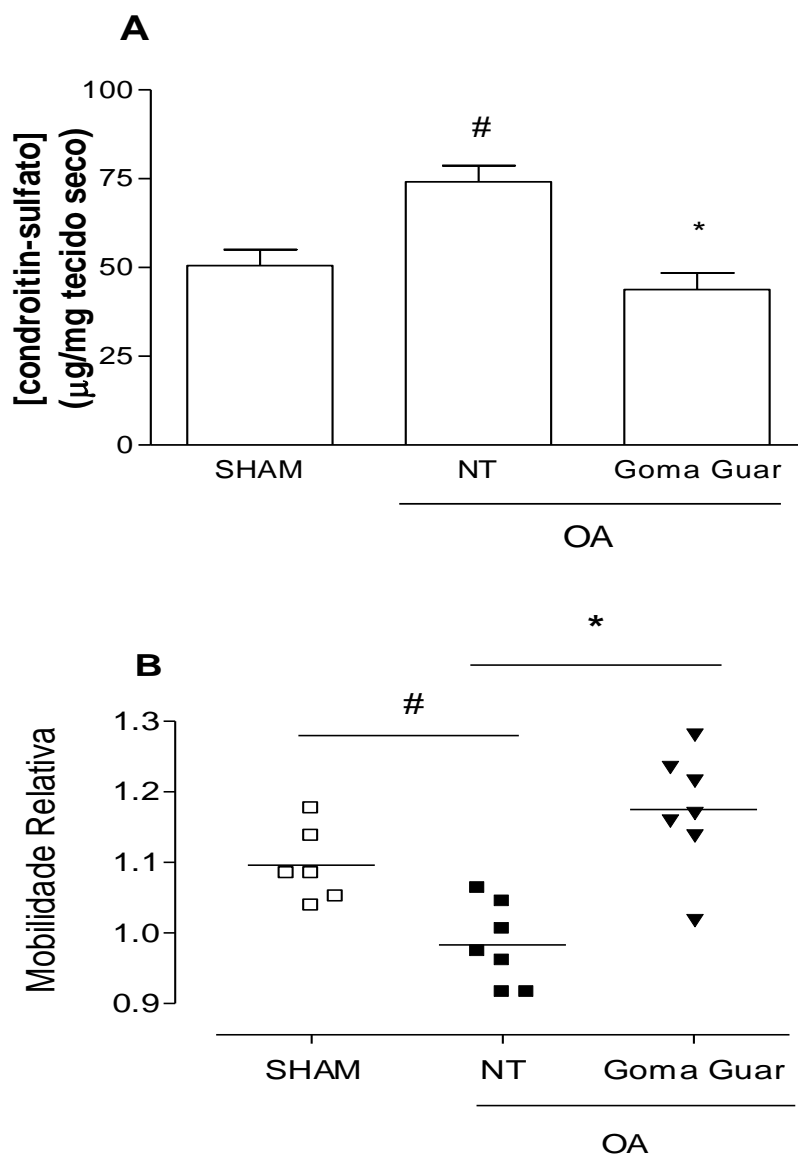
Figura 11 – Efeito terapêutico local de preparações quimicamente modificadas de goma guar sobre a dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. 100 µg de goma guar inalterada, sulfatada ou oxidada foram administradas intra-articular no quarto dia após a TLCA. Grupo OA não-tratado (NT) recebeu veículo (salina i. art.). O pico de dor (TSP_{pk}) foi determinado por avaliações diárias entre o quarto e o sétimo dias. Dados expressos como média ± e. p. m. de 6 animais por grupo. *p<0,01 vs OA-NT; #p<0,01 vs SHAM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).



Fonte: LIO

Amostras de cartilagem de ratos submetidos a TLCA apresentaram um aumento do conteúdo de GAG, bem como mobilidade eletroforética diminuída, quando comparados aos animais falso operados.

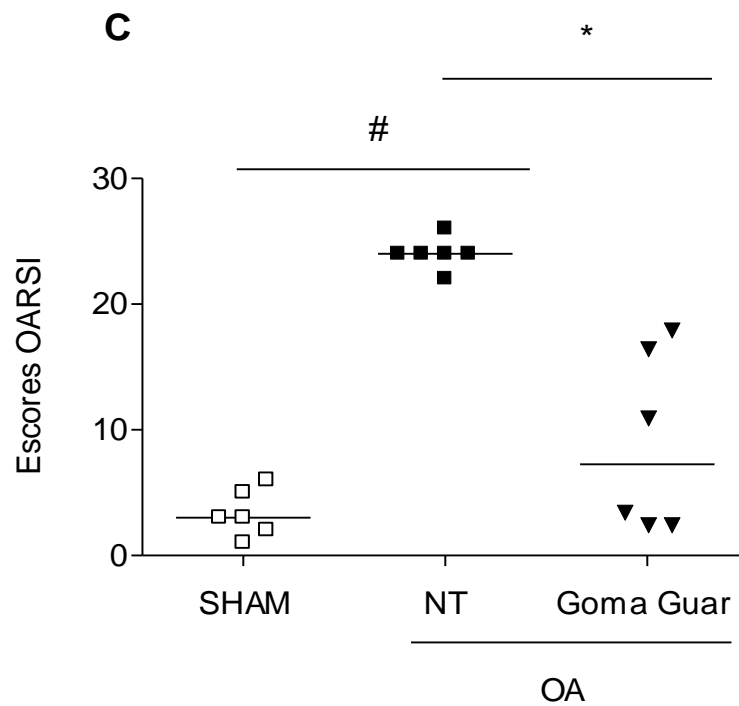
Figura 12 – Tratamento terapêutico intra-articular com goma guar previne alterações do condroitin-sulfato da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. 100 µg (i.art.) de goma guar foram administrados semanalmente, iniciando no 14º após a TLCA, até o 63º dia, totalizando oito injeções. Grupos OA não-tratado (NT) e SHAM receberam veículo (salina i. art.). Os animais foram sacrificados no 70º dia. (A) Efeito sobre a elevação tecidual do CS. Dados expressos como média ± e. p. m. de 6 animais por grupo. (B) Efeito sobre a redução da mobilidade relativa em gel de poliacrilamida. A linha horizontal representa a média dos dados individuais. * $p < 0,001$ vs OA-NT; # $p < 0,05$ vs SHAM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).



Fonte: LIO

A administração semanal da solução de galactomanana impediu lesão na histopatologia, de acordo com os escores obtidos, tanto na extremidade femoral, quanto na tibial dos ratos submetidos à TLCA.

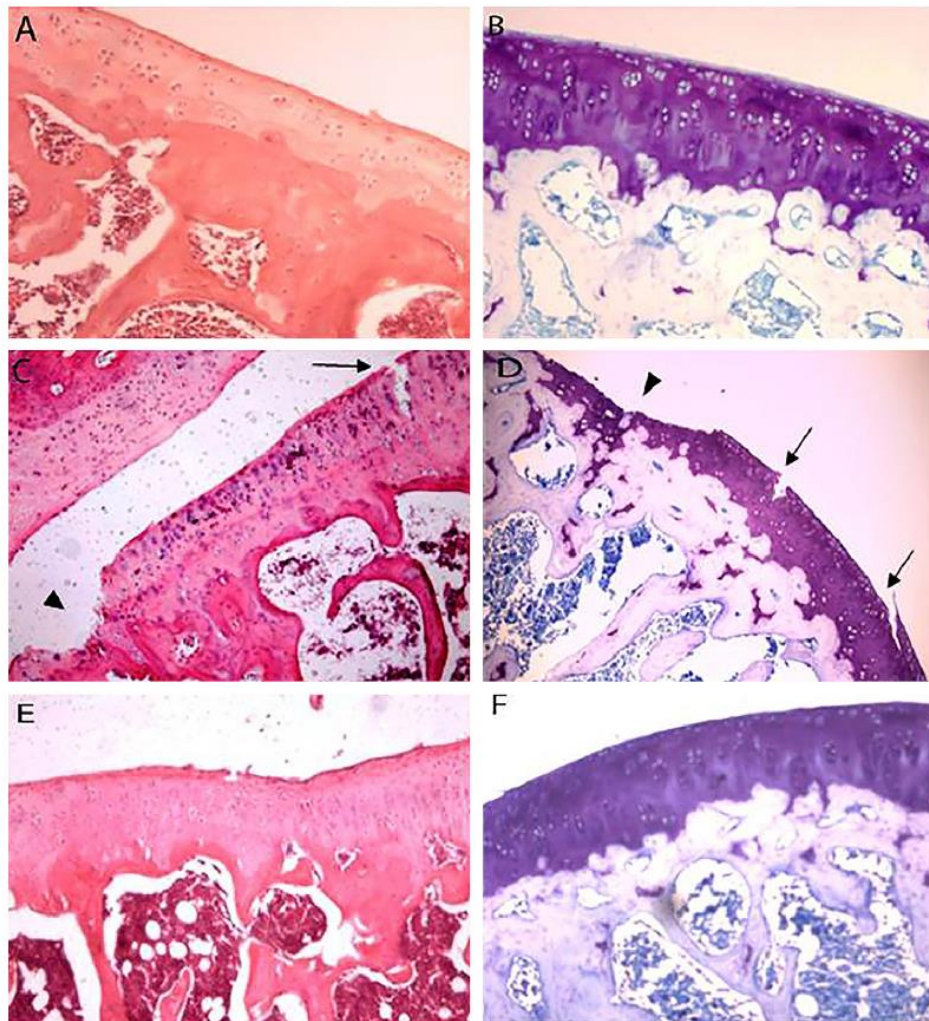
Figura 13 – Efeito terapêutico intra-articular da goma guar sobre as alterações histopatológicas na osteoartrite induzida por TLCA em ratos. 100 µg (i.art.) de goma guar foram administrados semanalmente, iniciando no 14º após a TLCA, até o 63º dia, no total de oito injeções. Grupos OA não-tratado (NT) e SHAM receberam veículo (salina i. art.). Os animais foram sacrificados no 70º dia. O dano estrutural foi avaliado segundo critérios recomendados pela OARSI (PRITZKER *et al.*, 2006). A linha horizontal representa a mediana dos valores obtidos. * $p < 0,05$ vs OA-NT; # $p < 0,05$ vs SHAM (teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunns).



Fonte: LIO

As imagens das figuras 14 a e b são representativas de colorações por hematoxilina-eosina e azul de toluidina, respectivamente, de animais falso-operados (sham). As figuras 14 c e d são representativas de colorações hematoxilina-eosina e azul de toluidina, respectivamente, dos animais submetidos à TLCA e tratados com salina. As figuras 14 e e f são representativas das colorações hematoxilina-eosina e azul de toluidina, respectivamente, dos animais submetidos à TLCA e tratados com DGG de amostras coletadas após o sacrifício dos animais ao septuagésimo dia da cirurgia.

Figura 14 – Ilustração dos cortes das lâminas coradas com H-E (à esquerda) e azul de toluidina (à direita) com magnificação 40x, de joelho de ratos submetidos à transecção do ligamento cruzado anterior, após sacrifício ao septuagésimo dia de acompanhamento. A/B sham, C/D TLCA + salina, E/F TLCA + DGG. As cabeças de seta e as setas ilustram áreas de desnudação e fissura da cartilagem, que inexistem no grupo sham. Percebe-se também preservação da cartilagem, com homogeneidade de coloração e ausência de áreas de erosão, no grupo tratado com DGG.



Fonte: LIO

5 DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou, pela primeira vez, que modificações estruturais dos derivados da goma guar, embora não alterem significativamente a massa molar, sejam cruciais na determinação da analgesia e condroproteção obtida com sua viscosuplementação.

A primeira parte do trabalho foi conduzida a fim de se comprovar as modificações estruturais desencadeadas após sulfatação e oxidação de uma solução de goma guar modificada.

O aparecimento de novos picos na técnica de FITR demonstra que houve mudança significativa na composição química das novas moléculas. Quando se associam as técnicas de RNM em diferentes ponderações houve comprovação de que os processos de sulfatação e oxidação promoveram alteração na estrutura química das moléculas, produzindo novos compostos.

A prova de que este novo sinal é atribuído ao novo CH₂ inserido foi obtida a partir da análise em DEPT¹³⁵ (Fig 8). Os sinais de CH₂ aparecem em amplitude oposta àqueles de CH e CH₃. Os sinais a 75,6 e 100,5 ppm são atribuídos a C-5 e C-1 da galactose sulfatada, desviada do δ original.

Quanto à posição dos novos radicais inseridos pode-se dizer que a sulfatação ocorreu preferencialmente no carbono 6 do resíduo da galactose da galactomanana original, enquanto a oxidação ocorreu preferencialmente no carbono 6 do resíduo da manose, como demonstrado na figura 9.

Uma limitação para o cálculo da massa molar foi a ausência de parâmetros de comparação, considerando que essas eram substâncias produzidas pela primeira vez. Devido à carga iônica dos derivados e à indisponibilidade de padrões adequados a massa molar não pode ser quantificada por esse tipo de detector GPC. Assim, o peso médio da massa molar (Mw) foi calculado pelo experimento de dispersão da luz, baseado nos gráficos Zimm, a fim de determinar mais outros parâmetros na descrição das novas substâncias obtida com a sulfatação e oxidação da goma guar purificada. Todos os derivados mostraram menor massa molar que a goma guar original. A DGG purificada apresentou Mw de $3,9 \times 10^5$ g/mol, enquanto DGGOX e DGGSU apresentaram $2,6 \times 10^6$ e $2,8 \times 10^6$ g/mol, respectivamente. A massa molar discretamente maior da DGGSU, em comparação com DGGOX, pode ser devido à presença da fração do baixo volume de eluição e da influência da cadeia de alta dimensão sobre a massa molar.

O DS foi determinado por microanálise elementar para DGGSU e por titulação para DGGOX. O porcentual de Sulfatação (S) aumentou de zero (DGG não modificada) para 9,79% para DGGSU. Baseado no fato de que os principais constituintes da galactomanana são hexoses, o DS foi considerado como o número de grupos de $-\text{OSO}_3\text{Na}$ por grupos de 6 carbonos. A partir dos dados do conteúdo de S e C, usando a Equação: $\text{DS} = (\text{S\% massa atômica de S}) / (\text{C\% massa atômica de C} \times 6) = 2,25 (\text{S\%} / \text{C\%})$ (MELO, 2002), foi calculado o valor de DS de 0.60. O nível de substituição para DGGOX foi de 0,36, próximo ao valor obtido para a oxidação da galactomanana de *Leucaema leucocephala* em condições similares (SIERAKOWSKI, 2000).

As viscosidades intrínseca e aparente também foram determinadas e seus valores apresentados na tabela 1. A DGGOX apresentou a menor viscosidade intrínseca 2,2 dL/g e aparente 9,0 mPas. A DGG não modificada exibiu a maior viscosidade ($\eta = 6,2$ dL/g e $\eta_{\text{app}} = 58$ mPas). Valores intermediários foram obtidos para a DGGSU ($\eta = 4,9$ dL/g e $\eta_{\text{app}} = 39$ mPas), conforme tabela 1.

As modificações estruturais na solução da goma guar revertem sua atividade analgésica, como ilustrado na figura 11. Como relatado anteriormente, a administração intra-articular da solução de DGG (100 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$) em dose única no quarto dia após TLCA diminuiu significativamente a dor articular, quando comparado aos animais que receberam salina (grupo NT). A administração intra-articular das soluções tanto de DGGOX como de DGGSU não promoveu analgesia, como ocorreu com a DGG, sendo revertido significativamente o efeito analgésico que havia sido obtido com a solução original de DGG, sugerindo que a integridade estrutural do polissacarídeo é crucial para seu efeito antinociceptivo. Deve-se ressaltar que a massa molar dos compostos, bem como a viscosidade intrínseca, não foi significativamente alterada após a sulfatação e a oxidação da galactomanana. Esses aspectos reforçam a ideia que as propriedades reológicas do polissacarídeo de goma guar desproteinado (DGG) não devem ser responsáveis por sua atividade analgésica. Associado com o relato prévio de que a inibição da dor articular pela infiltração com a galactomanana ocorre no modelo de OA, a despeito de sua formulação em gel ou solução aquosa (CASTRO, 2006). Esse trabalho corrobora nossa proposta de que a estrutura farmacológica é mais relevante que o mecanismo reológico para a resposta analgésica.

Não é do nosso conhecimento de que tenham sido feitas modificações similares na estrutura de agentes de viscosuplementação comercialmente disponíveis. Nas preparações de ácido hialurônico, advoga-se que seja sua característica reológica a responsável pelos efeitos benéficos obtidos pelos pacientes em tratamento de OA. Aparentemente, preparações de AH

de alto peso molecular aumentariam a viscoelasticidade do líquido sinovial, melhorando, assim, a lubrificação articular. No entanto, estudos *in vitro* são usados para apoiar essa teoria, o que pode não refletir o que ocorre após a injeção intra-articular. Considerando o fato de que os pacientes submetidos a viscosuplementação obtêm alívio de dor sustentado, por vezes, durante meses, é razoável supor que uma atividade farmacológica, para além de possível efeito reológico, seja responsável pelo efeito analgésico observado com os agentes de viscosuplementação. Outra discussão que se abre aqui também é relacionada ao efeito esperado da viscosuplementação. Um recente estudo *in vivo* com coelhos mostrou que a viscoelasticidade do líquido sinovial em animais que receberam salina ou preparações de ácido hialurônico de alto ou baixo peso molecular foi semelhante. Entretanto, somente as preparações de alto peso molecular haviam conferido condroproteção (ELMORSY, 2014). O fato de as preparações de goma guar serem solúveis em água e que suas propriedades reológicas difiram daquelas preparações de AH, que são viscosas, nos leva a crer que a estrutura molecular esteja envolvida nos mecanismos de sua atividade biológica após a administração intra-articular desse polissacarídeo em pacientes com OA, ao passo que sua viscosidade intrínseca pode não ser relevante. Dessa forma, admitindo-se que há controvérsia se a viscosuplementação é superior a placebo, parece-nos razoável supor que o benefício clínico obtido não seja, pelo menos não completamente, explicado por variação nas massas molares dos compostos.

Os glicosaminoglicanos (GAG) extraídos da cartilagem dos animais submetidos ao modelo de OA através da TLCA apresentaram alterações qualitativas, demonstradas a partir de um aumento da massa molar e diminuição da mobilidade eletroforética, quando comparados aos animais do grupo sham (Fig 12). Tais alterações foram associadas à lesão articular observada também na histologia (CASTRO, 2006).

Na análise das curvas de GPC, o pico da curva representa a tendência central da distribuição da massa molar. A mobilidade relativa (DIETRICH & DIETRICH, 1972) foi obtida pela razão entre o início da migração da amostra e o início da migração do padrão C4S ($MM = 4,55 \times 10^4$ g/mol), que foi arbitrariamente definida como 1.0. A massa molar (MM) pode ser estimada como inversamente relacionada à mobilidade relativa da amostra. Como comparativo C6S ($MM = 5,88 \times 10^4$ g/mol), que tem massa molar maior que C4S, foi avaliado sob as mesmas condições e apresentou mobilidade relativa de 0.70.

No presente estudo, a administração da solução de DGG originalmente purificada reverteu significativamente tanto o aumento do conteúdo de GAG, quanto a alteração da mobilidade eletroforética do GAG extraído das cartilagens femoral e tibial, quando

comparado com os animais que receberam salina (Fig. 12 a–b), sugerindo, assim, um efeito condroprotetor da goma. O aumento no conteúdo de GAG na cartilagem das amostras dos animais submetidos à OA foi relatado anteriormente (SILVA, 2009), assim como em outros estudos (HOSSEININIA, 2013). Tem sido proposto que esse aumento representa uma resposta anabólica precoce à lesão existente, que parece ser revertido à medida que a lesão articular progride, levando a um estágio catabólico e destruição progressiva da cartilagem articular. A administração da solução de DGG evitou o dano articular aos animais submetidos à TLCA, aparentemente interferindo no andamento desse processo. A reversão das alterações bioquímicas da cartilagem articular, representada pela queda no conteúdo de CS e restauração da mobilidade relativa foi associada a uma pronunciada inibição do dano estrutural histológico. Portanto, para além da analgesia obtida com a infiltração da solução da goma guar, houve também um efeito de proteção do dano articular.

A administração semanal da solução de galactomanana impediu lesão na histopatologia, de acordo com os escores obtidos, tanto na extremidade femoral, quanto na tibial dos ratos submetidos à TLCA. A figura 13 ilustra esses resultados, mostrando que os escores histopatológicos são maiores no grupo que recebeu salina i.art. (NT), quando comparados com o Sham ($*p < 0.05$), ao passo que no grupo que recebeu DGG i.art. houve redução dos escores, de forma estatisticamente significativa. A administração de DGG purificada, usando a mesma concentração ($100\mu\text{g}/50\mu\text{L}$) que foi analgésica, inibiu significativamente o agravamento da extensão do dano na cartilagem articular visto na histopatologia, quando comparado aos animais que receberam salina. O sistema de escores histológicos utilizados foram os da OARSI, que representam o padrão ouro para avaliação de dano articular em modelos experimentais de OA.

Quanto à histologia, houve lesão do osso subcondral com fissuras e desnudação da cartilagem na amostra do grupo submetido à TLCA que recebeu salina i.art. (NT), enquanto no grupo que recebeu DGG há uma preservação da cartilagem subjacente. Tais achados quando acrescidos ao fato de que houve restauração das características bioquímicas dos GAG da cartilagem demonstra um claro efeito condroprotetor nos animais que foram tratados com o polissacarídeo da goma guar purificada.

O fato de não termos avaliado o efeito de doses repetidas intra-articulares de DGG purificada na dor articular representa uma limitação na execução do trabalho, pois poderia definir o papel da dose única da viscosuplementação da DGG. Entretanto, a dificuldade de injeção e o fato da avaliação ter ocorrido na primeira semana após a cirurgia impossibilitaram avaliar o efeito de doses repetidas. Entretanto, na análise do dano estrutural, tivemos

oportunidade de avaliar o efeito de injeções repetidas semanalmente, demonstrando um claro efeito condroprotetor. Não era do escopo desse projeto fazer estudo de farmacocinética da DGG no modelo de OA, razão pela qual optamos por uma estratégia de tratamento com o fim de demonstrar o efeito condroprotetor. Essa é uma etapa necessária ao desenvolvimento do composto com vista a sua utilização clínica.

Uma outra limitação do presente estudo seria a não comparação com uma modificação química de produto comercialmente disponível. Apesar disso, considerando que a estrutura do polissacarídeo é aventada como sendo o ingrediente ativo em todos os agentes viscosuplementadores comercialmente disponíveis, é razoável supor que sua integridade estrutural seja fundamental para eficácia clínica.

Podemos reiterar que esse é o primeiro estudo que demonstra que modificações estruturais, além de alteração na massa molar, sejam cruciais na determinação da analgesia obtida a partir da viscosuplementação. Os mecanismos de ação da viscosuplementação ainda estão por ser completamente elucidados e consideramos que nossos resultados lançam luz sob aspectos até aqui não avaliados.

6 CONCLUSÃO

O polissacarídeo purificado de goma guar promove analgesia e condroproteção em um modelo de OA experimental. Esses efeitos dependem da estrutura da molécula e não parecem estar associados às suas propriedades reológicas.

REFERÊNCIAS

- NEOGI, T.; ZHANG, Y. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.21, n.9, p.1145-1153, sept 2013.
<http://www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis.html>. Acesso em: 26/09/2016
- BERENBAUM, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis). *Osteoarthritis and Cartilage*, v.21, n.1, p16–21, Jan 2013.
- BERENBAUM, F.; VAN DEN BERG, W.B. Inflammation in osteoarthritis: changing views. *Osteoarthritis Cartilage*, v.23, n.11, p.1823-4, Nov 2015.
- HOCHBERG, M.C.; YERGES-ARMSTRONG, L.; YAU, M.; MITCHELL, B.D. Genetic epidemiology of osteoarthritis: recent developments and future directions. *Curr Opin Rheumatol*, v. 25, n.2, p.192–7, mar 2013.
- PETERSSON, I.F.; BOEGÅRD, T.; SAXNE, T.; SILMAN, A.J.; SVENSSON, B. Radiographic osteoarthritis of the knee classified by the Ahlbäck and Kellgren & Lawrence systems for the tibiofemoral joint in people aged 35–54 years with chronic knee pain. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.56, n.8, p.493–496, Aug 1997.
- TAKAHASHI, M.; NAITO, K.; ABE, M.; SAWADA, T.; NAGANO, A. Relationship between radiographic grading of osteoarthritis and the biochemical markers for arthritis in knee osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, v.6, n. 3, p.208–212, Mar 2004.
- MCALINDON, T.E.; BANNURU, R.R.; SULLIVAN, M.C.; ARDEN, N.K.; BERENBAUM, F.; BIERMA-ZEINSTRAS, S.M.; HAWKER, G.A.; HENROTIN, Y.; HUNTER, D.J.; KAWAGUCHI, H.; KWOK, K.; LOHMANDER, S.; RANNOU, F.; ROOS, E.M.; Underwood, M. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.22, n.3, p. 363–388, Mar 2014.
- BRUYÈRE, O.; COOPER, C.; PELLETIER, J.P.; BRANCO, J.; LUISA BRANDI, M.; GUILLEMIN, F.; HOCHBERG, M.C.; KANIS, J.A.; KVIEN, T.K.; MARTEL-PELLETIER, J.; RIZZOLI, R.; SILVERMAN, S.; REGINSTER, J.Y. An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: a report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Seminars in Arthritis Rheumatism*, v. 44, n.3, p. 253–263, Dez 2014.
- HOCHBERG, M.C.; ALTMAN, R.D.; APRIL, K.T.; BENKHALTI, M.; GUYATT, G.; MCGOWAN, J.; TOWHEED, T.; WELCH, V.; WELLS, G.; TUGWELL, P. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip and knee. *Arthritis Care Research*, v.64, n.4, p.465–474, Apr 2012.
- VAN DER KRAAN, P.M.; BERENBAUM, F.; BLANCO, F.J.; COSIMO, DE B.; LAFEBER, F.; HAUGE, E.; HIGGINBOTTOM, A.; IOAN-FACSINAY, A.; LOUGHLIN, J.; MEULENBELT, I.; MOILANEN, E.; PITSILLIDOU, I.; TSEZOU, A.; VAN MEURS, J.; VINCENT, T.; WITTOEK, R.; LORIES, R. Translation of clinical problems in osteoarthritis into pathophysiological research goals. *RMD Open*, v.2, n.1, May 2016.

GOLDRING, M.B.; BERENBAUM, F. **Emerging targets in osteoarthritis therapy.** *Curr Opin Pharmacol.*, v.22, p.51-63, Jun 2015.

MAHEU, E.; RANNOU, F.; REGINSTER, J.Y. Efficacy and safety of hyaluronic acid in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v.45, 4S, p.28–33, 2016.

CASTRO RR, FEITOSA JP, DA CUNHA PL, DA ROCHA FA. Analgesic activity of a polysaccharide in experimental osteoarthritis in rats. *Clin Rheumatol*, v.26, n.8, p1398, Aug 2007.

HUNTER, D.J. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee. *The New England Journal of Medicine*, v.372, p. 1040–1047, 2015.

JEVSEVAR, D.; DONNELLY, P.; BROWN, G.A.; CUMMINS, D.S. Viscosupplementation for Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of the Evidence. *J Bone Joint Surg Am*, v.97, n.24, p.2047-60, Dec 2015.

BANNURU, R.R.; SCHMID, C.H.; KENT, D.M.; VAYSBROT, E.E.; WONG, J.B.; MCALINDON, T.E. Comparative effectiveness of pharmacologic interventions for knee osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, 162(1), p.46–54, 2015.

PASQUALI RONCHETTI, I., GUERRA, D., TAPARELLI, F., BORALDI, F., BERGAMINI, G., ZIZZI, F., ET AL. Morphological analysis of knee synovial membrane biopsies from a randomized controlled clinical study comparing the effects of sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate (Depomedrol) in osteoarthritis. *Rheumatology*, v. 40, p.158–169, 2001.

KIRWAN, J. Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee? *Knee*, v.8, p. 93–101, 2001.

FELSON, D.T. The sources of pain in knee osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, v.17, n.5, p.624-8, Sep 2005.

KLEIN-WIERINGA, I.R. Inflammatory Cells in Patients with Endstage Knee Osteoarthritis: A Comparison between the Synovium and the Infrapatellar Fat Pad. *J Rheumatol*, v.43, n.4, p.771-8. Apr 2016.

WENHAM, C.Y.J; CONAGHAN, P.G. The Role of Synovitis in Osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, v.2, n.6, p 349–359, Dez 2010.

MARTEL-PELLETIER, J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, v.12, Suppl A, p.31-3, 2004.

BONDESON, J. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, v.8, n.6. p.187, 2006.

- WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, A.L.; SZUKIEWICZ, D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**, 561459, Apr 2014.
- SAITO, I, KOSHINO, T.; NAKASHIMA, K.; UESUGI, M.; SAITO, T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n.2, p.156-62, Feb 2002.
- BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H.J. Articular cartilage I. Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. **Instr Course Lect**, v.47, p. 477-86, 1998.
- MARTEL-PELLETIER, J.; BOILEAU, C.; PELLETIER, J.P.; ROUGHLEY, P.J. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 22, n.2, p.351-84, Apr 2008.
- ESPANHA, M.M. Articular cartilage: structure and histochemical composition. **Acta Reumatol Port**, v. 35, n.5, p424-33, Oct-Dec 2010.
- HEINEGÅRD, D. Proteoglycans and more from molecules to biology. **Int. J. Exp. Pathol**, v. 90, n.6, p. 575–586, Dez 2009.
- BERNFELD, M.; GÖTTE, M.; PARK, P.W.; REIZES, O.; FITZGERALD, M.L.; LINCECUM, J.; ZAKO, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **Annu Rev Biochem**, v. 68, p.729-77, 1999.
- MÜLLER, C.; KHABUT, A.; DUDHIA, J.; REINHOLT, F.P.; ASPBERG, A.; HEINEGÅRD, D.; ÖNNERFJORD, P. Quantitative proteomics at different depths in human articular cartilage reveals unique patterns of protein distribution. **Matrix Biol**, v.40, p.34-45, Nov 2014.
- BAYLISS, M. T.; VENN, M.; MAROUDAS, A.; ALI, S.Y. Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage. **Biochem J**, v. 209, n.2, p.387-400, Feb 1983.
- TAYLOR, K.R.; GALLO, R.L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. **FASEB J**, v. 20, n.1, p.9-22, Jan 2006.
- SÄÄMÄNEN, A.M.; TAMMI, M.; KIVIRANTA, I.; JURVELIN, J.; HELMINEN, H.J. Levels of chondroitin-6-sulfate and nonaggregating proteoglycans at articular cartilage contact sites in the knees of young dogs subjected to moderate running exercise. **Arthritis Rheum**, v.32, n.10, p.1282-92, Oct 1989.
- CUNHA, P.L.; PAULA, R.C.; FEITOSA, J.P. Purification of guar gum for biological application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p.324–331, 2007.
- CASTRO, R.R.; FEITOSA, J.P.; DA CUNHA, P.L.; DA ROCHA, F.A. Analgesic activity of a polysaccharide in experimental osteoarthritis in rats. **Clin Rheumatol**, v. 26, n.8, p.1398, Aug 2007.

MADRY, H. OCHI, M. CUCCHIARINI, M.; PAPE, D.; SEIL, R. Large animal models in experimental knee sports surgery: focus on clinical translation. **J Exp Orthop**, v.2, n.9, Dec 2015.

LITTLE, C.B.; ZAKI, S. What constitutes an "animal model of osteoarthritis"--the need for consensus? **Osteoarthritis Cartilage**, v. 20, n.4, p. 261-7, Apr 2012.

STOOP, R.; BUMA, P.; VAN DER KRAAN, P.M.; HOLLANDER, A.P.; BILLINGHURST, R.C.; MEIJERS, T.H.; POOLE, AR.; VAN DEN BERG, W.B. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transaction in rats. **Osteoarthritis Cartilage**, v.9: p. 308–315, 2001.

CASTRO, R.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, F.S.; JR, ROCHA, F.A. **Osteoarthritis Cartilage**, A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis--evidence of a role for nitric oxide, v.14. n.8, p.769-76, Aug 2006.

CUNHA, P.L.R.; CASTRO, R.R.; ROCHA, F.A.C.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Low viscosity hydrogel of guar gum: preparation and physicochemical characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.37, p. 99–104, 2005.

MOURA NETO, E.; MACIEL, J.S.; CUNHA, P.L.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n.10, p. 1953–1960, 2011.

MOURA NETO, E.; SOMBRA, V.G.; RICHTER, A.R.; ABREU, C.M.; MACIEL, J.S.; CUNHA, P.L.; ONO, L.; SIERAKOWSKI, M.R.; FEITOSA, J.P.; DE PAULA, R.C. Chemically sulfated galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* seed: characterization and toxicity evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.1013–1017, 2014.

SIERAKOWSKI, M.R.; MILAS, M.; DESBRIÈRES, J.; & RINAUDO, M. Specific modifications of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p. 51–57, 2000.

CUNHA, P.L.R.; MACIEL, J.S.; SIERAKOWSKI, M.R.; DE PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.1, p. 85–92, 2007.

AZERO, E.G.; ANDRADE, C.T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**, v.21, p. 551–556, 2002.

MELO, M.R.S.; FEITOSA, J.P.A.; FREITAS, A.L.P.; DE PAULA, R.C.M. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p. 491–498, 2002.

DIETRICH, C.P.; DIETRICH, S.M. Simple micro method for identification of heparin and other acidific mucopolysaccharides from mammalian tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 46, p. 209–218, 1972. <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>. Acesso em: 2004

PRITZKER, K.P.; 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. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, p.13–29, 2006.

ELMORSY, S.; FUNAKOSHI, T.; SASAZAWA, F.; TODANO, M.; TADANO, S.; IWASAKI, N. Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, n.1, p.121–127, 2014.

SILVA, F. S., JR., YOSHINARI, N. H., CASTRO, R. R., GIRÃO, V. C., POMPEU, M. M., FEITOSA, J. P., ET AL. Combined glucosamine and chondroitin sulfate provides functional and structural benefit in the anterior cruciate ligament transection model. **Clinical Rheumatology**, v. 28, n.2, p 109–117, 2009.

HOSSEININIA, S.; LINDBERG, L.R.; DAHLBERG, L.E. 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.9, p.14–18, 2013.

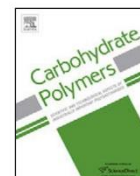
ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO

Carbohydrate Polymers 150 (2016) 392–399



Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Structural characteristics are crucial to the benefits of guar gum in experimental osteoarthritis



Rondinelle R. Castro^a, Christine Maria M. Silva^b, Rodolfo M. Nunes^b, Pablyana L.R. Cunha^c, Regina Celia M. de Paula^c, Judith P.A. Feitosa^c, Virgínia C.C. Girão^d, Margarida M.L. Pompeu^e, José Alberto D. Leite^f, Francisco A.C. Rocha^{b,*}

^a Superior Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará, Fortaleza 60714-903, Brazil

^b Department of Internal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-170, Brazil

^c Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza 60451-970, Brazil

^d Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-170, Brazil

^e Department of Pathology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza 60441-750, Brazil

^f Department of Surgery, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-170, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2016

Received in revised form 1 May 2016

Accepted 11 May 2016

Available online 13 May 2016

Chemical compounds studied in this article:

Galactomannan (PUBCHEM CID: 439336)

Chonsurid (PUBCHEM CID: 24766)

Keywords:

Guar gum

Osteoarthritis

Oxidation

Pain

Sulfation

ABSTRACT

Protein-free guar gum (DGG) was oxidized (DGGOX) or sulfated (DGGSU) by insertion of new groups in C-6 (mannose) and C-6 (galactose), for DGGOX and DGGSU, respectively. Rats were subjected to anterior cruciate ligament transection (ACLT) of the knee, joint pain recorded using the articular incapacitation test, and the analgesic effect of intraarticular 100 μ g DGG, DGGOX or DGGSU solutions at days 4–7 was evaluated. Other groups received DGG or saline weekly, from days 7 to 70 and joint damage assessed using histology and biochemistry as the chondroitin sulfate (CS) content of cartilage. The molar mass of CS samples was obtained by comparing their relative electrophoretic mobility to standard CS. DGG but not DGGOX or DGGSU significantly inhibited joint pain. DGG significantly reversed the increase in CS, its reduced electrophoretic mobility, and histological changes following ACLT, as compared to vehicle. Structural integrity accounts for DGG benefits in experimental osteoarthritis.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a leading cause of disability and chronic pain with increasing prevalence and costs to health care systems. The recognition that inflammatory cells play a major role in OA pathogenesis has led to the concept of an important immunomediated inflammatory component in OA pathogenesis (Berenbaum, 2013). OA treatment still relies on attempts to provide symptom improvement whereas chondroprotective compounds, meaning treatments to alter OA progression and/or outcome, are an unmet need (McAlindon et al., 2014).

Viscosupplementation has been proposed as a term to indicate the recovery of the viscoelastic properties of the synovial

fluid after the administration of high molar mass hyaluronic acid solutions or its analogues (Hunter, 2015). Despite a persistent debate on the clinical efficacy of viscosupplementation, current OA treatment guidelines recommend this strategy, particularly to treat patients with knee OA (Bruyère et al., 2014; Hochberg et al., 2012; McAlindon et al., 2014). Systematic reviews and meta-analysis of data on viscosupplementation efficacy are controversial probably because of different selection of articles and a lack of standardization of patient selection and evaluation (Hunter, 2015).

The mechanisms responsible for the viscosupplementation efficacy are yet to be demonstrated. Though some claim that the higher the molar mass of the agent, coupled to the gel state, the better the results, there are no definitive data to prove this assumption (Bannuru et al., 2015). Indeed, high molar mass hylans (around 10^6 g/mol) had similar efficacy, as compared to lower mass compounds ($5\text{--}7.5 \times 10^5$ g/mol) in providing pain relief in OA (Pasquali Ronchetti et al., 2001). The sustained clinical relief

* Corresponding author.

E-mail address: arocha@ufc.br (F.A.C. Rocha).

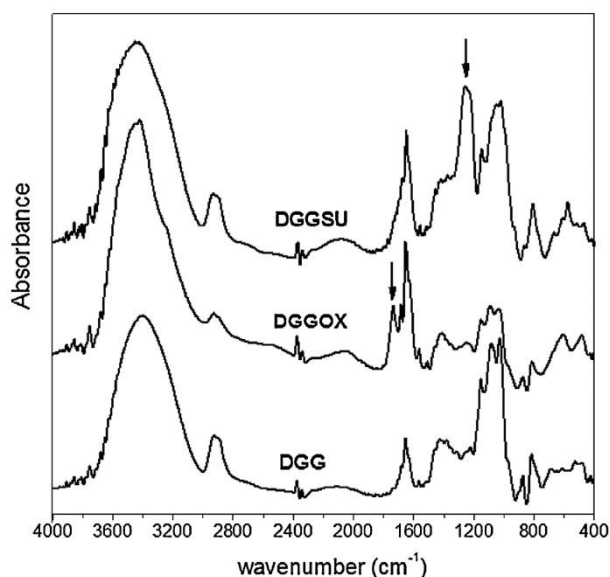


Fig 1. FTIR spectrum of deproteinized guar gum (DGG), oxidized (DGGOX), and sulfated (DGGSU) derivatives.

that may be achieved after a set of 3–5 injections or even a single injection of these compounds may last for up to 8–12 months (Kirwan, 2001) argues against a local rheological effect to explain the therapeutic mechanism. Considering that endogenous hyaluronic acid clearance from the joint fluid is estimated at 20 h and in OA joint this clearance time is even less (Hunter, 2015), the possibility that exogenously administered hyaluronates last less than 1 day in the joint is very likely. Furthermore, the issue of whether viscosupplementation agents display a chondroprotective effect in OA is also yet to be defined.

Guar gum is a highly viscous polysaccharide derived from the seed endosperm of the plant *Cyamopsis tetragonolobus*. It is predominantly composed of a galactomannan with a long central chain of manose residues, joined by type β -(1 \rightarrow 4) glycosidic links and residues of galactose joined by type α -(1 \rightarrow 6) links attached to the sides of the mannan central core. This gum was purified by four different methods in order to reduce the impurities, especially protein residues (Cunha, Maciel, Sierakowski, de Paula, & Feitosa, 2007).

Using an experimental OA model in rats, we demonstrated that the intraarticular (i.a.) injection of the purified DGG, meaning a protein-free guar gum derivative, provided analgesia similar to that of Hylan G-F20, a commercially available viscosupplementation agent (Castro et al., 2006). Additionally, the galactomannan provided analgesia when it was given as a viscous or saline solution. That viscous preparation presents a viscosity similar to that of Hylan G-F 20, 110 and 120 Pa s, respectively, but the viscosity of the galactomannan solution was only 3.6 Pa s, at the same shear rate and temperature (Cunha, Castro, Rocha, de Paula, & Feitosa, 2005). Thus, we proposed that viscosupplementation does not depend only on the viscoelastic properties of the compound. Rather, it could derive from a local pharmacological effect yet to be described.

In the present study, through derivatization of the DGG (oxidation or sulfation) we provide further evidence that the biochemical structure, rather than the viscosity, accounts to explain the clinical effects of this polysaccharide in experimental OA. Additionally, the data show that i.a. administration of a DGG solution prevents joint damage in an OA model.

2. Experimental

2.1. Materials

2.1.1. Chemical materials

Guar gum was supplied by Sigma-Aldrich Brasil Ltda. and subjected to purification, as follows: The gum was purified free of protein (DGG), according to the physical and Fehling procedures, described elsewhere, with a mannose/galactose ratio of 1.61 (Cunha et al., 2005). Chlorosulfonic acid and TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) were supplied by Sigma Corporation. Chondroitin 4-sulfate (C4S), chondroitin 6-sulfate (C6S), and heparan sulfate were purchased from Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

2.1.2. Animals

Male Wistar rats (180–200 g) from our own animal facilities were used throughout the experiments. Animals were housed in cages (6/cage) in temperature-controlled rooms with a 12 h light/dark cycle with free access to water and food. At the start of any experiments, rats were 2.5 months of age. All efforts were made to minimize animal suffering and the number of animals used. The experimental protocol was approved by our local ethics committee (protocol number 113/07) that followed the guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

2.2. Methods

2.2.1. Sulfation of guar gum

The protein-free DGG was sulfated using methodology earlier reported by Moura Neto, Maciel, Cunha, de Paula, and Feitosa (2011) and recently used for sulfation of a galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* (Moura Neto et al., 2014). Some modifications were performed, as follows: a mass of 3 g of DGG was dissolved in 225 mL of formamide overnight, followed by the addition of 60 mL pyridine. The solution was cooled to 4 °C and 18 mL of chlorosulfonic acid (CSA) was dropped over a period of 3 h. The proportion SR/SU (molar ratio of sulfation reagent to sugar unit) was maintained in 14.6. After 12 h at 13 °C, the solution was neutralized with NaHCO₃, dialyzed against water, the solid precipitated, washed many times with ethanol, and filtered. The dry product was denoted as DGGSU.

2.2.2. Oxidation of guar gum

The protein-free DGG was oxidized following the method reported by Sierakowski, Milas, Desbrières, and Rinaudo (2000) and Cunha et al. (2007), as follows: a mass of DGG (2 g) was dissolved in 1 L distilled water under stirring overnight. The solution was cooled in an ice bath, sodium hypochlorite (9 mL) was added, and pH adjusted to 9.2. TEMPO reagent (18.4 mg) and NaBr (160 mg) were added. The oxidation proceeded at constant pH, adjusted with NaOH. Borohydride (50 mL) was included to stop the reaction. The pH was decreased to 7, the gum precipitated with EtOH, and after 12 h in refrigerator, filtered, and washed with EtOH. DGGOX is the designation of the product.

2.2.3. Characterization of guar gum derivatives

The derivatives were characterized by FT-IR, NMR, rheology, and static light scattering. The percentage of nitrogen and sulfur was determined by elemental microanalysis in a Carlo Erba EA 1108 micro analyzer and the N% related to protein content through the conversion factor of 5.87 (Azero & Andrade, 2002). The degree of sulfation was calculated from the equation proposed by Melo, Feitosa, Freitas, and de Paula (2002). The degree of oxidation was determined by potentiometer titration with NaOH 0.1 mol/L. The FT-IR spectra were recorded in solid state using KBr pellet with a

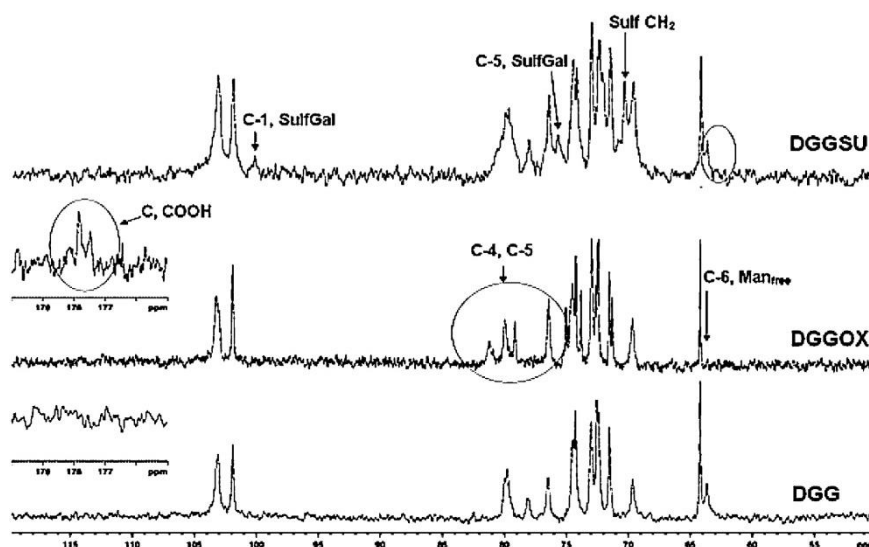


Fig. 2. ^{13}C NMR spectrum of deproteinated guar gum (DGG), oxidized (DGGOX), and sulfated (DGGSU) derivatives.

Shimadzu model IR Prestige 21 spectrophotometer between 400 and 4000 cm^{-1} . The position of the introduced groups was defined using Nuclear Magnetic Resonance analysis, with uni (RMN ^1H , RMN ^{13}C and DEPT 135) or bidimensional techniques (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, ^1H - ^{13}C HMQC). The gums were dissolved in deuterated water for 12 h and analyzed in a Bruker model Avance-DMX-500 spectrometer.

The static light scattering measurements were performed in a multi angle photometer from Malls Dawn Wyatt Technology Corporation, working with a He-Ne laser (632.8 nm). The gums concentrations varied from 3.0×10^{-4} to $1.15 \times 10^{-3}\text{ g/mL}$ in NaNO_3 0.1 mol/L , used after filtration through 0.2 and $0.45\text{ }\mu\text{m}$ Millipore membranes.

The apparent viscosity was determined in 1% (w/v) aqueous solutions at shear rate 200 s^{-1} , and temperature $25\text{ }^\circ\text{C}$, by the use of a Rheometer Brookfield cone-plate model LV-DVIII. The intrinsic viscosity ($[\eta]$) was calculated from flow time of solutions in a capillary Ubbelohde viscometer from Cannon Instruments model 1 I-71. The solvent used was 0.1 mol/L NaCl , and the temperature was controlled at $25\text{ }^\circ\text{C}$. Huggins plot was applied for the $[\eta]$ determination.

The molar mass distribution was estimated by gel permeation chromatography in a Shimadzu equipment and refractive index detector (RID-6A). An ultrahydrogel linear column ($7.8 \times 300\text{ mm}$, Exclusion limit $7.0 \times 10^6\text{ g mol}^{-1}$, WatersTM Corporation), 0.1 mol/L NaNO_3 as solvent, flow at 0.5 mL/min , and ambient temperature were the experimental conditions for GPC analysis.

2.2.4. Analysis of glycosaminoglycans from the articular cartilage

The cartilage of the distal femoral extremities was excised with a surgical blade immediately after sacrifice of animals and weighed after overnight drying ($80\text{ }^\circ\text{C}$). The material was subjected to proteolysis using PROLAV 750TM (Prozyn, SP, Brazil) suspended in Tris-HCl/NaCl $50\text{ mmol/L}/150\text{ mmol/L}$ buffer (pH 8.0), and further precipitated in absolute ethanol, followed by dilution in distilled water. This material was separated on a 0.6% w/v agarose gel-electrophoresis in diaminopropaneacetate buffer (50 mmol/L , pH 9.0). Gels were stained with 0.1% w/v toluidine-blue (Bezerra et al., 2004). For comparison, standard C4S, C6S, and heparan sulfate were subjected to the same protocol. Quantification was made by densitometry (525 nm). Data were expressed as $\mu\text{g CS/mg}$ dried cartilage.

2.2.5. Anterior cruciate ligament transection (ACL) model

Rats were anesthetized with i.m. ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After preparing for local aseptic surgery, a parapatellar incision was made, followed by lateral displacement of the patella, thereby providing access to the joint space. The anterior cruciate ligament is then easily visible and was surgically excised trying to avoid damage to the underlying cartilage and meniscus. The increase in anterior displacement of the tibia in relation to the femur was used to assure that the ligament was transected. The joint capsule and skin were sutured with Vycril ($6-0$) and mononylon ($4-0$) threads, respectively. A sham group was subjected to skin incision, patella displacement, and exposure of the joint without damage to the ligaments, followed by wound closure. A naive group received no manipulation.

2.2.6. Measurement of joint pain

The articular incapacitation method, as described earlier, was used with modifications (Castro et al., 2006). The animals were put to walk on a steel rotary drum ($30\text{ cm wide} \times 50\text{ cm diameter}$), which rotates at 3 rpm . Specially designed metal gaiters were wrapped around both hind paws. After placement of the gaiters, the animals were allowed to walk freely for habituation. The right paw was then connected via a simple circuit to a microcomputer data input/output port. The paw elevation time (PET), as recorded in the present study, is the time in seconds that during a 10-min period the hind paw is not in contact with the cylinder. The articular incapacitation measured is inhibited by classical analgesic compounds leading to the assumption that it reflects joint pain. For comparison between treated groups, results are reported as the mean of the PET obtained daily, starting at day 4, until day 7.

2.2.7. Histopathology

After fixation in 10% v/v formaldehyde solution and decalcification (5% v/v formic acid in 10% v/v formaldehyde solution), the whole joint, comprising the distal femoral and proximal tibial extremities, was processed for paraffin-embedding and staining with hematoxylin-eosin and safranin-O. The material was serially sectioned at $5\text{ }\mu\text{m}$ in the sagittal plane of the articular surface, from the outer to the inner limits of the condyles. At every tenth section ($50\text{ }\mu\text{m}$ apart), one section was removed for staining, with ten different sections for each sample. Analysis was done

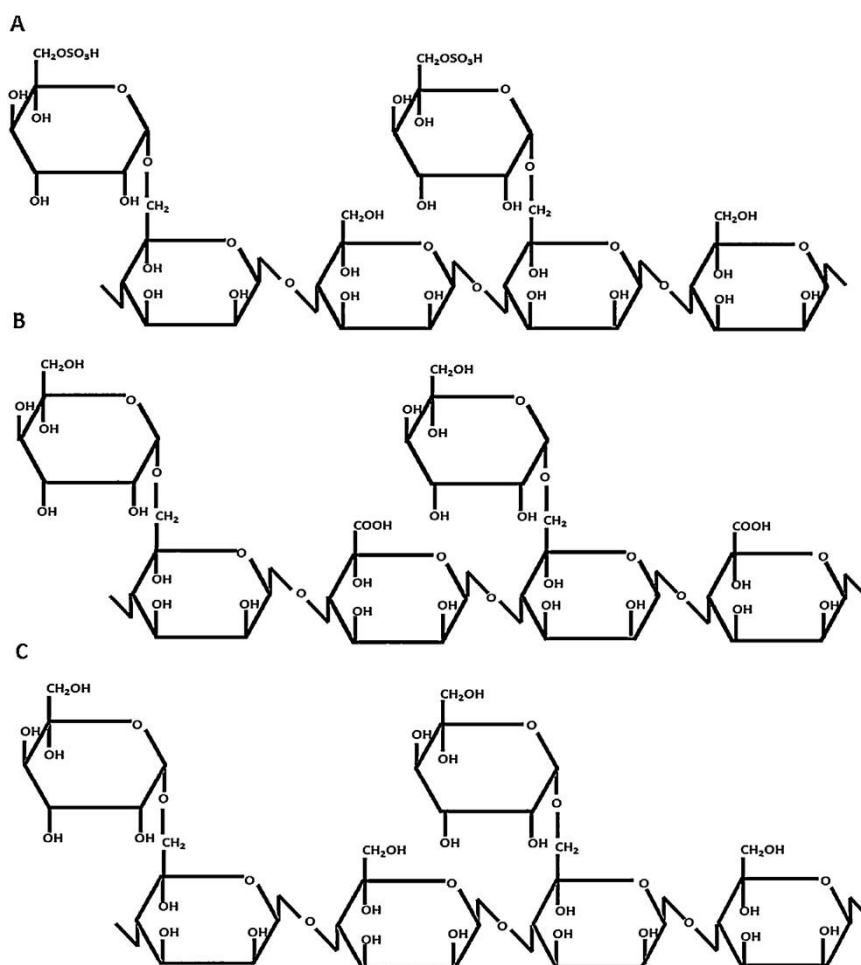


Fig. 3. Chemical structures of deproteinated guar gum (DGG), oxidized (DGGOX), and sulfated (DGGSU) derivatives.

for both condyles and expressed as one result for each sample. Semi-quantitative histopathological grading was performed by two independent pathologists (VCCG, MMLP) blinded to group allocation according to the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) histopathology grading and staging system (Pritzker et al., 2006). The maximal possible final score (mean of measures made by the two pathologists) was 24. Results are expressed as the median (interquartile range - IQR) values for each treatment group.

2.2.8. Pharmacological manipulation

In order to investigate whether the biochemical structure is relevant to the analgesic effect provided by the galactomannan, groups of rats subjected to ACLT received intra-articular (i.a.) injections of 100 μg in 50 μL saline solutions of either DGG, DGGSU or DGGOX derivatives, at day 4 following ACLT. The articular incapacitation, as reflecting joint pain, was measured daily, until day 7. In another set of experiments, in an attempt to evaluate a potential chondroprotective effect of the galactomannan, meaning a potential joint structural benefit, groups of rats received either DGG solution (100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ i.a.) or saline once a week, starting at day 7, during 10 weeks.

2.2.9. Statistics

Results are presented as the means +95% CI for pain measurements and medians (IQR) for histology made on six animals in

each group. Assessment of normality of the pain behaviour data was done using the D'Agostino-Pearson Omnibus test. Differences between means were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test; $P < 0.05$ was considered as significant. For comparison of medians, the Kruskal-Wallis test was used, followed by Dunn's test; $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of protein free guar gum and derivatives

The FT-IR spectra (Fig. 1) of derivatives are very different from that of the protein free DGG. In the DGGSU a new and intense band appears at 1262 cm^{-1} , assigned to asymmetrical stretching of $\text{S}=\text{O}$ vibration. Spectral difference can be seen in DGGOX in comparison with unmodified DGG. A band attributed to $\text{C}=\text{O}$ stretching vibration is now present in DGGOX spectrum due to the insertion of COOH group.

The degree of substitution (DS), defined as the fraction of modified monosaccharide on the total units, were determined by elemental microanalysis for DGGSU and by titration for DGGOX. The S% increased from zero (unmodified DGG) to 9.79% for DGGSU. Based on the fact that the main constituents of galactomannan are hexoses, the DS was considered as the number of $-\text{OSO}_3\text{Na}$

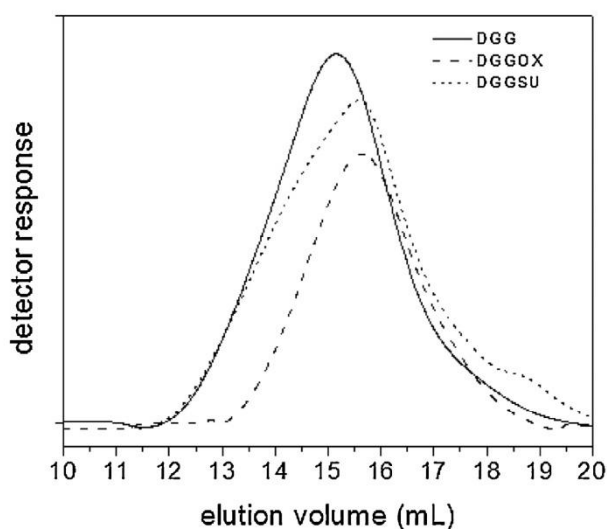


Fig. 4. Gel permeation chromatography curves of deproteinized guar gum (DGG), oxidized (DGGOX), and sulfated (DGGSU) derivatives solution.

groups per 6 carbons. From data on the S and C content, and using Eq. (1) (Melo, Feitosa, Freitas, & de Paula, 2002), the DS value of 0.60 was calculated. The degree of substitution for the DGGOX was 0.36, close to the value obtained for the oxidation of galactomannan from *Leucaema leucocephala* in similar condition (Sierakowski et al., 2000).

$$DS = \frac{\left(\frac{S\%}{\text{atomic mass of S}}\right)}{\left(\frac{C\%}{\text{atomic mass of C} \times 6}\right)} = 2.25 \left(\frac{S\%}{C\%}\right) \quad (1)$$

The derivatives were analyzed by NMR in order to verify the preferential position of sulfation and oxidation. Comparison between the ^{13}C NMR spectrum of DGGOX and DGG (Fig. 2) revealed two main differences: (a) the absence of the signal at 63.7 ppm present in the unmodified DGG, and (b) presence of two new signals at the 177.5 and 177.8 ppm. The absence of the signal from C-6 of free mannose indicates that this monosaccharide was totally substituted in the oxidation reaction. The new signals are due to the presence of C=O group from COOH.

The ^1H - ^{13}C HSQC spectra (Supplementary information Fig. S1) exhibit the shift to a lower δ value of the proton H-1 from mannose residue in DGGOX, which confirms the substitution at C-6 from mannose. New signals at 70.3, 75.6, and 100.5 ppm were observed in ^{13}C NMR spectrum of sulfated gum (Fig. 2). The first one is due to the insertion of sulfate group in the primary carbon (C-6). The proof that this new signal is attributed to substituted CH_2 was obtained from DEPT 135 (Supplementary information Fig. S2). The signals from CH_2 appear in opposite amplitude to those of CH and CH_3 .

Table 1
Main characteristics of unmodified and modified guar gum.

Characteristics	Guar gum		
	Non-modified	sulfated	oxidized
Inserted group	–	– OSO_3Na	– COOH
Substitution degree	0.00	0.60	0.36
Insert position	–	C-6 - galactose	C-6 - mannose
Intrinsic viscosity (dL/g) ^a	6.2	4.9	2.2
Weight average molar mass (g/mol)	3.9×10^6	2.8×10^6	2.6×10^6
Apparent viscosity (mPa s) ^b	58	39	9

^a Solvent 0.1 mol/L NaCl at 25 °C.

^b 1% (w/v) aqueous solutions shear rate 200 s⁻¹ at 25 °C.

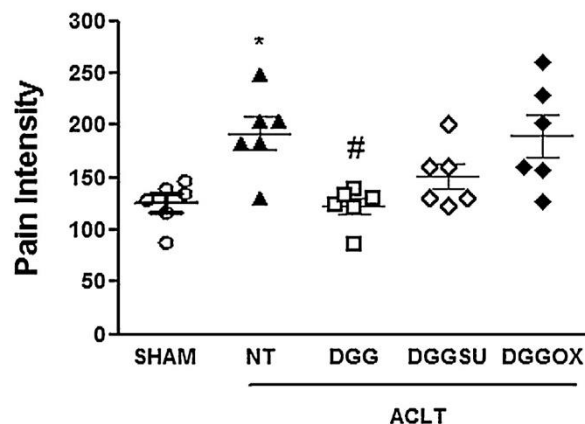


Fig. 5. Sulfation or oxidation of deproteinized guar gum (DGG) abrogates analgesia in an osteoarthritis model. Rats were subjected to ACLT. Joint pain was assessed daily as the increase in the paw elevation time (PET), using the articular incapacitation test. A sham group was subjected to the surgical procedure without ACLT and received saline by gavage. The non-treated (NT) group received saline. Groups received 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ i.a. of either DGG, sulfated DGG (DGGSU) or oxidized DGG (DGGOX), starting 4 days after ACLT. Results are reported as the mean of the PET (s/10 min) obtained daily, starting at day 4, until day 7; n = 6 animals/group; *P < 0.05 compared to NT using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

The signals at 75.6 and 100.5 ppm are attributed to C-5 and C-1 from sulfated galactose, shifted from original δ .

The sulfation occurred preferentially in the carbon 6 of the galactose residue of the original galactomannan whereas the oxidation occurred preferentially in the carbon 6 of the mannose residue, as shown in Fig. 3. The guar gum derivatives were also characterized by viscosity and molar mass determination. The gel permeation curves (Fig. 4) indicate chain degradation in oxidized and sulfated samples. The guar gum shows a monomodal distribution with elution volume 7.6 mL. The oxidized derivative also presents a monomodal distribution, but with the elution volume shifted to higher volume (7.8 mL). A lower molar mass is obtained for DGGOX. The curve profile for DGGSU is different. A main peak occurs at 7.8 mL, but two shoulders can be visualized, at 7.4 and 9.4 mL. The distribution of molar mass is more heterogeneous, with low fraction of unsulfated material and other fraction with intense chain degradation (9.4 mL). Due to the ionic charge of the derivatives and the unavailability of proper standards the molar mass cannot be quantified by this kind of GPC/detector. The weight average molar mass (M_w) was calculated by light scattering experiments, based on Zimm plots. All derivatives show lower molar mass than the original guar gum. The DGG presents $M_w 3.9 \times 10^6$ g/mol, and DGGOX and DGGSU show 2.6×10^6 and 2.8×10^6 g/mol, respectively. The slightly higher M_w value of DGGSU, in comparison with DGGOX may be due to the presence of the fraction of low elution volume, and the influence of high dimension chain over the M_w .

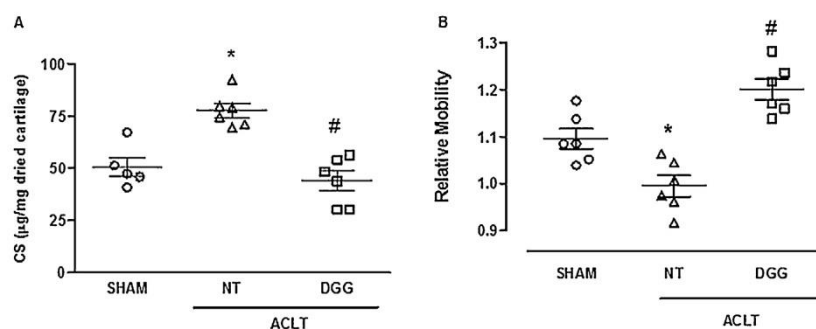


Fig. 6. DGG solution prevents the increase in cartilage Chondroitin Sulfate (CS) content (A) and its altered electrophoretic mobility (B) in the ACLT model. (A) Rats were subjected to ACLT (OA) and the CS content in cartilage samples was measured by densitometry after agarose gel electrophoresis. A sham group was subjected to the surgical procedure without ACLT. Groups received 100 µg/50 µL of DGG or saline i.a weekly, starting at day 7 after ACLT until one week prior to sacrifice, at 10 weeks. Results are the means \pm SD of CS (µg/mg of dried cartilage) in groups of 6 animals. * $P < 0.05$ compared to sham; # $P < 0.05$, compared to NT (one-way ANOVA, followed by Tukey's test). (B) Cartilage samples were ran on a 6% polyacrylamide gel electrophoresis. The relative mobility was obtained by the ratio between the peak position of the sample and the peak position of standard chondroitin-4-sulfate (C4S). The M_w of the CS from the various group samples was assessed by determining its relative mobility to standard C4S ran in parallel on a 6% polyacrylamide-gel electrophoresis. Values represent the ratio of the peak position of the digitalized gel image curves and that of C4S, arbitrarily set at 1.0; $n = 6$ animals/group. * $P < 0.05$ compared to NT (one-way ANOVA, followed by Tukey's test).

The intrinsic viscosity and the apparent viscosity were determined and the values showed in Table 1. The DGGOX presents the lowest intrinsic (2.2 dL/g) and apparent viscosity (9.0 mPa s). The unmodified DGG exhibits the highest values ($[\eta] = 6.2$ dL/g and $\eta_{app} = 58$ mPa s). Intermediate values are obtained for DGGSU ($[\eta] = 4.9$ dL/g and $\eta_{app} = 39$ mPa s).

3.2. Structure modifications of the guar gum abrogate joint analgesia

As we have reported previously, a single administration of a DGG solution (100 µg/50 µL) at day 4 following ACLT significantly reduced joint pain, as compared to animals that received saline (Fig. 5). Administration of either the DGGOX or the DGGSU preparations significantly prevented joint analgesia promoted by the original DGG solution (Fig. 5), meaning that the structural integrity of the polysaccharide is crucial to its analgesic effect. It should be remarked that the molar mass of the compounds, as well as their intrinsic viscosity, were not significantly modified after oxidation or sulfation of the galactomannan. Coupled to our previous report showing that the galactomannan inhibition of joint pain in this OA model occurs regardless of using a gel or saline formulation (Castro et al., 2006), this finding adds support to our proposal that pharmacological rather than rheological mechanisms account for the analgesia.

We are not aware of similar modifications in the structural of commercially available viscosupplementation agents. Rheological properties of hyaluronic acid preparations are claimed to be responsible for the beneficial effect of those compounds in patients with OA. Apparently, high-molar mass HA preparations improve viscoelasticity thus ameliorating joint lubrication. However, *in vitro* studies are used to support this assumption, which is questioned for instance by the observation that a sustained relief is experienced by patients exposed to viscosupplementation. In keeping with this skepticism, a recent *in vivo* study in rabbits showed that the viscoelasticity of the synovial fluid was similar in animals that received saline, as well as low or high molar mass HA preparations, but only the high molecular weight HA was chondroprotective (Elmorsy et al., 2014). The fact that our guar gum preparations are saline-soluble and their rheologic properties differ from those HA preparations, which are viscous (Elmorsy et al., 2014), argues that molecular structure rather than intrinsic viscosity account for the biological activity of intraarticularly administered polysaccharides in OA. Thus, if we have to admit

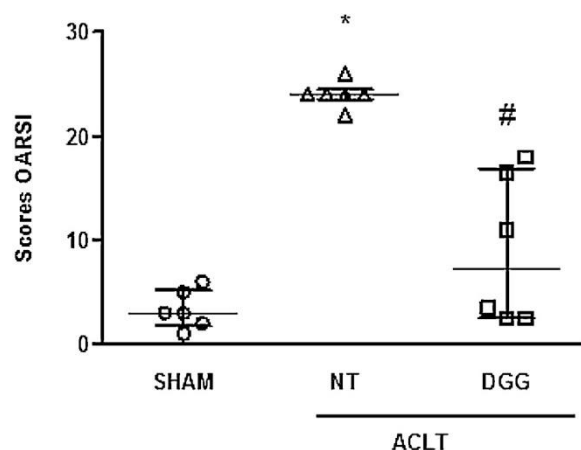


Fig. 7. DGG solution prevents joint damage seen at histology in the ACLT model. Rats were subjected to ACLT and killed after 70 days. Groups received GG (100 µg/50 µL i.a) or saline (50 µL i.a) (NT), weekly, starting at day 7 until sacrifice at day 70 after ACLT. Femoral extremities were excised and processed for hematoxylin–eosin and toluidine-blue staining; evaluation used the OARSI grading and staging system. Results are medians (range) of $n = 6$ animals/group. * $P < 0.05$ compared to NT; # $P < 0.05$, compared to Sham (Kruskal–Wallis, followed by Dunn's test).

that the controversy as to whether viscosupplementation is better than placebo to treat OA still persists (Hunter, 2015), let alone the proposal that various molar mass preparations differ regarding clinical benefit. Glycosaminoglycans (GAG) extracted from the cartilage of animals subjected to the ACLT model of OA displayed qualitative alterations, meaning higher molar mass as compared to cartilage samples from sham-operated animals. Those changes are associated to joint damage seen at histopathology (Castro et al., 2006). Briefly, the molar mass of CS extracted from the articular cartilages was evaluated, as follows: samples were separated on a 6% w/v polyacrylamide gel-electrophoresis in barbital buffer (60 mmol/L, pH 8.6). After staining with 0.1% w/v toluidine-blue, the gels were digitalized and analyzed with the software ImageJ 1.37 V [<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>], which gives a distribution curve for the samples. The peak of the curve represents the central tendency of molar mass distribution. The relative mobility (Dietrich & Dietrich, 1972) was obtained by the ratio between the start migration of the sample and the start migration of a standard C4S ($M = 4.55 \times 10^4$ g/mol), which was arbitrarily set

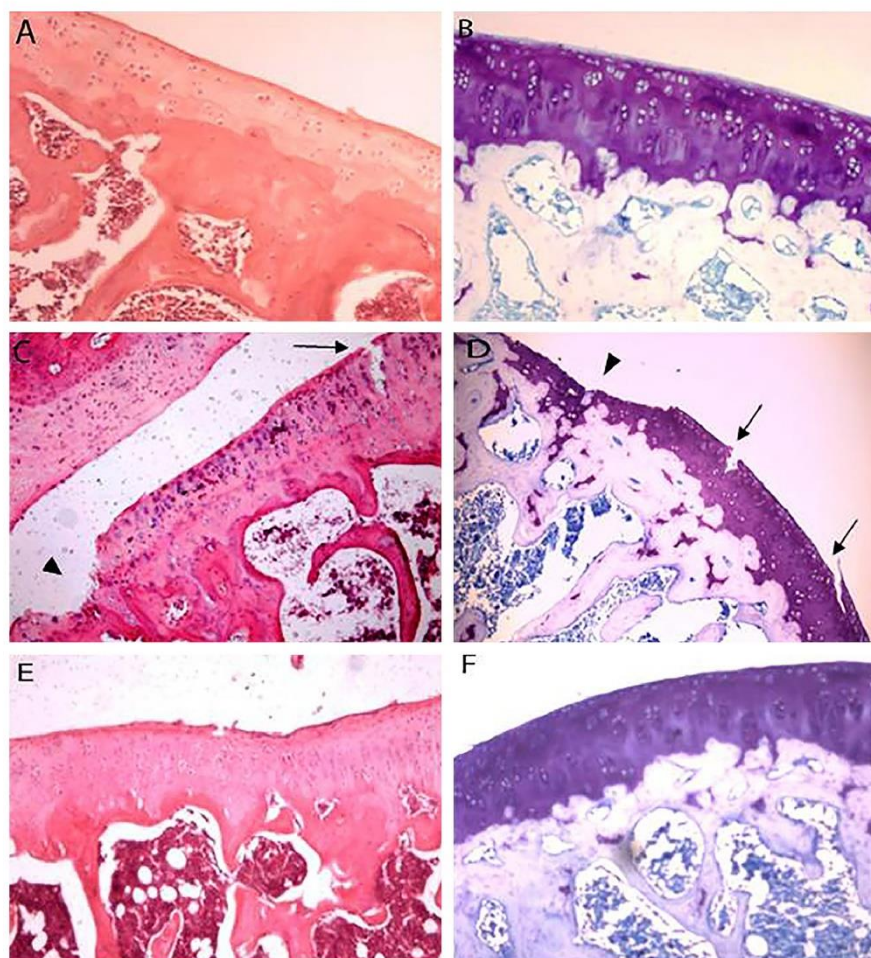


Fig. 8. DGG solution prevents histological alterations in the ACLT model. Rats were subjected to Sham operation (A and D) or ACLT (B and E). The distal femoral extremities were excised 70 days after ACLT and processed for hematoxylin – eosin (left panel) or toluidine–blue (right panel) staining. Groups received saline (B and E) or 100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ DGG (C and F) i.art., weekly, starting at day 7 until sacrifice at day 70 after ACLT. This representative illustration shows preservation of the articular cartilage lining and staining intensity in sham group (A and D), as compared to the saline group (B and E) that shows fissure, erosion (arrow) and area of denudation (arrow-head) that are not noticed in the group that received DGG (E and F) (original magnification $\times 40$).

as 1.0. The molar mass (MM) can then be estimated as inversely related to the relative mobility of the sample. As a comparison CGS (MM = 5.88×10^4 g/mol), under the same conditions, presents a relative mobility of 0.708.

3.3. Galactomannan prevents structural joint damage in experimental OA

As we showed previously (Silva et al., 2009), cartilage samples from rats subjected to ACLT display an increase in the GAG content as well as a reduced electrophoretic mobility of the GAG, as compared to sham-operated animals. In the present study, administration of the originally purified DGG solution significantly reversed both the increase in GAG content and the altered electrophoretic mobility of the extracted GAG, as compared to animals that received saline (Fig. 6a–b), thus indicating a chondroprotective effect of the gum.

The increase in the GAG content of the cartilage samples from the OA group were reported previously in our hands (Silva et al., 2009) as well as in other studies (Hosseininia, Lindberg, & Dahlberg, 2013). It has been proposed that this increase represents an early

anabolic response to the injury that subsides, leading place to a catabolic stage and progressive destruction of the joint cartilage. By interfering with the ongoing process, the administration of DGG apparently prevented joint damage to animals subjected to ACLT. Those effects were associated to a pronounced inhibition of the structural damage at histopathology. Hence, in addition to provide analgesia, the DGG solution had a joint protective effect.

3.4. Galactomannan administration prevents joint damage at histopathology in experimental OA

Fig. 7 shows the histological scores at both the femoral and tibial extremities of rats subjected to ACLT which, as expected, were clearly more severe and extensive, as compared to sham-operated animals. Administration of the purified DGG, using the same concentration (100 μg) that was analgesic, significantly prevented the severity and the extension of the joint damage seen at histopathology, as compared to animals that received the vehicle.

Fig. 8a/b, c/d, and e/f is representative hematoxylin–eosin/safranin staining illustrations of the histopathology of

samples from animals of the sham, ACLT + saline, and ACLT + DGG, respectively, obtained 70 days after surgery.

Damage to the underlying cartilage can be seen in the ACLT group, with fissures and cartilage denudation (arrows), as compared to the cartilage lining preservation seen in the group that received DGG. The histological scoring system showed here represent gold-standard parameters to evaluate joint damage in experimental OA models. Coupled to the restoration of the biochemical characteristics of the GAG of the joint cartilage, administration of the DGG solution was clearly chondroprotective to the joints of animals subjected to ACLT that received saline.

Limitations of our study include that we did not perform kinetic analysis of DGG effect in order to evaluate duration after a single injection. Also, we did not compare chemically modified commercially available viscosupplementation agents. Be as it may, given that the polysaccharide structure is claimed to be the active ingredient in all commercially available viscosupplementation agents, we speculate that structural integrity is crucial to their clinical efficacy.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, we believe this is the first study to show that structural modifications apart from the molar mass of the compound are crucial to define analgesia associated to viscosupplementation. Since we have previously shown that DGG is effective regardless of being a viscous or saline-soluble preparation, our present data further indicate that polysaccharides provide analgesia and chondroprotection in OA through pharmacological rather than rheological mechanisms.

Acknowledgements

This work was supported by grants 302218/2014-9 and 459334/2014-0 from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico - Brasil). The authors are grateful to Dr. Maria Rita Sierakowski (UFPR) for her support with the modification of the polysaccharide.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.031>.

References

Azero, E. G., & Andrade, C. T. (2002). Testing procedures for galactomannan purification. *Polymer Testing*, *21*, 551–556.

Bannuru, R. R., Schmid, C. H., Kent, D. M., Vaysbrot, E. E., Wong, J. B., & McAlindon, T. E. (2015). Comparative effectiveness of pharmacologic interventions for knee osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*, *162*(1), 46–54.

Berenbaum, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthritis). *Osteoarthritis and Cartilage*, *21*, 16–21.

Bezerra, M. M., Brain, S. D., Greenacre, S., Jerônimo, S. M., de Melo, L. B., Keeble, J., et al. (2004). Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *British Journal of Pharmacology*, *141*, 172–182.

Bruyère, O., Cooper, C., Pelletier, J. P., Branco, J., Luisa Brandi, M., Guillemin, F., et al. (2014). An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: a report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Seminars in Arthritis Rheumatism*, *44*(3), 253–263.

Castro, R. R., Cunha, F. Q., Silva, F. S., Jr., & Rocha, F. A. C. (2006). A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis—evidence of a role for nitric oxide. *Osteoarthritis and Cartilage*, *14*, 769–776.

Cunha, P. L. R., Castro, R. R., Rocha, F. A. C., de Paula, R. C. M., & Feitosa, J. P. A. (2005). Low viscosity hydrogel of guar gum: preparation and physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, *37*, 99–104.

Cunha, P. L. R., Maciel, J. S., Sierakowski, M. R., de Paula, R. C. M., & Feitosa, J. P. A. (2007). Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *18*(1), 85–92.

Dietrich, C. P., & Dietrich, S. M. (1972). Simple micro method for identification of heparin and other acidic mucopolysaccharides from mammalian tissues. *Analytical Biochemistry*, *46*, 209–218.

Elmorsy, S., Funakoshi, T., Sasazawa, F., Todano, M., Tadano, S., & Iwasaki, N. (2014). Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. *Osteoarthritis and Cartilage*, *22*(1), 121–127.

Hochberg, M. C., Altman, R. D., April, K. T., Benkhalti, M., Guyatt, G., McGowan, J., et al. (2012). American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip and knee. *Arthritis Care Research*, *64*, 465–474.

Hosseini, S., Lindberg, L. R., & Dahlberg, L. E. (2013). 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*, *9*, 14–18.

Hunter, D. J. (2015). Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee. *The New England Journal of Medicine*, *372*, 1040–1047.

Kirwan, J. (2001). Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee? *Knee*, *8*, 93–101.

McAlindon, T. E., Bannuru, R. R., Sullivan, M. C., Arden, N. K., Berenbaum, F., Bierma-Zeinstra, S. M., et al. (2014). OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, *22*, 363–388.

Melo, M. R. S., Feitosa, J. P. A., Freitas, A. L. P., & de Paula, R. C. M. (2002). Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydrate Polymers*, *49*, 491–498.

Moura Neto, E., Maciel, J. S., Cunha, P. L. R., de Paula, R. C. M., & Feitosa, J. P. A. (2011). Preparation and characterization of a chemically sulfated cashew gum polysaccharide. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *22*(10), 1953–1960.

Moura Neto, E., Sombra, V. G., Richter, A. R., Abreu, C. M. W. S., Maciel, J. S., Cunha, P. L. R., et al. (2014). Chemically sulfated galactomannan from *Dimorphandra Gardneriana* seed: characterization and toxicity evaluation. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 1013–1017.

Pasquali Ronchetti, I., Guerra, D., Taparelli, F., Boraldi, F., Bergamini, G., Zizzi, F., et al. (2001). Morphological analysis of knee synovial membrane biopsies from a randomized controlled clinical study comparing the effects of sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate (Depomedrol) in osteoarthritis. *Rheumatology*, *40*, 158–169.

Pritzker, K. P., Gay, S., Jimenez, S. A., Ostergaard, K., Pelletier, J. P., Revell, P. A., et al. (2006). Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*, *14*, 13–29.

Sierakowski, M. R., Milas, M., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2000). Specific modifications of galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, *42*, 51–57.

Silva, F. S., Jr., Yoshinari, N. H., Castro, R. R., Girão, V. C., Pompeu, M. M., Feitosa, J. P., et al. (2009). Combined glucosamine and chondroitin sulfate provides functional and structural benefit in the anterior cruciate ligament transection model. *Clinical Rheumatology*, *28*(2), 109–117.