

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

RONDINELLE RIBEIRO CASTRO

**HIPERALGESIA ARTICULAR NO MODELO DE OSTEOARTRITE POR
TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR EM RATOS - EFEITOS
DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO E DE POLISSACARÍDEOS DE
ELEVADO PESO MOLECULAR**

FORTALEZA

2004

RONDINELLE RIBEIRO CASTRO

**HIPERALGESIA ARTICULAR NO MODELO DE OSTEOARTRITE POR
TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR EM RATOS - EFEITOS
DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO E DE POLISSACARÍDEOS DE
ELEVADO PESO MOLECULAR**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Fco. Airton Castro da Rocha

FORTALEZA

2004

C353h

Castro, Rondinelle Ribeiro

Hiperalgisia articular no modelo de osteoartrite em ratos – Efeitos de inibidores da síntese de óxido nítrico e de polissacarídeos de elevado peso molecular / Rondinelle Ribeiro Castro. – Fortaleza, 2004.

142f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Osteoartrite. 2. Hiperalgisia. 3. TLCA. 4. Óxido nítrico. 5. Viscosuplementação. I. Título

CDD 616.7223

RONDINELLE RIBEIRO CASTRO

**HIPERALGESIA ARTICULAR NO MODELO DE OSTEOARTRITE POR
TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR EM RATOS – EFEITO
DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO E DE POLISSACARÍDEOS DE
ELEVADO PESO MOLECULAR**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade
Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção
do grau de Mestre em Farmacologia

Aprovada com louvor em 18/06/2004

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fco. Airton Castro da Rocha (orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao
Universidade Federal do Ceará - UFC

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) e no
Laboratório de Investigação em Osteoartropatias (LIO), da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará

«Magnificat anima mea Dominum
Et exultavit spiritus meus
In Deo salutari meo»
(Lc 1,46s)

À minha esposa Nubélia,
meu amor sempre presente

AGRADECIMENTOS

“Àquele que se assenta no trono e ao Cordeiro, louvor, honra, glória e poder pelos séculos dos séculos. Amém.” (Ap 5,13);

A meus pais, Hilda e Valdíque, por em tudo se esforçar em vista do meu bem;

Ao Prof. Airton Rocha, pela sua amizade, presença e orientação nesta caminhada;

À Profa. Judith Feitosa e à doutoranda Pablyana Cunha, do Laboratório de Polímeros (UFC) pela preparação e estudo químico do polissacarídeo de goma guar;

Ao Prof. Ronaldo Ribeiro, pela acolhida em seu laboratório (LAFICA);

Aos professores Gerly Brito e Marcellus Loiola, pela sadia e prestativa convivência no LAFICA;

À Profa. Selma Jerônimo (UFRN), pela orientação no processamento dos glicosaminoglicanos;

Ao Prof. Fernando Cunha (USP-RP), pela realização da técnica imunohistoquímica para a iNOS;

À Profa. Mirna Bezerra, pela sua gentileza e disposição em ajudar durante todas as etapas deste trabalho, em especial no processamento das cartilagens e dos GAGs;

Aos professores do Depto. de Fisiologia e Farmacologia (UFC), com destaque para: Armênio Aguiar, Eduardo Torres, Gisela Camarão, Marcus Valle, Rui Capaz e Vietla Rao;

Aos colegas de laboratório, Carol, Saraiva e Virgínia, pelo convívio e ajuda necessários;

Aos alunos de iniciação científica, Aline, Glória, Marcela, Márcio e Larissa, pela cooperação;

Aos colegas do LAFICA, Adriana, Antoniella, Cristina, Ingrid Márcio Uetti, Mariana, Mila, Mirlane, Pedro Adriano, Raquel, Renata, Rosa, Vilma e tantos outros que fizeram nossa permanência no LAFICA agradável e positiva;

À Vandinha, sempre disposta a ajudar;

Aos funcionários do Depto. de Fisiologia e Farmacologia, em especial Aura, Fábria, Fernando, Haroldo, Nísia, Patrícia, Rose, Silvana, Sílvia, e Vilani;

Aos colegas de Pós-Graduação: Adriana Rolim, Aline, Fabíola, Fernanda, Flávio, Francisco, Giovanni, Gislei, Hélio, Karla Bento, Karla Dayse, Kátia, Patrícia, Paula, Paulo, Regilane e Rivelilson, dentre muitos;

Ao colega Carlos Tiago, pela amizade e auxílio desde a época de graduação;

À equipe do biotério, Antônio, Artemisa, Edmilson, Febe, João e Júnior, pelo fornecimento dos animais;

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

HIPERALGESIA ARTICULAR NO MODELO DE OSTEOARTRITE POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR EM RATOS - EFEITO DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO E DE POLISSACARÍDEOS DE ELEVADO PESO MOLECULAR. Rondinelle Ribeiro Castro. **Orientador:** Prof. Dr. Francisco Ailton Castro da Rocha.

Modelos animais são usados para estudo da Osteoartrite (OA), mas a hiperalgesia articular tem sido pouco investigada. Nesse trabalho, padronizamos um método para estudo da hiperalgesia no modelo de OA em ratos, por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) e investigamos a participação do Óxido Nítrico (NO). Polissacarídeos de alto peso molecular (PM), como o Hilano GF-20, na forma de gel, são usados para reduzir a dor em pacientes com OA, mas não está claro se sua ação é atribuível ao alto PM ou à forma em gel (viscossuplementação). Usamos o modelo de TLCA para avaliar o efeito de um polissacarídeo de goma guar (GG) na hiperalgesia. Ratos Wistar foram submetidos à TLCA (grupo OA). A hiperalgesia foi avaliada pelo teste de incapacitação articular (IA) para ratos (Tonussi & Ferreira, 1992), por até 28 dias. O exsudato articular foi usado para medida do influxo celular (IC) e da liberação de NO. A atividade da enzima NO sintase indutível (iNOS) foi avaliada por imunohistoquímica das sinóvias. A cartilagem articular foi avaliada pela quantificação dos glicosaminoglicanos (GAG) da cartilagem dos cêndilos femorais. Os animais do grupo OA foram comparados a grupos falso-operados (Sham) e a controles normais (Naive). Animais do Grupo OA receberam indometacina (2mg/kg/d s.c.), L-NAME (30mg/kg i.p.) ou 1400W (0,5mg/kg/d s.c.), inibidores da NOS, 30 min antes da cirurgia e até o sacrifício, aos 7 dias (intervenção profilática). Outros animais do grupo OA receberam L-NAME ou 1400W a partir de 3 dias após a cirurgia, até o sacrifício, aos 7 dias (Intervenção terapêutica). Outros grupos OA receberam GG (100µg i. art.), como gel ou solução, dos 4 aos 7 dias de OA e foram comparados ao grupo sham e a um grupo que recebeu Hilano G-F 20 (100µg i. art.), como gel. Grupos controle receberam o veículo. O grupo OA apresentou IA significativamente maior durante os primeiros 7 dias ($p < 0,001$). Não houve diferença no IC entre todos os grupos. A liberação de NO, aos 7 dias, foi maior no grupo OA ($p < 0,05$), que foi associada a maior atividade da iNOS na sinóvia. A quantidade de GAG foi maior no grupo OA, medida aos 14 dias ($p < 0,05$). Indometacina reduziu significativamente a IA, em relação ao grupo OA ($p < 0,05$). L-NAME e 1400W inibiram a IA, apenas quando dados profilaticamente ($p < 0,01$) sendo revertida pela co-administração de L-NAME e L-arginina. A GG, em gel ou solução, da mesma forma que o Hilano G-F 20, reduziu significativamente a IA ($p < 0,05$), em relação ao grupo OA. Esta é a primeira demonstração de um modelo de estudo de hiperalgesia, de forma quantitativa, em modelos experimentais de OA. Existe aumento na liberação de NO no modelo de TLCA, provavelmente via ativação da iNOS. A administração de inibidores de NOS inibe a IA nesse modelo apenas se feita de forma profilática. Esta é também a primeira demonstração que a GG promove analgesia no modelo de TLCA em ratos. Ainda, o efeito antinociceptivo de polissacarídeos, pelo menos nesse modelo, independe do seu estado coloidal.

ABSTRACT

ARTICULAR HYPERALGESIA IN THE ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT TRANSECTON MODEL OF OSTEOARTHRITIS IN RATS - EFFECT OF NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITORS AND OF HIGH MOLECULAR WEIGHT POLYSACCHARIDES. Rondinelle Ribeiro Castro. **Orientador:** Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha.

Animal models have been employed for the study of osteoarthritis (OA), but the articular hyperalgesia has received little attention. In this study, we standardized a method to study hyperalgesia in an OA model in rats, through the anterior cruciate ligament transection (ACLT), as well as the role of Nitric Oxide (NO). High molecular weight (MW) polysaccharides, such as Hylan G-F 20, as a gel preparation, have been used to relieve pain in OA patients. Whether their activity is due to the high MW or to the gel state (viscossupplementation) is a matter of debate. We used the ACLT model to evaluate the effect of a polysaccharide from gum guar (GG) in the hyperalgesia. Wistar rats were subjected to ACLT (OA group). The hyperalgesia was measured using the test for articular incapacitation (AI) in rats (Tonussi & Ferreira, 1992), until 28 days. The joint lavage was used for determining cell influx (CI) and NO levels. The activity of the inducible NO synthase enzyme (iNOS) was evaluated by immunohistochemistry of the synovia. The articular cartilage was evaluated by quantifying the glycosaminoglycans (GAG) content of the cartilage of the femoral condyles. The animals of the OA group were compared to a sham group and to naive animals. Animals of the OA group received indomethacin (2mg/kg/d s.c.), L-NAME (30mg/kg i.p.) or 1400W (0,5mg/kg/d s.c.), NOS inhibitors, 30 min before the surgery and until sacrifice, at 7 days (prophylactic intervention). Animals of the OA group were compared to sham and naive groups. Other animals of the OA group received L-NAME or 1400W 3 days after the surgery, until sacrifice, at 7 days (therapeutic intervention). Still other animals of the OA group received GG (100µg i. art.), as a gel or as solution, from 4 through 7 days of OA and were compared to both a sham group and to a group that received Hylan G-F 20 (100µg i. art.), as a gel. Control groups received the vehicles. The OA group displayed significantly increased AI during the first 7 days ($P < 0.001$). There was no difference in CI among all groups. NO release, at 7 days, was increased in the OA group ($P < 0.05$), that was associated with an increased activity of the iNOS in the synovia. The GAG content was significantly increased in the OA group, measured at 14 days ($P < 0.05$). Indomethacin significantly reduced the AI, as compared to the OA group ($P < 0.05$). L-NAME and 1400W reduced the AI, only when given prophylactically ($P < 0.01$), that was reversed by the co-administration of L-NAME and L-arginine. GG, either as a gel or as a solution, as well as the Hylan G-F20, significantly reduced the AI ($P < 0.05$), as compared to the OA group. This is the first demonstration of a model to study hyperalgesia, quantitatively, in OA experimental models. There is increased release of NO in the ACLT model, probably via iNOS activation. The administration of NOS inhibitors inhibits the AI only if given prophylactically. This is also the first demonstration that GG promotes analgesia in the ACLT model in rats. Moreover, the anti-nociceptive effect of polysaccharides, at least in this model, is independent of their colloidal state.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS	xvii
LISTA DE FOTOGRAFIAS	xix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xx
I. INTRODUÇÃO	01
1. OSTEOARTRITE – ASPECTOS GERAIS.....	02
2. A CARTILAGEM ARTICULAR	03
2.1. ALTERAÇÕES DA CARTILAGEM ARTICULAR NA OSTEOARTRITE	08
3. MEMBRANA SINOVIAL E OSTEOARTRITE	10
3.1. FLUIDO SINOVIAL E OSTEOARTRITE	11
4. CITOCINAS E OSTEOARTRITE.....	12
5. PROSTAGLANDINAS E OSTEOARTRITE.....	14
6. ÓXIDO NÍTRICO	16
6.1. INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE NO	17
6.2. ÓXIDO NÍTRICO E DOR.....	19
6.3. ÓXIDO NÍTRICO E OSTEOARTRITE.....	20
7. DOR E OSTEOARTRITE	22
8. TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR COMO MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE.....	23
9. VISCOSSUPLEMENTAÇÃO.....	24

10. GOMA GUAR.....	26
II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	28
III. MATERIAIS E MÉTODOS	30
1. ANIMAIS.....	31
2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS.....	31
3. DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	32
3.1. DROGAS E REAGENTES	32
3.2. SOLUÇÕES	34
4. MODIFICAÇÃO E ANÁLISES QUÍMICAS DO POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR.....	35
4.1. PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDIO DE GOMA GUAR	36
4.2. REAÇÃO DE RETICULAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR.....	36
4.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS EM AMOSTRAS DE GOMA GUAR.....	36
4.4. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA DA GOMA GUAR.....	37
4.5. COMPARATIVO REOLÓGICO DE SOLUÇÕES E GÉIS DE GOMA GUAR E HILANO G-F 20	37
5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	37
5.1. TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.....	37
5.2. REGISTRO DA INCAPACITAÇÃO ARTICULAR	38
5.3. COLETA DO EXSUDATO ARTICULAR E DA MEMBRANA SINOVIAL	39
5.4. ANÁLISE DA CELULARIDADE NO EXSUDATO ARTICULAR.....	42
5.5. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NITRITO.....	42
5.6. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA iNOS EM MEMBRANAS SINOVIAIS	42

5.7. QUANTIFICAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs) NA CARTILAGEM ARTICULAR.....	43
5.7.1. EXTRAÇÃO DOS GAGs	43
5.7.2. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	43
5.8. EFEITO INTRA-ARTICULAR DE PREPARAÇÕES DE GG	44
5.9. MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA.....	44
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
IV. RESULTADOS	46
1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE OSTEOARTRITE POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR EM RATOS	47
1.1. INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA) EM RATOS.....	47
1.2. CELULARIDADE DO EXSUDATO ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA)	51
1.3. LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CAVIDADES ARTICULARES DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA).....	51
1.4. QUANTIFICAÇÃO DE CONDROITIN-SULFATO TOTAL NA MATRIZ DA CARTILAGEM ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA).....	51
1.5. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A NO SINTASE INDUZIDA (INOS) EM SINÓVIAS DE RATOS SUBMETIDAS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA).....	52
2. MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA POR INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO DA HIPERALGESIA ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.....	57
2.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PROFILÁTICA SISTÊMICA DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO (L-NAME E 1400W)	

SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LCA	57
2.2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA TERAPÊUTICA DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO (L-NAME E DE 1400W) SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LCA	57
3. ESTUDO QUÍMICO DO POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR E DO HILANO G-F 20	60
3.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CONTAMINAÇÃO PROTEÍCA EM AMOSTRAS DE GOMA GUAR.....	60
3.2. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR VISCOSIMÉTRICA DE AMOSTRAS DE GOMA GUAR.....	60
3.3. ESTUDO REOLÓGICO COMPARATIVO ENTRE GOMA GUAR EM SOLUÇÃO OU GEL RETICULADO E HILANO G-F 20	61
4. EFEITO DA GOMA GUAR EM CAVIDADES ARTICULARES DE RATOS	61
5. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR TERAPÊUTICA DE GOMA GUAR (GEL E SOLUÇÃO) E DO HILANO G-F 20 SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LCA	67
V. DISCUSSÃO	70
1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE OSTEOARTRITE POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR EM RATOS	71
1.1. INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA) EM RATOS.....	71
1.2. CELULARIDADE DO EXSUDATO ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA)	74

1.3. LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CAVIDADES ARTICULARES DE RATOS SUBMETIDOS A TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA).....	74
1.4. QUANTIFICAÇÃO DE CONDROITIN-SULFATO TOTAL NA MATRIZ DA CARTILAGEM ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA).....	76
2. PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA HIPERALGESIA ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.	78
3. EFEITO DE POLISSACARÍDEOS DE ELEVADO PESO MOLECULAR SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR.....	80
3.1. EFEITO DO HILANO G-F 20 SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR.....	80
3.2. EFEITO DA GOMA GUAR (GEL E SOLUÇÃO) SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR.....	82
VI. CONCLUSÕES.....	85
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
VIII. APÊNDICES	123
APÊNDICE A - INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.....	124
APÊNDICE B - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PROFILÁTICA SISTÊMICA DE INDOMETACINA SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR	130

APÊNDICE C - CELULARIDADE DO EXSUDATO ARTICULAR DE ANIMAIS SUJEITOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.....	131
APÊNDICE D - LIBERAÇÃO DE NITRITO NA CAVIDADE ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.....	132
APÊNDICE E - CONCENTRAÇÃO DE CONDROITIN-SULFATO (CS) TOTAL NA MATRIZ DA CARTILAGEM ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.....	133
APÊNDICE F - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PROFILÁTICA SISTÊMICA DE L-NAME OU 1400W SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.....	134
APÊNDICE G - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO TERAPÊUTICA SISTÊMICA DE L-NAME E 1400W SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.....	135
APÊNDICE H - EFEITO DE PREPARAÇÕES DE GG SOBRE DEAMBULAÇÃO EM JOELHOS DE RATOS.....	136
APÊNDICE I - EFEITO DE PREPARAÇÕES DE GG SOBRE A CELULARIDADE EM JOELHOS DE RATOS.....	137
APÊNDICE J - EFEITO DE ADMINISTRAÇÃO TERAPÊUTICA INTRA-ARTICULAR DE GOMA GUAR EM SOLUÇÃO OU RETICULADA (GEL) E HILANO G-F 20 EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR – CURSO TEMPORAL.....	138

APÊNDICE L - EFEITO DE ADMINISTRAÇÃO TERAPÊUTICA INTRA-ARTICULAR DE GOMA GUAR EM SOLUÇÃO OU RETICULADA (GEL) E HILANO G-F 20 SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.....140

VIII. ANEXO141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teor de proteína em amostras de goma guar.....62

Tabela 2: Viscosidade intrínseca (η) e massa molar viscosimétrica (MM) para soluções de amostras de goma guar a 0,07%63

Tabela 3: Viscosidades de amostras de goma guar em solução ou reticulada (gel), e do Hilano G-F 2064

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Ilustração 1: Estrutura do ácido hialurônico	04
Ilustração 2: Estruturas do condroitin-4-sulfato e condroitin-6-sulfato	05
Ilustração 3: Estrutura da goma guar.....	27
Figura 1: Cinética da incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA)	48
Figura 2: Cinética da incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA)	49
Figura 3: Efeito da administração profilática sistêmica de indometacina sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA)	50
Figura 4: Celularidade do exsudato articular de animais sujeitos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA)	53
Figura 5: Liberação de NO na cavidade articular de ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA).	54
Figura 6: Concentração de Condroitin-sulfato (CS) total na matriz da cartilagem articular de ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA)	55
Figura 7: Fotomicrografia de tecidos sinoviais marcado por imunohistoquímica para a iNOS.....	56
Figura 8: Efeito da administração profilática sistêmica de L-NAME ou 1400W sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA)	58

Figura 9: Efeito da administração terapêutica sistêmica de L-NAME e 1400W sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA)	59
Figura 10: Efeito da administração intra-articular de preparações de GG sobre a incapacitação articular em joelhos de ratos	65
Figura 11: Efeito da administração intra-articular de preparações de GG sobre a celularidade em joelhos de ratos.....	66
Figura 12: Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução (a) ou reticulada (gel) (b) e Hilano G-F 20 (c) em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA) – curso temporal.....	68
Figura 13: Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução ou reticulada (gel) e Hilano G-F 20 sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior.....	69

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1: Transecção do Ligamento cruzado Anterior40

Fotografia 2: Animais deambulando no sistema de registro da incapacitação articular41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1400W	N-(3-(Aminometil)-benzil)-acetamidina
15d-PGJ2	15-desoxi-12,12-Prostaglandina J ₂
ADAMs	Adamalinas
ADAMTS	Adamalinas com domínio trombospondina
AG	Aminoguanidina
AH	Ácido hialurônico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área sob a curva (<i>area under curve</i>)
°C	Grau centígrado
Ca ²⁺	Íons cálcio
CD	<i>Cluster determinant</i>
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
CGRP	Proteína relacionada ao gene da calcitonina
cm	Centímetro
COXs	Ciclooxigenases
CS	Condroitin-sulfato
CTV	Brometo de cetil-trimetilamônio
DAINEs	Drogas antiinflamatórias não-esteroidais
dL/g	decilitro por grama
EDTA	Etilenodiamino-tetra-acetado sódico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
e. p. m.	Erro padrão da média
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
g	Gramma
g	Aceleração da Gravidade
GAGs	Glicosaminoglicanos
GG	Goma guar
gGGNP	Gel de goma guar não purificada
gGGP	Gel de goma guar purificada
GGNP	Goma guar não purificada
GGP	Goma guar purificada

GMPc	Guanosina-monofostafa cíclica
ICE	Enzima conversora de IL-1 beta
IGF-I	Fator de Crescimento Insulina-símile I
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-1Ra	Antagonista de receptor pra IL-1
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
L	Litro
L-ARG	L-arginina
LCA	Ligamento cruzado anterior
L-NA	Nitro-L-arginina
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginina-metil-éster
L-NIL	L-iminoetil-lisina
L-NIO	L ^δ -iminoetil-L-ornitina
L-NMMA	N ^ω -monometil-L-arginina
min	minuto
mg	Miligrama
μg	Micrograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
MM	Massa Molecular
mm ²	Milímetro quadrado
MMPs	Metaloproteases de matriz
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzido
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Ânion nitrato
NO ₃ ⁻	Ânion nitrato
NPS	Nitroprussiato de sódio
NT	Não tratado

O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OA	Osteoartrite
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
p	Nível de significância estatística
PBS	Salina tamponada em fosfato (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PDA	Tampão diaminopropano-acetato
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Prostaglandinas
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
sGGNP	Solução de goma guar não purificada
sGGP	Solução de goma guar purificada
SIN-1	3-morfolinosidnonimina
TACE	Enzima conversora do TNF-α
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento-beta
TIMPS	Inibidores tissulares de metaloproteases de matriz
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TSP	Tempo de suspensão da pata
UDPGD	Uridina difosfo-glicose desidrogenase
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio vascular

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. OSTEOARTRITE – ASPECTOS GERAIS

A Osteoartrite (OA) é a doença articular mais comum em todo o mundo, tornando-se um problema de Saúde Pública em alguns países. Em populações ocidentais, evidências radiográficas de OA ocorrem na maioria das pessoas de sessenta e cinco anos de idade, e em 80% daquelas com idade superior a setenta e cinco anos. Nos Estados Unidos da América, constitui a segunda causa de incapacidade ocupacional em homens maiores de cinquenta anos, sendo superada apenas pela isquemia cardíaca. Nesse mesmo país, a OA responde por um número de internações hospitalares maior que as provocadas pela artrite reumatóide (Denisson & Cooper, 2003).

A Osteoartrite é definida pelo *American College of Rheumatology* como: “um grupo heterogêneo de condições que produzem sinais e sintomas articulares associados à integridade defectiva da cartilagem articular, somados a alterações nas margens do osso subcondral” (Altman et al., 1986). Uma definição mais recente da osteoartrite acrescenta que a articulação inteira é afetada na OA, incluindo ligamentos, membrana sinovial e músculos periarticulares (Keuttner & Goldberg, 1995).

A degeneração da cartilagem articular constitui a alteração mais característica e importante da OA. Aparecimento de fissuras verticais (fibrilação) da matriz, ulcerações e exposição do osso subcondral são os principais fenômenos ocorridos na degeneração da cartilagem, acompanhados de hipertrofia óssea, com formação de osteófitos. Em estágios clínicos da doença, são observadas alterações na membrana sinovial, normalmente associadas a reações inflamatórias (Pelletier, 2003).

A OA pode ser classificada em primária (idiopática) ou secundária (associada a uma condição conhecida) (Mankin et al., 1986). Alguns fatores são reconhecidos como causas da OA secundária. São eles: desordens metabólicas (ocronose); desorganizações anatômicas; trauma em ligamentos cruzados ou meniscos, cirurgias articulares ou artropatia inflamatória prévia (artrite reumatóide). Fatores de risco foram identificados para a ocorrência de OA em humanos. Foram relatadas associações entre desenvolvimento de OA e sexo feminino, obesidade,

osteoporose, hiper mobilidade, tabagismo e doenças de base (diabetes mellitus, hipertensão e hiperuricemia) (Denisson & Cooper, 2003).

Evidências epidemiológicas apontam para uma relação entre genética e osteoartrite. A influência do fator genético é estimada entre 39 e 65% e um parentesco de primeiro grau aumenta o risco da doença em duas a três vezes. Em subtipos mais raros da OA, o envolvimento de genes específico já foi demonstrado. Em displasia espondiloepifisal e condrodismplasias, por exemplo, foram descritas mutações para o gene que codifica o colágeno tipo II (Manek et al., 2003).

As características radiográficas convencionalmente utilizadas para definir OA incluem estreitamento do espaço articular, formação de osteófitos, esclerose subcondral, cistos subcondrais e anormalidades no contorno ósseo. Entretanto, metade dos pacientes portadores de alterações radiográficas é assintomática. (Hochberg et al., 1989). Quando a OA é sintomática, a queixa mais comum dos pacientes é a dor, sendo essa a causa principal da consulta médica (Brandt, 1989). Comumente é difícil localizar a dor a uma área restrita da articulação. Pacientes cujos joelhos são acometidos de OA relatam dor presente em toda a junta (Creamer et al., 1998).

Portadores de OA sintomática em joelhos normalmente apresentam um alterado padrão de deambulação, provocado pela dor articular ou por um comportamento defensivo em proteger a articulação acometida (Altman & Lozada, 2003).

2. A CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular é essencial para o movimento normal das articulações, apresentando, em sua composição, condrócitos imersos em uma matriz extracelular. Essas células, que ocupam apenas 1% do volume da cartilagem hialina, são responsáveis pela biossíntese, homeostase e catabolismo da mesma.

A rede de colágeno perfaz 50% a 60% do peso seco da cartilagem articular. O colágeno tipo II é o mais abundante (Heinegard et al., 1989), além das fibras colágenas tipos IX e XI. Na camada superficial da cartilagem, as fibras colágenas e os condrócitos se dispõem paralelamente à superfície. Em camadas mais profundas, as fibras colágenas se dispõem de modo randômico, e sustentam

unidades verticais contendo condrocitos dispostos em filas. Nas camadas basais da cartilagem, as fibras colágenas estão praticamente verticais, e se inserem na superfície do osso subcondral (Silver et al., 2001a). As fibras de colágeno tipo II são ligadas cruzadamente entre si, fato que restringe o movimento molecular e o número de sítios disponíveis para hidratação (Bank, 2000).

A matriz da cartilagem contém um componente mais específico, denominado agrecano. Duzentas ou mais moléculas de agrecano podem ligar-se lateralmente a uma longa cadeia de ácido hialurônico (Ilustração 1), formando um agregado proteoglicano cujo peso molecular pode ultrapassar cem milhões de daltons. Esse agregado mostra uma extrema dispersão em tamanho e composição (Watanabe et al., 1998).

A estrutura do agrecano consiste em uma proteína cerne (*core protein*), à qual se inserem as cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAGs). Existe na proteína central uma região hidrofóbica que é sítio de ligação para o glicosilfosfatidilinositol das membranas celulares. Uma proteína de ligação (*link protein*) adere lateralmente o agrecano a uma cadeia de ácido hialurônico de peso molecular variável entre duzentos mil a um milhão de daltons (Bali et al., 2001).

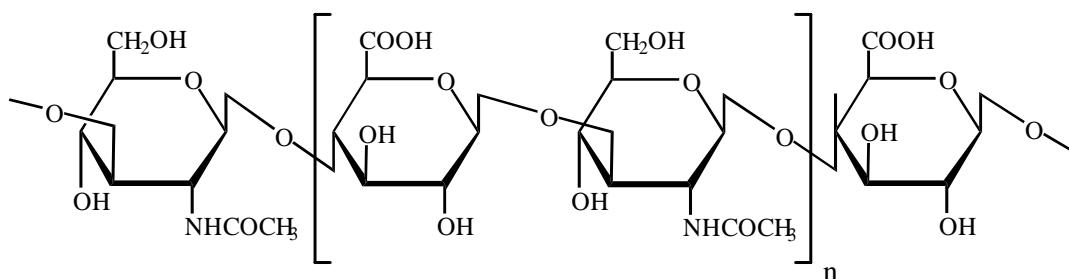


Ilustração 1: Estrutura do ácido hialurônico

Os GAGs são componentes ubíquos das membranas celulares e da matriz celular. Sua ocorrência está filogeneticamente demonstrada desde os espongiários (Dietrich, 1984). Entre as diversas funções dos GAGs, podemos citar o controle do equilíbrio hidroeletrolítico, integridade estrutural celular, cicatrização, divisão celular, resistência a infecções, transporte de cálcio mitocondrial e atividade antitrombogênica (Obrink et al., 1975; Kanwar and Farquhar, 1980). Fazem parte desse grupo de macromoléculas o heparan sulfato, heparina, queratan sulfato, condroitin-4 sulfato (condroitin sulfato A), dermatan sulfato (condroitin sulfato B) e condroitin-6 sulfato (condroitin sulfato C) e o ácido hialurônico. Além de constituir os

agregados proteoglicanos da matriz orgânica da cartilagem, o ácido hialurônico é encontrado livre no líquido sinovial, contribuindo para sua viscoelasticidade característica.

Os condroitins sulfatados (CS) diferem entre si tanto pela composição dos monossacarídeos constituintes quanto pelo padrão de sulfatação. O dermatan sulfato (CS B) é constituído por unidades dissacarídicas formadas por N-acetil-galactosamina, sulfatada na posição 2, e ácido idurônico, enquanto que os condroitin-4 sulfato (CS-4 ou CS A) e condroitin-6 sulfato (CS-6 ou CS C) são constituídos por unidades dissacarídicas formadas por N-acetil-galactosamina e ácido glicurônico. Os resíduos de N-acetil-galactosamina são sulfatados na posição 4 ou 6, para o CS-4 e CS-6, respectivamente (Ilustração 2). Os grupos sulfato, junto ao grupo carboxil dos ácidos glicurônico ou idurônico, estão ionizados em pH fisiológico, conferindo às cadeias polissacarídicas uma forte carga negativa global (Bali et al., 2001).

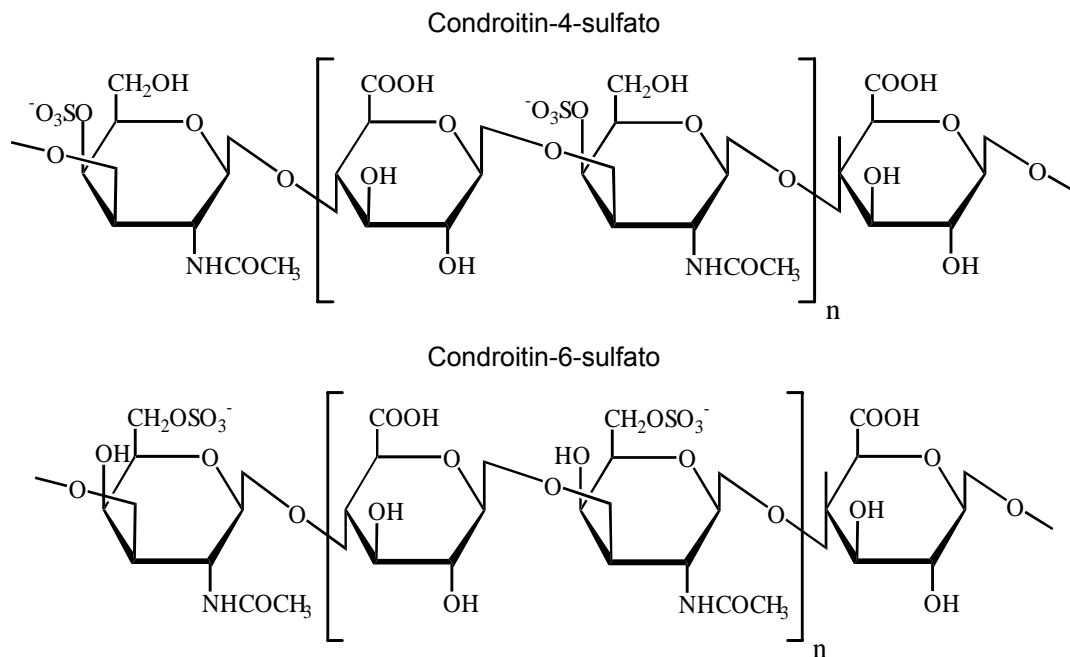


Ilustração 2: Estruturas dos condroitin-4-sulfato e condroitin-6-sulfato

Os GAGs estão localizados em duas principais regiões no agregado da cartilagem articular, uma delas contendo cerca de cem cadeias CS-4 ou CS-6, do tamanho de cinquenta a sessenta unidades dissacarídicas, e outra região com cerca de cinquenta cadeias de keratan-sulfato (Bali et al., 2001). O padrão de sulfatação dos dissacarídeos dos condroitins da cartilagem humana normal varia com a idade

do indivíduo, a topografia da superfície articular e a zona da cartilagem examinada. Camadas profundas da cartilagem imatura possuem quatro vezes mais resíduos sulfatados que regiões mais superficiais do tecido. Os condroitin-4 sulfato e condroitin-6 sulfato são, portanto, os GAGs mais importantes na cartilagem articular, sendo o CS-6 predominante em cartilagens maduras, enquanto que o CS-4 é característico da cartilagem jovem (Bayliss et al., 1999).

As propriedades dos proteoglicanos são explicadas principalmente pelas cadeias de GAGs, que perfazem 80% a 90% do peso do agregado. O excesso de cargas negativas no agregado atrai um número igual de cátions móveis (em especial o íon sódio), a fim de manter a neutralidade elétrica. Um desequilíbrio na concentração de cátions móveis surge entre o tecido e a solução externa, resultando no aparecimento de uma pressão osmótica de hidratação da cartilagem. Esta pressão de hidratação é contrabalançada pela tensão na rede de colágeno-proteoglicana da matriz sólida, e pela tensão de sobrecarga da articulação (Setton et al., 1999). Quando uma pressão é aplicada à cartilagem, as moléculas de água são forçadas a sair das regiões próximas dos grupos sulfato e carboxila. As cargas negativas, ao se aproximarem, repelem-se mutuamente, aumentando a pressão de hidratação, de modo a atrair novamente as moléculas de água ao ser suspensa a pressão aplicada (Caplan, 1984).

A homeostase da cartilagem articular é mantida pelo equilíbrio entre a neossíntese de colágeno e proteoglicanos e a lise enzimática dos mesmos. Os condrócitos são capazes de secretar enzimas líticas, tais como as metaloproteases de matriz (MMPs).

As MMPs constituem uma família de endopeptidases extracelulares estruturais e funcionalmente semelhantes, capazes de degradar, em pH neutro, uma variedade de componentes protéicos da matriz extracelular, incluindo colágeno, proteoglicanos, fibronectina e laminina (Woessner, 1991).

A família das MMPs pode ser subdividida em cinco grupos principais: as collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13); as gelatinases (MMP-2 e MMP-9); as estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11); um subgrupo heterogêneo constituído pela matrilisina (MMP-7), enamelisina (MMP-20), metaloprotease de macrófago (MMP-12) e MMP-19; e as metaloproteases de membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) (Nagase, 1997).

Tais enzimas possuem três domínios distintos: um pró-peptídeo na porção N-terminal envolvido na latência da enzima; um domínio catabólico ligante a cátions bivalentes (zinco e cálcio); e uma porção C-terminal. As MMPs são produzidas como pró-enzimas, tornando-se ativas mediante clivagem enzimática do peptídeo localizado na porção N-terminal. Grande número das MMPs é ativado no meio extracelular por ação de proteases dependentes de serina ou cisteína. As MMP-2 e MMP-3 são ativadas na superfície celular. Em contraste, as MMPs de membrana e a MMP-11 tornam-se ativas intracelularmente, no complexo de Golgi (Nagase, 1997).

Da família das MMPs, as collagenases e as estromelinas desempenham papéis primordiais na degradação da matriz extracelular, clivando respectivamente colágeno e proteoglicanos (Pelletier, 2003). As gelatinases clivam ainda o colágeno desnaturado e a elastina. (Murphy and Crabbe, 1995).

As adamalinas (ADAMs) constituem outro grupo importante de proteases presente na cartilagem. São enzimas associadas a membranas e possuem um domínio para desintegrina e um domínio típico das metaproteases, fato que lhes conferem esta denominação (***A Desintegrin And Metalloproteases***). Deste grupo, a ADAM-17, conhecida como TACE (***Tumour-necrosis Factor-alpha Converting Enzyme***) é de particular importância em artropatias. Esta enzima é responsável pela clivagem da pró-forma do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) à sua forma ativa (Moss et al., 1997). O TNF- α é uma citocina participante em inúmeros processos inflamatórios e patologias, inclusive na osteoartrite, como veremos adiante.

Novos membros da família das adamalinas, conhecidos como ADAMTS, foram identificados. Estas enzimas contêm, além dos domínios metaloprotease e desintegrina, um domínio trombospondina. Diferentemente das enzimas ADAM, que são proteínas intrínsecas da membrana e expressas na superfície celular, as enzimas ADAMTS não possuem domínios transmembrana, sendo, portanto, enzimas secretadas pelas células. Duas enzimas desta família, ADAMTS-4 e ADAMTS-5/ADAMTS-11 (sinônimos), foram identificadas como agrecanase-1 e agrecanase-2, respectivamente (Tortorella et al, 2000). Tais enzimas estão relacionadas à degradação dos proteoglicanos da matriz da cartilagem.

Ao lado da secreção de MMPs, os condrócitos produzem os inibidores tissulares de metaloproteases (TIMPs), proteínas estáveis capazes de interagir não covalentemente ao sítio ativo das MMP, em uma relação estequiométrica de um para um. Os complexos MMP-TIMP formados são inativos ou, pelo menos, menos

ativos que as MMPs não complexadas. Se os níveis de TIMPs excederem os de MMPs, o *turnover* dos componentes da cartilagem é inibido. Quatro TIMP foram identificadas. TIMP-1 e TIMP-2 estão presentes na cartilagem articular. TIMP-3 foi originalmente encontrada em associação com a matriz extracelular. TIMP-4 foi encontrada apenas em células cancerosas (Leco et al., 1994; Brew et al., 2000). Todas as MMPs ativas podem ser inibidas pelos TIMPs, além das pró-formas de MMP-2 (TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4) e MMP-9 (TIMP-1 e TIMP-3). TIMP-2 e TIMP-3 são inibidores efetivos das metaloproteases de membrana. TIMP-3 inibe também a TACE (ADAM-17) (Pelletier et al., 2001).

2.1. ALTERAÇÕES DA CARTILAGEM ARTICULAR NA OSTEOARTRITE

A hiper-hidratação da cartilagem é um evento inicial na OA e proporcional ao dano sobre a rede de colágeno (Bank, 2000). Em cartilagens osteoartríticas, as fibras colágenas apresentam tanto o comprimento quanto a constante elástica reduzidos, limitando a capacidade da cartilagem em absorver energia elástica durante a locomoção. É consistente a associação entre essas alterações e danos no tecido cartilaginoso (perda da camada superficial, formação de fissuras e degradação de proteoglicanos) (Silver et al., 2001b).

Está demonstrado por marcação imunohistoquímica que a desnaturação da rede de colágeno tipo II inicia-se na superfície da cartilagem, especialmente nas regiões pericelulares, e alcança as zonas mais profundas da cartilagem conforme a progressão da OA (Hollander et al., 1995). Estudos posteriores demonstraram que os condrócitos das zonas superficiais da cartilagem OA apresentam marcação imunohistoquímica para colagenases (Tetlow, 2001) e que as MMP-1 e MMP-13 (colagenases 1 e 3, respectivamente) podem ser encontradas na matriz articular, ao redor dos condrócitos (Wu et al., 2002). Esses achados indicam que os condrócitos, através da produção de metaloproteases de matriz, participam ativamente no dano à rede de colágeno tipo II na OA.

A perda de proteoglicanos da cartilagem articular é um importante evento na OA. Cartilagens OA apresentam a coloração reduzida para proteoglicanos (Aigner & McKenna, 2002). Em pacientes de OA, as concentrações de condroitins sulfatados e de keratan sulfato encontram-se aumentadas no líquido sinovial (Poole

et al., 1994), como produtos de degradação das moléculas de agrecano liberados de seus locais originais na matriz da cartilagem articular.

O condroitin-6-sulfato e o keratan-sulfato são os glicosaminoglicanos encontrados em maior concentração na cartilagem adulta saudável. Em contraste, na cartilagem OA, existe um incremento nas concentrações de condroitin-4-sulfato, em detrimento àquelas de condroitin-6-sulfato e keratan-sulfato (Mankin and Lippiello, 1971), sugerindo uma síntese compensatória de componentes típicos de uma cartilagem imatura. No líquido sinovial de pacientes de OA, uma diminuição na razão CS-6/CS-4 concorda com alterações da cartilagem articular nesta patologia (Ishiguro et al., 1999).

A apoptose de condrócitos é um fenômeno freqüente na cartilagem OA. Foi observado que nas áreas da cartilagem onde se encontra maior número de células apoptóticas, a depleção de proteoglicanos é mais intensa (Hashimoto, 1998b). A apoptose dos condrócitos contribui para a falência dos mecanismos de reparo da matriz da cartilagem.

A síntese de colágeno tipo II e de proteoglicanos está normalmente reduzida na OA (Martin & Buckwalter, 2002). Embora seja comum um aumento na síntese de proteoglicanos nos estágios iniciais da OA (Pinals, 1996; Lohmander et al., 1999), o processo de montagem do agrecano que ocorre na matriz da cartilagem parece estar prejudicado (Malemud, 1991).

Na OA, o desequilíbrio na síntese de TIMPs e MMPs, em prol dessas últimas, contribui para a suspensão da homeostasia da cartilagem. Foi relatado que a concentração da MMP-3 (stromelisin) no líquido sinovial de pacientes de OA supera a concentração de seus inibidores tissulares. A correlação direta entre as concentrações dessa metaloprotease e TIMP-1 sugere uma produção compensatória de inibidores de metaloprotease nesse processo patológico (Ishiguro et al., 1999). Está demonstrado também que a expressão de MMP-3 se correlaciona à expressão de agrecano na cartilagem OA, sugerindo haver uma regulação comum compensatória entre metabolismo anabólico e catabólico (Stove et al., 2001).

3. MEMBRANA SINOVIAL E OSTEOARTRITE

Denomina-se sinóvia a estrutura delicada que reveste internamente as superfícies articulares e que está em contato com o líquido sinovial (Edwards, 2003). Por sinóvia, entende-se tanto a camada celular superficial dessa estrutura (íntima ou membrana sinovial) quanto o tecido subsinovial (sub-intimal).

De acordo com o tecido subsinovial presente, a sinóvia pode ser classificada como areolar, adiposa ou fibrosa (Edwards, 2003). A sinóvia areolar é a mais especializada das três. Normalmente ela está enrugada, formando dobras que se desfazem por distensão leve. Capilares sanguíneos e mastócitos estão presentes entre ou sob as células sinoviais. Mais profundamente no tecido encontram-se vênulas e arteríolas (Wilkinson & Edwards, 1989).

ImproPRIAMENTE denominada de membrana, por não possuir membrana basal, a membrana sinovial constitui-se de camadas celulares – duas a cinco células de espessura – que repousam sobre uma matriz extracelular. Os tipos celulares componentes da membrana sinovial, os sinoviócitos, têm sido tradicionalmente classificados como células tipo A (macrófagos-símile) ou células tipo B (fibroblastos-símile) (Edwards, 2003).

Embora a OA não seja classicamente considerada uma doença inflamatória, evidências recentes sugerem que a ocorrência de inflamação da membrana sinovial seja importante na progressão das lesões da cartilagem na OA. A liberação de fragmentos da matriz por ação de enzimas proteolíticas promoveria inflamação sinovial, o que pode refletir em posterior degradação da cartilagem, à maneira de um ciclo vicioso (Pelletier, 2003).

Está relatado que o tecido sinovial na OA manifesta características inflamatórias típicas, tais como espessamento da camada interna, formação de agregados linfóides e angiogênese, na qual o endotélio vascular se apresenta imunorreativo ao Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Haywood et al., 2003). A infiltração de Linfócitos T CD4+ (auxiliares, *helper*) está presente na sinóvia OA, com prevalência de células que expressam o fenótipo Th1 (produtores de Interferon- γ), indicando que a regulação da resposta imune ocorre na OA (Ishii et al., 2002). Foi observada a fagocitose de detritos de cartilagem por células sinoviais CD68+ (macrófagos-símile) na OA. Esse

fenótipo celular está mais freqüentemente presente no compartimento medial do joelho, onde também são mais abundantes as células CD4+, suportando a hipótese de interação entre macrófagos e células T auxiliares na sinovite na OA (Saito et al., 2002). Além disso, Interleucina-1 α , Interleucina-1 β e Fator de Necrose Tumoral α são produzidos na sinóvia OA (Smith et al., 1997). Conforme será discutido adiante, citocinas pró-inflamatórias participam nos mecanismos de lesão da cartilagem na osteoartrite.

3.1. FLUIDO SINOVIAL E OSTEOARTRITE

O espaço articular encontra-se preenchido pelo fluido sinovial, obtido por ultrafiltração do plasma sanguíneo através capilares sinoviais e posterior adição de ácido hialurônico (Edwards, 2003). Os sinoviócitos tipo B (fibroblastos-símile) são as células da íntima responsáveis pela produção do ácido hialurônico encontrado no fluido sinovial. Essas células possuem uma enzima chamada uridina difosfo-glicose desidrogenase (UDPGD), que oxida a uridina difosfo-glicose a uridina difosfo-glicuronato, um dos substratos necessários para a síntese do ácido hialurônico (Wilkinson et al., 1992). Em alterações patológicas sinoviais, a atividade da UDPGD costuma estar diminuída.

Dentre as funções do fluido sinovial em articulações, podemos destacar a lubrificação da cartilagem articular durante o movimento e a nutrição da cartilagem. Uma vez que a cartilagem articular é avascular, não podendo, portanto, conferir aporte nutricional aos condrócitos, postula-se que nutrientes presentes no fluido sinovial possam fluir livremente pela matriz tipicamente hidratada da cartilagem, alcançando os condrócitos (Edwards, 2003).

O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano de elevado peso molecular. Descoberto por Meyer e Palmer em 1934, no humor vítreo, este biopolímero é constituído de unidades dissacarídicas repetitivas composta por N-acetilglicosamina e ácido glicurônico, em ligações do tipo β 1-4. Já as unidades dissacarídicas são unidas por ligações do tipo β 1-3 (Krause et al., 2001).

O comportamento viscoelástico do ácido hialurônico varia conforme a intensidade de cisalhamento à qual é exposto. Em baixas velocidades de cisalhamento, a solução é viscosa e relativamente inelástica; mas em velocidades de

cisalhamento mais elevadas, a solução se torna extremamente elástica. Portanto as soluções de ácido hialurônico podem agir como lubrificante em movimentos lentos e como absorvedor de choques quando os movimentos são rápidos (Scott et al., 2000).

A repetição periódica da carga negativa do grupo ácido carboxílico confere linearidade e repulsão mútua às cadeias do ácido hialurônico, de modo que essas cadeias lineares podem fluir umas sobre as outras, fato que garante a consistência escorregadia das secreções mucosas e do líquido sinovial. A presença desses grupos carregados provoca um elevado grau de hidratação às cadeias. Quando uma solução de ácido hialurônico é comprimida, a água é ejetada dos espaços entre as cadeias de ácido hialurônico, as quais são forçadas a ocupar um volume menor. Quando a compressão é liberada, o volume original é restabelecido (Champe & Harvey, 1997).

A presença de citocinas pró-inflamatórias (discutido em seguida), radicais livres e proteases na sinóvia OA podem adversamente afetar o metabolismo dos sinoviócitos B (fibroblastos-símile), provocando a síntese de ácido hialurônico de peso molecular alterado (Balazs et al., 1980; Dahl et al., 1985). Mais ainda, o ácido hialurônico pode ser fragmentado por radicais livres derivado do oxigênio (Greenward, 1991) ou intracelularmente por hialuronidas ou demais glicosidades presentes tanto em sinoviócitos quanto em leucócitos na sinóvia (Stephens et al., 1975; Stair-Nawy et al, 1999).

A diminuição no tamanho da molécula de ácido hialurônico presente, concomitante à sua diluição devida ao aumento da permeabilidade vascular sinovial, reduz as propriedades viscoelásticas do fluido sinovial na osteoartrite (Balazs & Dehlinger, 1985; Greenward, 1991), o que possivelmente submete a cartilagem a atritos excessivos capazes de lesioná-la.

4. CITOCINAS E OSTEOARTRITE

Citocinas pró-inflamatórias, tais como Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), participam na fisiopatologia da osteoartrite. A IL-1 e o TNF- α são produzidos em sinóvias de pacientes com OA (Smith et al., 1997). Tanto

a sinóvia quanto a cartilagem OA expressam a protease ICE (Interleukin-1 β Converting Enzyme), que converte a pró-IL-1 β à sua forma ativa (Saha et al., 1999). A ICE está localizada em todo o tecido da cartilagem OA, com preferencial expressão na zona superficial. O TNF- α pode ser ativado a partir de sua pró-forma por ação da TACE, presente em tecidos artríticos (Moss et al., 1997). Em sinóvias OA, foi demonstrado um déficit na síntese do antagonista fisiológico do receptor para IL-1 (IL-1Ra) (Fernandes et al., 2002).

In vitro, a IL-1 aumenta de maneira dose-dependente a proporção de condrócitos apoptóticos, tanto em tecidos humanos normais quanto OA (Herauld, 2000), inibe a síntese de proteoglicanos por condrócitos de cartilagem de camundongos (Scharstuhl et al., 2002), potencia a perda de proteoglicanos de cartilagem articular bovina submetida à injúria mecânica, fenômeno também provocado pelo TNF- α (Patwari et al., 2003), promove a expressão de MMP-1, MMP-3, MMP-13, ADAMTS-4 em condrócitos humanos (Bau et al., 2002) e inibe a sulfatação de proteoglicanos, afetando preferencialmente o condroitin-6-sulfato (Hickery & Bayliss, 1998). O TNF- α suprime a síntese da proteína cerne (*core protein*) do agregano e a expressão de colágeno tipo II em condrócitos da cartilagem articular de ratos (Seguin & Bernier, 2003). Em condrócitos humanos OA, o TNF- α induz a síntese de MMP-13 (Liacini et al., 2003).

O Fator Transformador de Crescimento- β (TGF- β) parece participar de mecanismos protetores na OA. TGF- β é capaz de inibir a redução da síntese de proteoglicanos induzida pela IL-1 em cultura de cartilagens de camundongos jovens (Scharstuhl et al., 2002). A inibição *in vivo* do TGF- β exacerba a perda de proteoglicanos na osteoartrite experimental em camundongos (Scharstuhl et al., 2003). A formação de osteófitos, que constitui um fenômeno anabólico característico na OA, parece ser mediada, ao menos em parte, pelo TGF- β . De fato, a inibição do TGF- β endógeno reduz a formação de osteófitos na osteoartrite experimental em camundongos (Scharstuhl et al., 2003).

Algumas citocinas apresentam atividade antiinflamatória. Três dessas citocinas – IL-4, IL-10 e IL-13 – foram identificadas. A Interleucina 4 (IL-4) foi testada *in vitro* em tecidos de pacientes portadores de OA e mostrou suprimir a síntese de IL-1 β e TNF- α . Em membranas sinoviais OA estimuladas com lipopolissacarídeo, a Interleucina-13 (IL-13) inibiu a síntese de IL-1 β e TNF- α , enquanto aumentou a produção de IL-1Ra (Fernandes et al., 2002).

5. PROSTAGLANDINAS E OSTEOARTRITE

As prostaglandinas (PGs) são produtos lipídicos derivados do ácido araquidônico, em uma via metabólica na qual enzimas conhecidas por ciclooxigenases (COX) catalizam a etapa inicial limitante. As ciclooxigenases compreendem ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2), ambas enzimas homodiméricas que possuem pesos moleculares semelhantes (71kDa). Embora sejam codificadas por genes diferentes, COX-1 e COX-2 compartilham entre si uma homologia de 60% em suas cadeias polipeptídicas (Vane et al., 2000).

A COX-1 está expressa de maneira constitutiva e participa em funções fisiológicas homeostáticas, como a manutenção da função renal normal e a integridade da mucosa gástrica (Vane and Botting, 1995; Jouzeau et al., 1997). A COX-2 está expressa na resposta inflamatória após indução por citocinas e fatores de crescimento (Jouzeau et al., 1997; Vane et al., 1998). Apenas a indução da COX-2 é inibida pela corticoterapia (Hoff et al., 1993; deWitt and Meade, 1993; Ristimaki et al., 1996). Além das isoformas COX-1 e COX-2, uma variante (*splicing* alternativo) denominada ciclooxigenase-3 (COX-3) foi identificada como um produto do gene da COX-1 cujo mRNA conserva o íntron 1. Em humanos, a COX-3 está expressa no tecido cardíaco e no córtex cerebral (Chandrasekharan et al., 2002).

A prostaglandina E_2 (PGE_2) está envolvida em um grande número de funções biológicas (revisado em Vane et al., 2000). A PGE_2 é sintetizada no córtex e na medula renal, provocando vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo renal. PGE_2 reduz a liberação de ácido gástrico pelas células parietais gástricas e estimula a síntese de muco gastroprotetor. PGE_2 , sinergicamente com a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), induz contração da musculatura uterina gravídica. No Sistema Nervoso Central, PGE_2 modula o sono e a temperatura corporal.

Os estudos acerca da participação das PG em eventos fisiopatológicos permitiram demonstrar que as drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINEs) aspirina-símile tais como indometacina e diclofenaco, reduzem a sintomatologia da inflamação por inibirem a síntese de prostaglandinas (Vane, 1971; Moncada et al., 1975; Ferreira et al., 1978). Dados adicionais confirmaram a elevação da concentração de prostaglandinas, em especial PGE_2 , durante a resposta inflamatória, mediando os eventos de vasculares (vasodilatação com aumento do

fluxo sanguíneo no sítio inflamatório, e aumento na permeabilidade vascular) (Williams and Morley, 1973; William, 1979) ou a resposta nociceptiva (Doherty et al., 1985; 1987).

Está demonstrado que as PGs não ativam diretamente os nociceptores, mas os sensibiliza para estímulos mecânicos ou para outros mediadores químicos, como a bradicinina (Ferreira, 1972), ou seja, potencializam a resposta de um estímulo doloroso. Por tal motivo, as PG podem ser consideradas mediadores hiperalgésicos (Lindblon., 1986).

Concentrações elevadas de PGE₂ estão presentes no líquido sinovial de pacientes com OA (Egg, 1984). *In vitro*, células sinoviais produzem PGE₂ por ativação da fosfolipase A₂, quando estimuladas com IL-1 (Gilman et al., 1988). O tecido sinovial parece ser a principal fonte de eicosanoídes no líquido sinovial (Wittenberg et al., 1993). Nas inflamações sinoviais, ocorre um aumento da expressão da COX-2, predominantemente nas células do endotélio vascular, no infiltrado mononuclear e nos fibroblastos sub-sinoviais. Além disso, as células da membrana sinovial expressam constitutivamente a COX-1 (Crofford, 1999).

Existem controvérsias na literatura quanto ao papel das PGs no metabolismo ósseo e da cartilagem. A PGE₂ estimula o processo de diferenciação de condrócitos, observado pela expressão de mRNA para o colágeno tipo II (Miyamoto, 2003). As PG, em especial a PGE₂, estimulam a reabsorção óssea por estimular a atividade de osteoclastos (Raisz, 1999). As PG também promovem replicação e diferenciação de osteoblastos (Woodiel et al., 1996), de modo que a inibição da síntese de PGs suprime a resposta osteogênica a estímulos mecânicos (Chambers et al., 1999).

Entretanto, foi demonstrado que a PGE₂ induz apoptose de condrócitos articulares bovinos *in vitro* (Miwa et al., 2000). A PGE₂ exógena sensibiliza condrócitos OA humanos à morte celular induzida pelo óxido nítrico (NO) (Notoya et al, 2000). A apoptose de condrócitos na OA é um fenômeno complexo e relaciona-se à síntese excessiva de fatores pró-apoptóticos na cartilagem e na sinóvia. Dentre esses fatores, NO e PGE₂ são predominantes. Estudos recentes revelaram que a apoptose de condrócitos OA pelo NO é mediada via ativação do gene da COX-2 e subsequente produção endógena aumentada de PGE₂ (Notoya et al, 2000). O exato mecanismo pelo qual a PGE₂ está envolvida na apoptose de condrócitos ainda não está bem definido.

Nem todas as PG são pró-inflamatórias. Estudos recentes vêm demonstrando que a 15d-PGJ₂ (15-desoxi-12,12-Prostaglandina J₂), um metabólito da prostaglandina D₂, apresenta propriedades antiinflamatórias (revisto em Fahmi et al, 2002a). Em condrócitos humanos, a produção de NO e MMP-13 induzidos por IL-1 é inibida pela 15d-PGJ₂ (Fahmi et al., 2001). A expressão de COX-2 e conseqüente produção de PGs são inibidas pela 15d-PGJ₂ em condrócitos humanos (Fahmi et al, 2002b).

6. ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso de curta meia vida – poucos segundos – nos fluidos biológicos. O NO é produzido a partir da oxidação estereoespecífica do aminoácido L-arginina pelo oxigênio molecular, catalisada por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (Moncada and Palmer, 1990). Esta reação necessita de NADPH e FAD como cofatores, e forma o aminoácido L-citrulina como produto secundário. Nos líquidos orgânicos, o NO produzido se oxida nos ânions nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻), seqüencialmente (Ignarro, 1990).

Uma grande variedade de células é capaz de sintetizar NO, dentre as quais destacam-se células endoteliais, neutrófilos (Rees et al., 1990a; McCall et al., 1991), sinoviócitos e condrócitos (Stefanovic-Racic et al., 1994; Stichtenoth et al., 1998). Com relação a esses últimos, foi demonstrado que o NO produzido pelos condrócitos contribui de forma significativa para a quantidade total de NO gerada na cavidade articular durante artropatias inflamatórias (Stefanovic-Racic et al., 1993).

A participação do NO em eventos fisiopatológicos está amplamente documentada. NO participa no controle da pressão arterial (Furchgott, 1983; Ignarro et al., 1987), na inibição da agregação plaquetária e da aderência de neutrófilos e monócitos ao endotélio vascular (Kubes et al., 1991; 1993; Belenky et al., 1993a; 1993b; Thomassen and Kavuru, 2001). NO parece participar na neurotransmissão e na neuroplasticidade (Southan and Garthwaite, 1993; Holscher, 1997). NO participa no sistema não-adrenérgico-não colinérgico periférico (Rand, 1992; Rajfer et al., 1992; Liu et al., 1992; Ziessen et al., 2002) e nos mecanismos de ereção peniana (Rajfer et al., 1992; Burnett, 1995). Os efeitos do NO podem ser explicados, ao menos parcialmente, pela ativação de uma via denominada L-arginina: NO: cGMP. A

ativação da enzima guanilato ciclase pelo NO eleva as concentrações intracelulares de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) (Cohen et al., 2000).

Três isoformas da NOS foram descritas: NOS endotelial (eNOS ou NOS1) e neuronal (nNOS ou NOS3), ambas expressas constitutivamente; e a NOS induzida (iNOS ou NOS2), detectada em algumas células após estimulação por agentes inflamatórios (Fukuto e Chaudhuri, 1995). As isoformas constitutivas, que levam à produção de pequenas quantidades de NO (picomoles) por curto período de tempo, são dependentes do complexo cálcio-calmodulina, estando ativas sob elevadas concentrações de íons cálcio no citossol. As NOS constitutivas estão presentes no endotélio vascular, plaquetas e sistema nervoso. Além disso, essas isoformas participam primariamente na modulação de processos fisiológicos homeostáticos, tais como o relaxamento vascular e regulação da pressão sanguínea, a agregação plaquetária e a neurotransmissão.

Por outro lado, a iNOS pode ser induzida em uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, células endoteliais, hepatócitos e células da glia, produzindo NO em grandes quantidades (nanomoles) por longos períodos de tempo. A iNOS possui um sítio com elevada afinidade pelo complexo cálcio-calmodulina, de modo que esta enzima já se encontra ativa mesmo em reduzidas concentrações intracelulares de Ca^{2+} . Citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2 e TNF- α) podem induzir a expressão de iNOS, ao passo que citocinas antiinflamatórias (IL-4 e IL-13) e glicocorticóides inibem sua expressão (Oswald et al., 1992; McCall et al., 1991; Kengatharan et al., 1996). A rigor, considera-se que o NO produzido após a indução da iNOS participe em processos fisiopatológicos. Dados da literatura demonstram que as atividades tumoricida e microbicida dos macrófagos são dependentes da geração de grandes quantidades de NO nestas células pela iNOS (Moncada et al., 1991).

6.1. INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE NO

A liberação excessiva de NO tem sido associada a eventos patológicos, tais como o choque séptico (Thiermermann and Vane, 1990), doenças neurodegenerativas (Jenner e Olanow, 1996) e processo inflamatório articular (Palmer et al., 1993; Stefanovic-Racic et al., 1994). Desta forma, agentes seletivos

que modulem a síntese de NO a partir da isoenzima induzida, sem prejuízo à atividade de isoenzimas constitutivas, são de considerável valor terapêutico. Além disso, como a detecção de NO *in situ* é complicada, os inibidores específicos das NOS são importantes ferramentas no estudo das ações do NO em processos patológicos.

Dentre os principais inibidores das NOS, estão os análogos estruturais da L-arginina, que competem com o substrato L-arginina pelo sítio de ligação nas NOS. O primeiro inibidor descrito desta classe de compostos foi o N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA). Outros análogos da L-arginina são: L^δ-iminoetil-L-ornitina (L-NIO), Nitro-L-arginina (L-NA) e N^ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Embora os análogos estruturais da L-arginina sejam potentes inibidores das NOS, normalmente demonstram pouca seletividade para as distintas isoformas da NOS (Rees et al., 1990b).

Os derivados da L-citrulina também inibem a síntese de NO. Estes compostos exercem sua atividade através de ligação à enzima, impedindo a ativação do oxigênio molecular. Os principais representantes deste grupo são L-tiocitrulina (inibidor não-seletivo da NOS) e S-metil-L-tiocitrulina (potente inibidor da nNOS). Outro análogo estrutural de aminoácidos, a L-iminoetil-lisina (L-NIL) apresenta seletividade para a isoforma induzida (Connor et al., 1995; Pelletier et al., 1999; Pelletier et al., 2000).

Agentes não análogos da L-arginina, tais como as guanidinas, têm sido investigados para fins de inibição seletiva da iNOS. Está demonstrado que a aminoguanidina (AG) inibe seletivamente a iNOS (Corbett et al., 1992). Entretanto são normalmente necessárias elevadas doses de AG para se obter inibição significativa da isoforma induzida. Nestas condições, porém, é provável que a AG iniba também as isoformas constitutivas (Laszlo et al., 1995) ou interfira na atividade de outras enzimas tais como a catalase (Ou and Wolff, 1993), promovendo acúmulo de espécies reativas do oxigênio.

Além das guanidinas, as isotiouréias foram identificadas como potentes inibidores da NOS (Southan et al., 1995). Por exemplo, a S-isopropil-isotio-uréia é seletiva para a iNOS humana *in vitro*; S-metil-isotio-uréia mostra-se seletiva para a iNOS *in vivo*, sendo benéfica no choque séptico em roedores (Kengatharan et al., 1995).

Dentre os inibidores recentemente descobertos que não guardam relação estrutural com a L-arginina, destaca-se a N-(3-(Aminometil)-benzil)-acetamidina (1400W). Está demonstrado que AG, L-NIO e isotiouréias, todos inibidores considerados seletivos, são cerca de trinta vezes mais potentes sobre a iNOS, em relação a eNOS (Wolff and Lubeskie, 1995; Connor et al, 1995; Nakane et al., 1995), ao passo que o 1400W é cerca de 5000 vezes mais potente para a iNOS, em relação a eNOS (Garvey et al., 1997).

6.2. ÓXIDO NÍTRICO E DOR

A participação do NO na nocicepção não está totalmente definido. Está demonstrado que a analgesia periférica da acetilcolina, no modelo de hiperalgia induzida por carragenina ou prostaglandina, pode ser bloqueada pelo L-NMMA, inibidor da NOS, azul de metileno, inibidor da guanilato ciclase, ou potenciada com MY 5445, inibidor de fosfodiesterase (enzima que degrada o cGMP), sugerindo que a analgesia colinérgica periférica envolve a ativação da via L-arginina:NO:cGMP (Duarte et al., 1990). Estudos sobre a antinocicepção pela morfina em hiperalgia de pata de ratos sensibilizada por PGE₂ (Ferreira et al., 1991a; 1991b) e no teste de formalina em pata de ratos (Granados-Soto et al., 1997), via síntese de cGMP, confirmam tal hipótese. Mais ainda, L-NMMA inibem a analgesia da dipirona e do mirceno, reforçando a participação do sistema L-arginina:NO:cGMP no controle da resposta algica (Duarte et al., 1992).

Entretanto o efeito hiperalgésico do NO também foi demonstrado. L-NAME, inibidor da NOS, induz antinocicepção dose-dependente no teste de formalina em pata de ratos, no teste da placa quente e no modelo de contorções abdominais, estes dois últimos em camundongos (Moore et al., 1991). L-NAME também bloqueia a hiperalgia induzida por capsaicina em ratos (Sakurada et al., 1996) e reverte, igualmente como o L-NMMA, a hiperalgia por bradicinina em pata de ratos (Nakamura et al., 1996). A administração terapêutica de L-NAME reduz a hiperalgia térmica em ratos (Tedesco et al., 2002). No modelo de dor neuropática por compressão de terminações nervosas espinhais, L-NAME suprime a alodínia mecânica e térmica e o estresse induzido pelo frio (Yoon et al., 1998), sendo, neste

mesmo modelo, demonstrada a expressão local de NOS (Levy and Zochodne, 1998; Levy et al., 1999).

A dualidade analgesia-hiperalgesia pelo óxido nítrico foi estudada por nosso grupo na fase aguda do modelo de artrite induzida por zymosan (Rocha et al., 2002). Foi demonstrado que L-NAME, AG e 1400W, inibidores de NOS, são analgésicos se administrados antes da indução da artrite, mas não o são na artrite em desenvolvimento. Por outro lado, os doadores de NO, tais como nitroprussiato de sódio (NPS) e 3-morfolinossidnonimina (SIN-1), promovem analgesia na artrite estabelecida. O aparente paradoxo entre o efeito de doadores de NO e inibidores de sua síntese pode ser explicado pelo fato dos inibidores de síntese prevenirem a inflamação sinovial, com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios hiperalgésicos, enquanto que os doadores de NO promoveria analgesia por ação direta sobre a via L-arginina:NO: cGMP.

6.3. ÓXIDO NÍTRICO E OSTEOARTRITE

Muitas evidências implicam a participação do óxido nítrico na fisiopatologia da osteoartrite. Concentrações elevadas de nitrito – metabólito do NO – foram determinadas no soro e no líquido sinovial de portadores de OA (Farrell et al., 1992). Diferentemente de condrócitos de cartilagem sadia, células da cartilagem OA espontaneamente produzem NO (Amin et al., 1995). Quando estimulados em cultura, condrócitos articulares expressam a isoforma indutível da NO sintase (iNOS) (Charles et al, 1993). Entretanto condrócitos de cartilagens OA expressam uma NO sintase semelhante a nNOS (Amin et al., 1995).

A apoptose de condrócitos é um importante fator para a degeneração da cartilagem articular na OA. O NO tem sido considerado um indutor primário de apoptose de condrócitos (Blanco et al., 1995), mediada pela ativação de caspase-3 e tirosina –quinase. Entretanto, foi mostrado que em cartilagens OA humanas, a prevalência de proteínas nitrosiladas (marcadoras para NO) em células apoptóticas não diferia em relação a células não apoptóticas, sugerindo que o NO poderia não ser o sinal iniciador direto de apoptose (Greisberg et al., 2002). Essa hipótese foi confirmada por outro estudo (Del Carlo et al., 2002;). Para a ocorrência de apoptose, parece ser necessária a formação de outras espécies reativas do oxigênio, como o

ânion superóxido (O_2^-), o qual reage com o NO, formando o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$).

A síntese de macromoléculas constituintes da matriz da cartilagem articular parece ser prejudicada pelo NO. Condrócitos articulares humanos expostos *in vitro* a doadores de NO e ao peroxinitrito apresentam redução na atividade mitocondrial e na formação de adenosina-trifosfato (ATP) (Johnson et al., 2000). Nessas células a inibição da respiração celular se relaciona a inibição na síntese de colágenos e proteoglicanos. *In vitro*, condrocitos OA humanos, submetidos à pressão de cisalhamento contínua, liberam NO de maneira dose e tempo dependentes. Nessas células, os níveis intracelulares de mRNA para o colágeno tipo II e proteínas do agregano estão reduzidos, efeitos que são reproduzidos pelo tratamento dessas células com doadores de NO, tais como o nitroprussiato de sódio (NPS) (Lee et al., 2002).

Na osteoartrite, o NO interfere na síntese de proteoglicanos por condrocitos. NO está implicado na inibição da síntese de agregano por condrocitos de coelhos em cultura induzida pela IL-1 (Taskiran et al., 1994). *In vitro*, cartilagens de pacientes portadores de OA apresentam declínio no conteúdo de proteoglicanos de maneira tempo-dependente, evento que pode ser atenuado pela inibição da síntese de NO. (Cohen et al., 2000).

Condrócitos de cartilagens OA são pouco responsivos à estimulação da síntese de proteoglicanos pelo Fator de Crescimento Insulina-símile I (IGF-I, *Insulin-like Growth Factor*) (Studer et al., 2000), mas adquirem a responsividade ao IGF-I, sintetizando proteoglicanos, quando tratados com L-NMMA ou com inibidores de proteínas quinases dependentes de cGMP. (Studer et al., 2003), sugerindo que ao menos em parte a refratariedade ao IGF promovida pelo NO se deva à via L-Arginina:NO:cGMP.

O NO contribui para a lesão da cartilagem também por ativação de collagenases e por aumento na expressão de genes que codificam as metaloproteases de matriz (MMP). Por exemplo, L-NMMA inibe a expressão do gene da MMP-9 induzida pela IL-1 (Sasaki et al., 1998). L-NMMA deprime a atividade de estromelina e collagenase em explantes bovinos e humanos (Murrell et al., 1995).

7. DOR E OSTEOARTRITE

Essencialmente a dor constitui um mecanismo de proteção do organismo e ocorre associada à lesão tecidual. A dor induz, no indivíduo, uma reação defensiva a fim de afastar ou eliminar o agente nocivo. O comitê de taxonomia da *International Association for the Study of Pain* – IASP – conceitua a dor como “experiência sensorial e emocional desagradável, associada à lesão tecidual presente ou em potencial” (Merskey & Bogduk, 1994).

A dor na osteoartrite pode ser originada a partir de diferentes mecanismos. A cartilagem articular e os meniscos são estruturas desnervadas (Wyke, 1981), não podendo diretamente ser fontes da sensação dolorosa. Entretanto, alterações nessas estruturas e até mesmo no líquido sinovial podem indiretamente causar dor na OA. Fragmentos de cartilagem - contendo colágeno, proteoglicanos, cristais, enzimas proteolíticas ou citocinas - liberados no líquido sinovial podem desencadear uma resposta inflamatória sinovial, acompanhada de dor. Embora a inflamação da sinóvia em juntas afetadas pela OA sejam geralmente menos intensa em relação à observada em outras artropatias (como artrite reumatóide ou gota), a ativação de resposta inflamatória sempre ocorre em articulações osteoartíticas (Lindblad and Hedfors, 1989). A ruptura de superfície da cartilagem pode favorecer a deposição de cristais solúveis dentro da cavidade articular, estimulando uma resposta inflamatória (Schumacher, 1989). Porções fragmentadas de meniscos podem deslocar-se pelo espaço articular e inserir-se entre tecidos delicados e superfícies articulares lisas, distendendo a cápsula articular (Altman and Lozada, 2003).

Alterações ósseas estão epidemiologicamente associadas à dor na OA (Felson et al., 2001). O osso subcondral é innervado por fibras nervosas de pequeno diâmetro (Serre et al., 1999; Mach et al., 2002). Esses axônios têm acesso à superfície óssea interna através dos canais medulares. Tais fibras apresentam marcação imunohistoquímica característica para nociceptores relacionados à substância P e ao peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), à semelhança de nociceptores encontrados em outras regiões do corpo. Existem indicações funcionais de que essa inervação pode acarretar sensação dolorosa. Na ocorrência de isquemia subcondral ou aumento da pressão venosa, a substância P e o CGRP são liberados das terminações nervosas no osso (Kiaer et al., 1989).

O periósteo apresenta elevada densidade de fibras nervosas imunorreativas ao GCRP bem como inervação simpática (Mach et al., 2002), e pode estar distendido por formações osteofíticas ou por tensões na inserção dos ligamentos periarticulares. A cápsula articular e os ligamentos periarticulares são estruturas ricamente inervadas e, uma vez distendidas, podem causar por ativação de mecanorreceptores e nociceptores (Altman and Lozada, 2003).

8. TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR COMO MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE

A osteoartrite provoca a falência da articulação como um órgão (Liang and Fortin, 1991). Os processos bioquímicos e biomecânicos que participam na fisiopatologia da OA são dinâmicos e complexos para serem adequadamente reproduzidos em sistemas bioquímicos ou em culturas celulares, apenas. Adicionalmente, a OA humana é comumente diagnosticada em estágios avançados, períodos no quais os pacientes já se apresentam sintomáticos ou as alterações radiológicas – osteofitose e estreitamento do espaço articular - são evidentes (Carney, 1993). Em tais circunstâncias, uma variedade de modelos animais foi desenvolvida no intuito de caracterizar as alterações precoces na OA, estudar os fatores relacionados à sua progressão e avaliar novos potenciais terapêuticos.

Os modelos animais disponíveis para o estudo da OA costumam ser classificados segundo a ocorrência espontânea ou induzida da OA. Modelos espontâneos foram bem descritos nas linhagens C57Bl/6, BALB/c, STR/IN e STR/ORT de camundongos, em cobaias Hartley e em macacos Rhesus, e propiciam condições similares à OA primária humana. A OA pode ser induzida por desestabilização da articulação (transecção de ligamentos, meniscectomia, desnervação), resultando em redistribuição anormal das forças atuantes na junta durante a deambulação e na posição de repouso; degradação enzimática da matriz da cartilagem (injeção intra-articular de papaína ou colagenase bacteriana) ou interferência no metabolismo dos condrócitos (administração intra-articular de iodoacetato ou vitamina A). Os modelos induzidos de OA simulam as alterações comumente observadas na OA secundária humana (Jouzeau et al., 2000).

Tem sido relatado que degenerações articulares incidem em pacientes apresentando ruptura no ligamento cruzado anterior (Feagin and Curl, 1976; Dandy et al., 1982; Kieffer et al., 1984). Deste modo, a transecção do ligamento cruzado anterior (LCA) tornou-se um modelo cirúrgico bem estabelecido de indução experimental da osteoartrite.

Coelhos submetidos à transecção do LCA manifestam alterações histoquímicas na cartilagem articular (Hanashi et al., 2002), formação de osteófitos nos côndilos femorais e no plateau tibial (Hashimoto et al., 2002), apoptose de condrócitos das zonas superficiais e intermediárias da cartilagem e na porção medial do menisco (Hashimoto et al., 1998a; Hashimoto et al., 1999). Concentrações de neo-epítomos de condroitin-sulfato estão elevadas no líquido sinovial de cães submetidos à secção do LCA (Johnson et al., 2002), sugerindo liberação de produtos de degradação dos proteoglicanos a partir da matriz da cartilagem.

Recentemente, a utilização do modelo de OA por secção do LCA em ratos foi padronizada (Stoop et al., 2000). Nesse estudo, as alterações ocorreram de maneira bifásica: as mais precoces concentraram-se nas regiões marginais da cartilagem, e consistiram em destruição da cartilagem, com morte de condrócitos e depleção de proteoglicanos. Em estágios posteriores, foi observada a fibrilação na região central da cartilagem. Um estudo seguinte mostrou que as alterações da cartilagem articular de ratos submetidos à secção do LCA iniciam-se na zona superficial (Stoop et al., 2001). A execução do modelo de OA induzida por transecção do LCA em ratos se apresenta vantajosa em relação ao praticado em outras espécies animais em virtude do reduzido período de tempo necessário para serem observadas as primeiras alterações características da osteoartrite.

9. VISCOSSUPLEMENTAÇÃO

Originalmente introduzido por Balazs e Denlinger (1993), o termo *viscossuplementação* significa o restabelecimento das propriedades viscoelásticas do fluido sinovial mediante administração intra-articular de soluções de ácido hialurônico de elevado peso molecular. Segundo esses pesquisadores, o restabelecimento ou a suplementação da viscosidade do fluido sinovial na OA

poderia melhorar a funcionalidade articular e conseqüentemente reduzir os sintomas da OA.

A hipótese de Balazs foi comprovada por estudos clínicos, nos quais sintomas de OA – dor e disfunção articular - em joelhos humanos foram atenuados pela administração de ácido hialurônico (AH) de elevado peso molecular (da ordem de 10^6 daltons) (Wobig et al., 1999; Hochberg, 2000; Evanich et al., 2001). Entretanto, foi observado que o alívio desses sintomas da OA pôde ser obtido pela administração de AH com menor peso molecular (entre $5,0$ a $7,5 \times 10^5$ Daltons) pelo molecular inferior (Pasquali Ronchetti et al., 2001). Mais ainda, a eficácia clínica da viscosuplementação pôde ser observada por um período de várias semanas, ou até meses, após a administração intra-articular do AH (Huskisson & Donnelly, 1999; Kinwar, 2001), fato inconsistente com a velocidade de eliminação (*clearance*) do AH em juntas sinoviais. Dados em coelhos apontam para uma meia-vida inferior a vinte e quatro horas para o AH, podendo ser mais curta em animais submetidos a OA experimental (Lindenhayn et al., 1997).

Por esses resultados, torna-se evidente que os efeitos benéficos obtidos em longo prazo pela administração intra-articular de AH não podem ser explicados completamente pelo conceito de viscosuplementação definido por Balazs. De fato, uma exaustiva pesquisa tem sido realizada a fim de elucidar o mecanismo de ação das preparações de AH na OA (revisto em Ghosh & Guidolin, 2002).

Fortalecendo a hipótese de um mecanismo de ação farmacológico para o AH, relatou-se a existência de um receptor específico para o AH, o CD44 (Aruffo et al., 1990), presente em uma variedade de células, incluindo aquelas implicadas na fisiopatologia da OA, tais como macrófagos, linfócitos T, sinoviócitos e condrócitos (Knudson, 1993; Culty et al., 1994; Lesley et al, 1994; Fujii et al., 1999). A ligação do AH ao CD44 dispara uma variedade de eventos intracelulares, dentre os quais estão as cascatas de fosforilação de proteínas, a liberação de citocinas e síntese de proteínas do ciclo celular (Turney, 1989; Underhill, 1992).

Alguns efeitos da administração exógena de AH, não explicados pela hipótese da viscosuplementação, foram relatados: estímulo à produção endógena de AH e da síntese de proteoglicanos, inibição da liberação de enzimas capazes de degradar a cartilagem e inibição da fagocitose por células mononucleares e da migração leucocitária (revistos em Dougados, 2000). Foi demonstrado também que

o AH neutraliza radicais livres gerados nos tecidos articulares em atividade inflamatória (Jahn et al., 1999).

Em joelhos humanos acometidos pela OA, a administração de ácido hialurônico promoveu redução no número e na agregação de sinoviócitos, bem como no número e calibre dos vasos sinoviais (Pasquali Ronchetti et al., 2001).

Apesar dos efeitos benéficos da administração de AH exógeno, reações locais adversas são relatadas em dois a quatro por cento dos pacientes tratados (Adams et al., 2000; Bernadeau et al., 2001). Tais reações variam desde edema local até um quadro de artrite asséptica aguda, e se desenvolvem algumas horas após a aplicação.

10. GOMA GUAR

As gomas representam uma das principais fontes naturais de polissacarídeos. Dentre as gomas mais comuns, encontramos a Goma Guar (GG), extraída do endosperma de sementes da leguminosa *Cyamopsis tetragonobola*. A GG é uma galactomanana com massa molecular média de $2,2 \times 10^5$ Daltons e constituída por uma longa cadeia central formada por resíduos de manose, unidos por ligações glicosídicas do tipo β -(1→4). A essa cadeia central (manana) se ligam resíduos laterais de galactose por ligações do tipo α -(1→6) (Ilustração 3). Os monossacarídeos constituintes da GG são encontrados normalmente na razão de 1,5 a 2 resíduos de manose para cada resíduo de galactose (Cheng et al., 2002).

A goma guar se hidrata tanto em água fria quanto em água quente, formando soluções bastante viscosas. Quando as cadeias lineares de galactomanana são ligadas cruzadamente (reticuladas), essas soluções formam hidrogéis, que apresentam viscosidade superior às soluções originais.

Devido a seu baixo custo e excelentes propriedades reológicas, a goma guar e seus derivados são extensivamente utilizados na indústria alimentícia e cosmética (Cheng et al., 2002). Na indústria farmacêutica, a goma guar tem sido empregada na elaboração de veículos de liberação controlada para fármacos (Krishnaiah et al., 1999; Soppirnath & Aminabhavi, 2002). Por serem biocompatíveis, formulações reticuladas de GG têm sido desenvolvidas como substitutas para o muco cervical (Burruano et al., 2002).

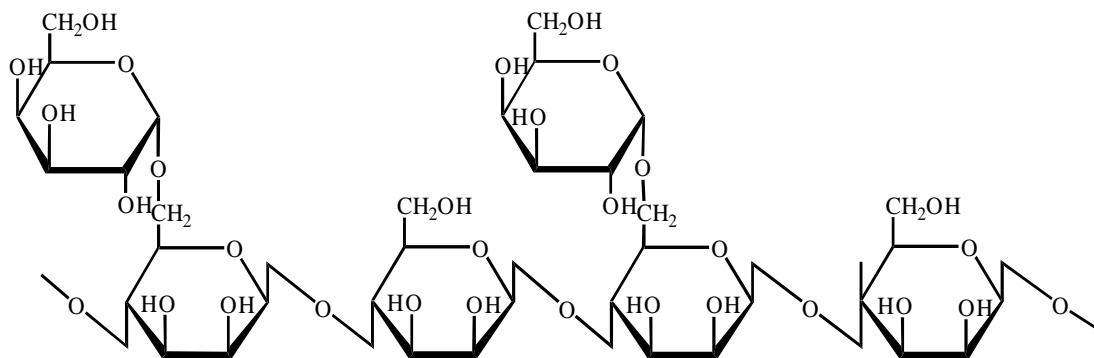


Ilustração 3: Estrutura da Goma Guar

**Justificativa e
objetivos**

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Dentre as doenças articulares, a Osteoartrite (OA) destaca-se pela prevalência e redução na qualidade de vida que provoca em pacientes por ela acometidos. A dor articular representa o principal sintoma da osteoartrite e está geralmente associada a um padrão de deambulação alterado.

Modelos animais têm sido desenvolvidos no intuito de elucidar a etiopatogenia da OA, com especial interesse nos mecanismos envolvidos na degeneração das estruturas articulares. A hiperalgesia articular, entretanto, tem sido pouco investigada nesses modelos.

O óxido nítrico (NO) é uma espécie química que participa em processos inflamatórios e na resposta hiperalgésica. O envolvimento do óxido nítrico na lesão da cartilagem na OA tem sido bem documentado. Entretanto, não são relatadas evidências quanto à participação do NO em dor articular específica na OA.

A viscosuplementação constitui uma possibilidade terapêutica na OA, na qual são utilizadas preparações de ácido hialurônico de elevado peso molecular. Controvérsias na literatura sugerem, porém, que ação do ácido hialurônico na OA se deva a mecanismos farmacológicos, não somente biomecânicos.

A utilização de ácido hialurônico na OA ainda tem um custo financeiramente elevado. Resultados recentes apontam para o uso de biopolímeros (polissacarídeos) como substitutos do ácido hialurônico na terapia da OA. A goma guar, uma galactomanana extraída de endosperma de sementes de *Cyamopsis tetragonobola*, produzem soluções aquosas viscosas. Géis reticulados de tais soluções podem apresentar viscosidade semelhante ao Hilano G-F 20, uma das preparações de ácido hialurônico comumente empregadas na OA.

Nessa perspectiva, nosso trabalho tem os seguintes objetivos:

- Caracterizar a hiperalgesia articular na fase subcrônica do modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior em ratos;
- Investigar o papel do óxido nítrico no desenvolvimento da hiperalgesia articular nesse modelo;
- Avaliar o efeito de preparações de goma guar na hiperalgesia articular nesse modelo.

Materiais e métodos

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), pesando entre 180 a 200 gramas, fornecidos pelo biotério central do Campus do Pici-UFC e pelo biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

O protocolo experimental foi submetido ao comitê de ética em experimentação animal (CEPA-UFC), sendo aprovado com o número 03/03 (vide Anexo 1).

2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

- Agitador Certomat BO (B. Braun)
- Agitador tipo vórtex Certomat BO (B. Braun)
- Balança Analítica Marte AL200
- Balança Analítica Ohaus AS2600
- Banho-maria Thermomix BM (B. Braun)
- Câmara de Neubauer (0,100/0,0025mm²)
- Centrífuga Eppendorf 5804R
- Citocentrífuga Revan 2000D
- Cuba eletroforética acrílica
- Depilador Oster Golden A5
- Dispositivo para avaliação da incapacitação articular
- Espátulas de Aço
- Estufa Olidef cz
- Fio cirúrgico Nylon monofilamentar 4-0 (Point Suture)
- Fio cirúrgico Vycril 5-0 (Ethicon)
- Fonte eletroforética Model 250 (Gibco)
- Funis de placa sinterizada G3 e G4
- Lâminas para microscopia
- Lamínulas
- Material Cirúrgico (tesouras e pinças)
- Microanalisador CARLO ERBA EA1108

- Micropipetas de 10, 200 e 1000 μ L (FinnPipette)
- Microscópio Óptico binocular acoplado à câmera fotográfica Olympus
- Papel de filtro qualitativo
- Placas de vidro formato 7,5cm x 10cm
- Provetas graduadas
- Recipientes tipo béquer e erlenmeyer
- Reômetro digital BROOKFIELD D-V III
- Secador 1500W (Braon)
- Seringas de 1mL (B-D Plastipak)
- Tubos Falcon de 15mL (B-D Plastipak)
- Tubos tipo eppendorf de 1,5mL
- Viscosímetro Capilar de Ubbelohde I – 71

3. DROGAS, REAGENTES E SOLUÇÕES

3.1. DROGAS E REAGENTES

Todos as drogas e reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas.

- Acetona (REAGEN)
- Ácido clorídrico (SYNTH)
- Ácido fosfórico (SYNTH)
- Ácido sulfúrico (SYNTH)
- Ácido Tricloro-acético (TCA) (VETEC)
- Agarose (SIGMA)
- Anticorpo de coelho anti-iNOS de rato (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- Avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA)
- Benzina de petróleo (VETEC)
- Bicarbonato de sódio (REAGEN)
- Cloral hidratado (REAGEN)

- Condroitin-4-sulfato (SIGMA)
- Condroitin-6-sulfato (SIGMA)
- Corante rápido HEMA3
- EDTA sódico (MERCK)
- Formaldeído (VETEC)
- Glutaraldeído (VETEC)
- Goma guar (SIGMA)
- Heparan-sulfato (SIGMA);
- Hilano G-F 20 (NOVARTIS)
- Indometacina (SIGMA)
- L-arginina (SIGMA)
- L-NAME (SIGMA)
- Maxatase (protease alcalina) (BIOCON INDUSTRIAL LTDA – Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- Metanol (SYNTH)
- N-(1-naftil)-etilenodiamina (SIGMA)
- β -NADPH (SIGMA)
- Nitrato redutase (SIGMA)
- Nitrito de sódio P.A. (REAGEN)
- Solução salina 0,9% (estéril e apirogênica) (GASPAR VIANA);
- Sulfanilamida (SIGMA)
- Sulfato de cobre P. A. (VETEC)
- Tartarato de sódio e potássio P. A. (VETEC)
- Tetracloridrato de diamino-benzidina (DAB, Sigma, USA)
- Trizma base (SIGMA)
- 1400W (CAYMAN CHEMICAL)

3.2. SOLUÇÕES

Agarose para eletroforese:

Agarose (SIGMA) 600mg
 Tampão PDA..... 100mL

Azul de Toluidina para 1,3-diamino-propano-acetato:

Azul de Toluidina (SIGMA)	100mg
Solução descorante.....	100mL

Líquido de Turk:

Ácido acético glacial P.A. (MERCK)	20mL
Violeta de genciana (LAB. ODALY SOARES & CIA.)	2,0mL
Água destilada (q.s.p.)	1,0L

PBS

Cloreto de Sódio (SYNTH)	8g
Cloreto de Potássio (REAGEN).....	200mg
Fosfato de sódio dibásico (SYNTH)	1,15g
Fosfato de sódio monobásico (CINÉTICA QUÍMICA)	200mg
Água destilada (q.s.p.)	1,0L

Solução de Brometo de Cetil-Trimetilamônio (CTV) 5%:

CTV (VETEC)	5g
Água destilada (q.s.p.)	100mL

Solução descorante para 1,3-diamino-propano-acetato:

Ácido acético glacial P.A. (MERCK)	10mL
Etanol (REAGEN).....	500mL
Água destilada (q.s.p.)	1,0L

Tampão 1,3-diamino-propano-acetato (PDA) pH 9,0:

1,3-diamino-propano (SIGMA)	8,5mL
Ácido acético glacial P.A. (MERCK).....	7,5mL
Água destilada (q.s.p.)	2,0L

Tampão Tris/HCl/NaCl pH 8,0:

Solução aquosa de Trizma base (SIGMA) 0,2M	5mL
--	-----

Solução aquosa de Ácido clorídrico (SYNTH) 0,2M..... 5mL
Cloreto de Sódio (SYNTH) 147mg
Água destilada (q.s.p.) 20mL

Solução 01 para método de Fehling:

Sulfato de cobre (VETEC).....34,64g
Ácido sulfúrico (SYNTH) 3 gotas
Água destilada (q.s.p)500mL

Solução 02 para método de Fehling:

Hidróxido de sódio (VETEC)60g
Tartarato de sódio e potássio (VETEC)..... 173g
Água destilada (q.s.p)500mL

4. MODIFICAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICAS DO POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR

A modificação e as análises químicas do polissacarídeo de goma guar foram realizadas pelo Laboratório de Polímeros do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará, e constituíram as seguintes etapas:

4.1. PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR

A goma guar foi purificada de contaminação protéica pela combinação do método físico seguido pelo método de Fehling, conforme descrito a seguir:

Método Físico (Wientjes et al., 2000): Goma guar foi dissolvida a quente em álcool 80%, para obtenção de solução a 5%. A goma guar precipitada foi diluída em água e centrifugada (1500g/1h). O sobrenadante foi precipitado por adição de

em um volume de acetona. O precipitado obtido foi dissolvido novamente em água destilada a 80°C e centrifugado (6000g/1,5h). A goma guar foi precipitada a partir do sobrenadante, por adição dois volumes de etanol.

Método de Fehling (Jones & Stoodley, 1966): Vinte volumes de solução aquosa de goma guar a 1% foram misturados com um volume do reagente de Fehling (1 parte da solução 01 para 1 parte da solução 02) recém-preparado. O precipitado formado foi dissolvido em 60 mL de ácido clorídrico 0,1M. Após a dissolução, a goma obtida foi precipitada com quatro volumes de etanol.

4.2. REAÇÃO DE RETICULAÇÃO DO POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR

Amostras de goma guar não purificada (GGNP) e goma guar purificada (GGP) foram reticuladas com glutaraldeído pelo seguinte procedimento (Gliko-Kabir et al., 1999): Quarenta volumes de soluções aquosa de goma guar a 0,8% em pH 2 foram postas a reagir com um volume de solução aquosa de glutaraldeído 25%. Após doze dias, o gel formado foi dialisado contra água destilada e contra uma solução de tampão fosfato 0,1M (pH = 7,3) e NaCl.

4.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS EM AMOSTRAS DE GOMA GUAR

O teor de proteína em amostras de goma guar pode ser estimado a partir da determinação do teor de nitrogênio nas mesmas, uma vez que a estrutura da goma guar (galactomanana) não possui átomos de nitrogênio. As análises elementares foram realizadas em um microanalisador CARLO ERBA EA1108, e o teor de proteínas foi calculado pelo fator de conversão igual a 5,87, utilizado para galactomananas.

4.4. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLAR VISCOSIMÉTRICA DA GOMA GUAR

A massa molar de amostras de goma guar pode ser estimada por viscometria (Robinson et al., 1982). Amostras de goma guar foram dissolvidas sob agitação magnética em água durante 24 horas, para obtenção de soluções a 0,07%. A viscosidade (η) dessas soluções foi determinada em um viscosímetro capilar de Ubbelohde I – 71, na temperatura de 25°C. A massa molar viscosimétrica (MM) foi calculada pela equação de Mark-Howink,

$$[\eta] = k.MM^a,$$

na qual as constantes a e k valem 0,72 e $3,8 \times 10^{-4}$, respectivamente.

4.5. REOLOGIA COMPARADA ENTRE DE SOLUÇÕES E GÉIS DE GOMA GUAR E HILANO G-F 20.

O comportamento reológico de amostras de soluções e géis de goma guar (ambos com concentração de goma guar igual a 0,8%) e de Hilano G-F 20 foi estudado em um reômetro digital BROOKFIELD D-V III, sob uma taxa de cisalhamento de $0,04s^{-1}$, em uma temperatura de 36°C.

5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.1. TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (modificado de Stoop et al., 2001)

Os animais foram anestesiados com éter etílico por via inalatória. Após depilação da região ventral articulação do joelho direito e anti-sepsia, a pele foi submetida a uma incisão longitudinal. Procedeu-se a uma incisão parapatelar lateral, seguida de luxação lateral da patela, proporcionando acesso ao espaço articular. O ligamento cruzado anterior foi seccionado com o auxílio de uma tesoura. O livre movimento da tíbia em relação ao fêmur, no sentido pósterio-anterior (“sinal da gaveta”) foi utilizado como controle da completa secção do ligamento. Procedeu-se à redução da luxação patelar e a articulação foi suturada com fio cirúrgico reabsorvível Vycril 5/0 (polyglactin 910 - Ethicon). A pele foi sutura com fio Nylon monofilamentar

4/0 (Point Suture), e submetida à anti-sepsia. Os pontos da sutura da pele foram retirados sete dias após a cirurgia.

Um grupo SHAM foi submetido ao procedimento cirúrgico descrito acima, exceto à transecção do ligamento cruzado anterior (Fotografia 1).

Os animais foram sacrificados em distintos períodos de evolução da doença (sete, quatorze ou vinte e oito dias).

5.2. REGISTRO DA INCAPACITAÇÃO ARTICULAR

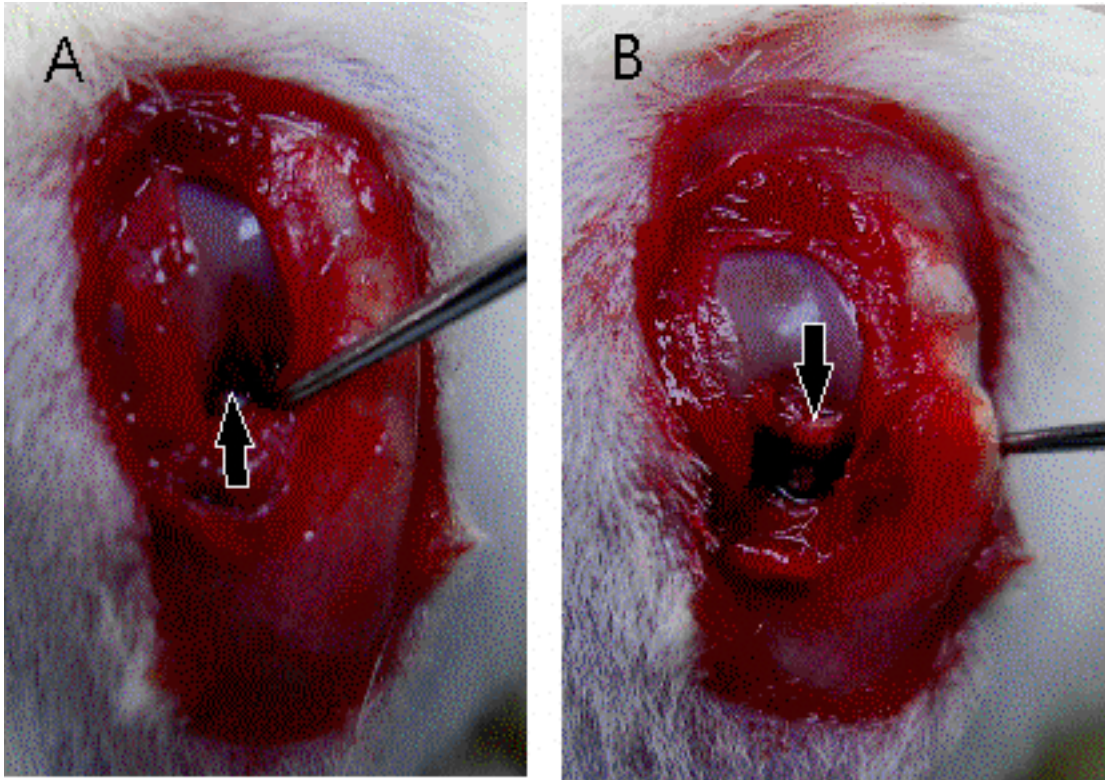
Utilizamos uma modificação do modelo de avaliação da incapacitação articular proposto por Tonussi & Ferreira (1992) (Fotografia 2). Os animais foram postos a deambular em um cilindro metálico giratório de alumínio, com 30cm de diâmetro e 50cm de largura, com capacidade para três animais por vez. O cilindro gira a uma velocidade de 3rpm. As patas traseiras do animal foram calçadas com sapatilhas metálicas especialmente desenhadas. A sapatilha direita – correspondente à articulação submetida à artrotomia – foi conectada a uma porta de entrada de dados de um microcomputador, no qual está instalado um programa de aquisição de dados. Ao tocar a superfície do cilindro, o animal fecha um circuito, que é registrado em um computador. O tempo total de registro foi de dez minutos, fornecendo em segundos o tempo durante o qual o animal permaneceu com a pata suspensa. Essa medida é denominada por tempo de suspensão da pata (TSP), considerada proporcional à dor articular. O TSP foi avaliado diariamente até o fim de sete ou vinte e oito dias.

Para a avaliação da resposta *per si* de preparações de goma guar em cavidades articulares de ratos NAIVE, o tempo total de registro foi de um minuto, e a incapacitação articular foi avaliada pelo TSP registrado a cada uma hora até a sexta hora, tempo no qual esses animais foram sacrificados.

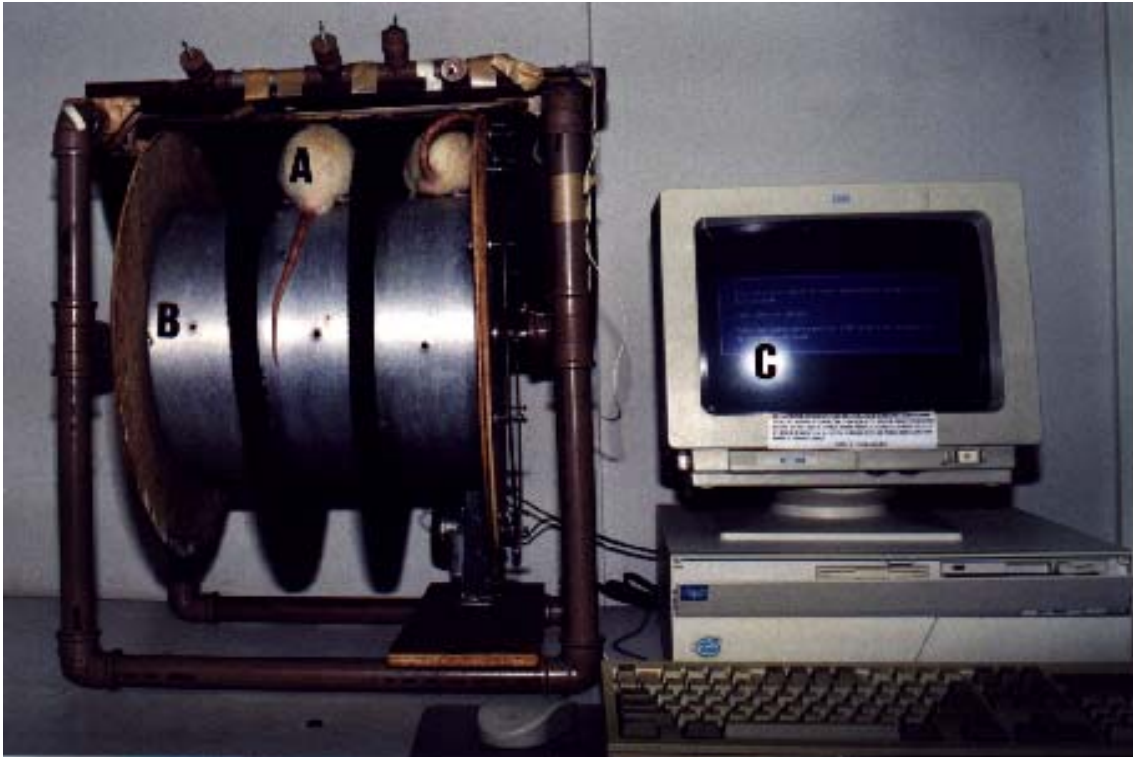
5.3. COLETA DO EXSUDATO ARTICULAR E DA MEMBRANA SINOVIAL

Os animais foram sacrificados por exsanguinação sob anestesia terminal (hidrato de cloral – 400mg/kg, i.p.). A seguir, realizou-se a lavagem das articulações,

fazendo-se duas injeções de 0,2mL de EDTA 10mM em PBS, na cartilagem articular. O exsudato articular foi coletado por aspiração e mantido em banho de gelo. A membrana sinovial foi dissecada, fixada em formalina 10% e reservada para processamento posterior (histoquímica para iNOS).



Fotografia 1: Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). O LCA está indicado pela seta. Em (A), o animal foi submetido à artrotomia, mas o LCA permanece intacto. Em (B) o LCA está seccionado.



Fotografia 2: Animais deambulando no sistema de registro da incapacitação articular. Ratos Wistar machos (A), após colocação de sapatilhas metálicas, são postos a deambular sobre um cilindro metálico (B) que gira a 3rpm. O cilindro está conectado a um microcomputador (C), no qual está instalado um programa específico para o registro do Tempo de Suspensão da Pata, em segundos, para cada animal.

5.4. ANÁLISE DA CELULARIDADE NO EXSUDATO SINOVIAL

Alíquotas do exsudato articular foram diluídas em líquido de Turk, para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Em seguida, o lavado

articular foi centrifugado (430g/10min/4°C). O precipitado celular foi ressuspenso em PBS, para determinação diferencial por coloração em HEMA3, e o sobrenadante estocado à -20°C, para posterior análise (determinação de nitrito total).

5.5. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NITRITO

A produção de NO nas articulações foi indiretamente determinada através da medida da concentração de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) no exsudato articular, utilizando-se a reação de Griess. O nitrato presente nas amostras foi convertido a nitrito por incubação com a enzima nitrato redutase 40 μL de cada amostra foram submetidos à incubação overnight a 37°C, com 40 μL de nitrato redutase e β -NADPH (nas concentrações respectivas de 0,4U/ml e 1mg/mL). Após a incubação, 80 μL do reagente de Griess (um volume de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%, para um volume de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%) foram adicionados e a absorbância foi medida por espectrofotometria (540nm). A concentração de nitrito foi determinada mediante comparação entre a absorbância das amostras e aquelas apresentadas por soluções cuja concentração de nitrito era conhecida (1,25-80 μM).

5.6. MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA PARA iNOS EM MEMBRANAS SINOVIAIS

A técnica imunohistoquímica para iNOS neste trabalho foi realizada pelo Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina – USP- Ribeirão Preto.

Membranas sinoviais de animais OA e SHAM, ambos sacrificados sete dias após cirurgia articular, e de animais NAIVE foram utilizadas para detecção da expressão da iNOS, utilizando um anticorpo de coelho anti- iNOS de rato, comercialmente disponível. Após desparafinização, os tecidos foram incubados com peróxido de hidrogênio e lavados. Os espécimes foram incubados em tampão citrato e submetidos a aquecimento brando em forno de microondas. Após bloqueio inespecífico com soro de coelho *overnigt*, as amostras foram incubadas por 2 horas com anticorpo de coelho anti-iNOS (diluído na proporção de 1:100 em PSB acrescido de soroalbumina bovina a 1%). As secções foram incubadas com um

anticorpo secundário anti-IgG de coelho ligado a biotina. O produto da reação foi detectado com complexo avidina-biotina-peroxidase e a coloração da reação foi promovida com tetracloridrato de diamino-benzidina. Os espécimes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer.

5.7. QUANTIFICAÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS (GAGs) NA CARTILAGEM ARTICULAR

5.7.1. EXTRAÇÃO DOS GAGs

Amostras de cartilagem articular extraída dos côndilos femorais foram desengorduradas em acetona e submetidas à proteólise total por maxatase (2mg/ml) em tampão Tris/HCl/NaCl, em pH 8,0. A incubação foi mantida à 56°C por 48 horas. Concluída a proteólise, corrigiu-se a concentração de NaCl para 1M, mantendo as amostras por 30 minutos à temperatura de 37°C. Seqüencialmente, ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado às amostras até obtenção de uma concentração final de 10%, após o qual as amostras foram submetidas à agitação a 4°C por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas (10.000g/15min/4°C), o precipitado foi descartado e ao sobrenadante foram acrescentados dois volumes de metanol. As amostras foram mantidas overnight à temperatura de 4°C, para precipitação dos GAGs. Após nova centrifugação (10.000g/15min/4°C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 20µL água destilada.

5.7.2. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Através da eletroforese em gel de agarose, é possível identificar e quantificar os GAG. O método foi descrito por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich & Dietrich (1976). 5µl do GAG ressuspensão em água foram aplicados em gel de agarose 0,6% em tampão PDA (pH 9,0). A migração eletroforética, realizada sob refrigeração em uma diferença de potencial de cem volts, tem aproximadamente uma hora e trinta minutos de duração. Após a migração, os GAGs foram precipitados no gel por imersão em solução de CTV (brometo de cetil-trimetilamônio) à 0,1% por

2 horas. O gel foi seco sob calor e ventilação e corado com solução hidroalcoólica ácida de azul de toluidina 0,1% por 15 minutos. O excesso de corante foi removido por uma solução descorante. A identificação do tipo de GAG foi realizada comparando-se a migração eletroforética das amostras com a de padrões conhecidos.

A quantificação dos GAGs foi estimada por densitometria (525nm), utilizando-se comparativamente padrões de GAGs conhecidos.

5.8. EFEITO INTRA-ARTICULAR DE PREPARAÇÕES DE GOMA GUAR

Goma guar não purificada (GGNP) ou de goma guar purificada (GGP), em solução, foram administradas em doses crescentes (30µg-400µg i.a.), em cavidades articulares de animais não manipulados. GGNP e GGP, em géis reticulados, foram administradas na dose de 400µg i.a.

5.9. MANIPULAÇÃO FARMACOLÓGICA

Indometacina (2mg/kg s.c.) foi administrada 30 minutos antes da transecção do LCA (intervenção profilática), e diariamente, por sete dias. L-NAME (30mg/kg i.p. duas vezes diárias) e 1400W (0,5mg/kg s.c. uma vez diária) foram administrados 30 minutos antes da transecção (intervenção profilática) ou 4 dias após a transecção (intervenção terapêutica), e diariamente até o sétimo dia. L-arginina (500mg/kg s.c.) foi administrada 30 minutos antes de L-NAME profilático. Goma guar purificada (GGP), em solução ou reticulada, e Hilano G-F 20 foram administrados no quarto dia após a transecção (intervenção terapêutica), em dose única intra-articular de 100µg.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média±e.p.m. Para comparação múltipla entre as médias de três ou mais grupos, foi utilizada a Análise de Variância

Univariada (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

IV. RESULTADOS

1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE OSTEOARTRITE POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR EM RATOS

1.1. INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA) EM RATOS

Os animais submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (grupo OA) desenvolveram incapacitação articular caracterizada pelo aumento no tempo de suspensão da pata (TSP), medido pelo Teste de Incapacitação Articular para ratos (vide acima). Valores do TSP para o grupo OA foram máximos nos três primeiros dias, mas diminuíram em seguida, permanecendo significativamente superiores aos apresentados pelo grupo SHAM (artrotomia sem ruptura do LCA) até o início da terceira semana (Figuras 1 e 2).

Determinamos a área sob o TSP versus tempo após a cirurgia articular, entre o quarto e sétimo dias. A incapacitação articular foi máxima na primeira semana, onde ocorreu um aumento de 52,4% na área sob a curva (AUC) para o grupo OA em relação ao grupo SHAM (OA: $552,9 \pm 19,7$ e SHAM: $362,7 \pm 17,9$; $p < 0,001$) (Figura 3).

A administração de indometacina, na dose de 2mg/kg/dia inibiu de forma significativa o aumento da AUC, sendo 31,8% menor que aquela apresentada pelo grupo submetido à transecção do LCA (OA) ($p < 0,001$) (Figura 3).

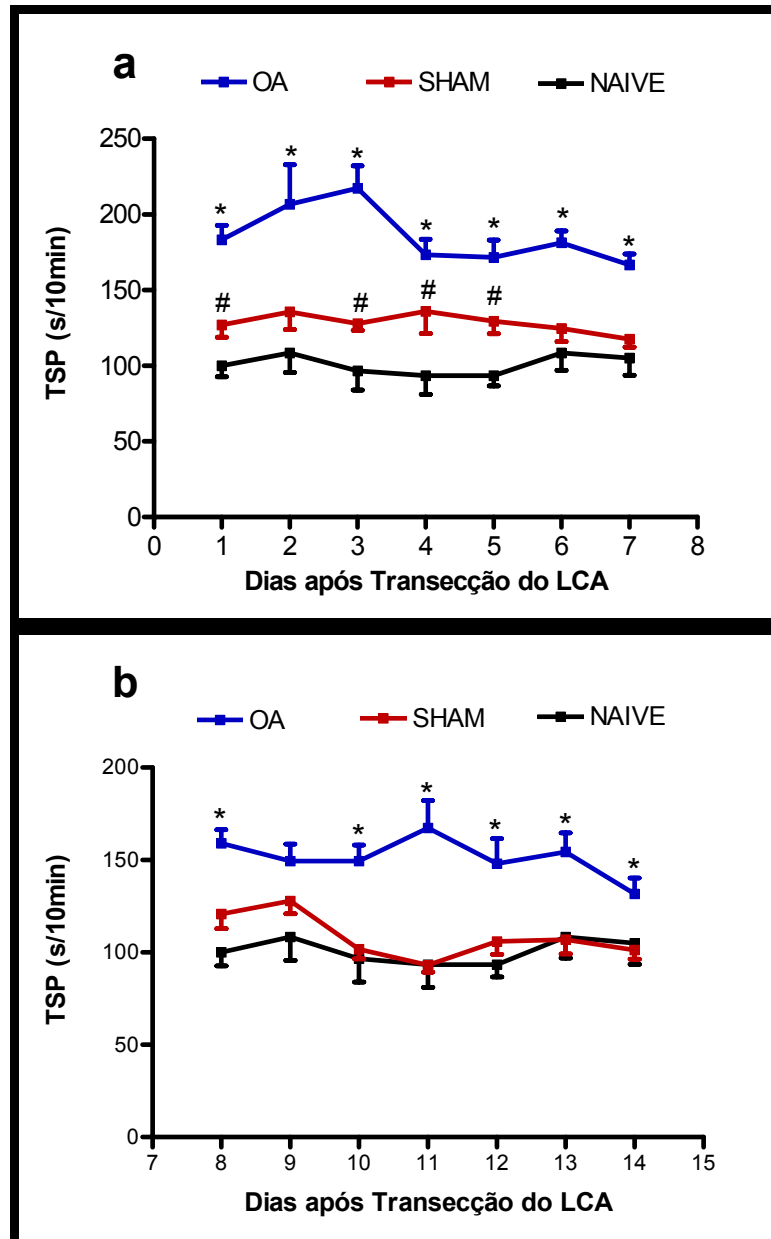


Figura 1: Cinética da incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). O grupo OA foi submetido à Transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE não foram manipulados. A incapacitação articular foi avaliada diariamente pelo Tempo de Suspensão da Pata (TSP) em segundos, até sete (a) ou quatorze dias (b) após a transecção do LCA. Os dados representam média±EPM. n=10-16 por grupo. *p<0,05 relação a SHAM, #p<0,05 em relação a NAIVE (ANOVA, seguida de Tukey).

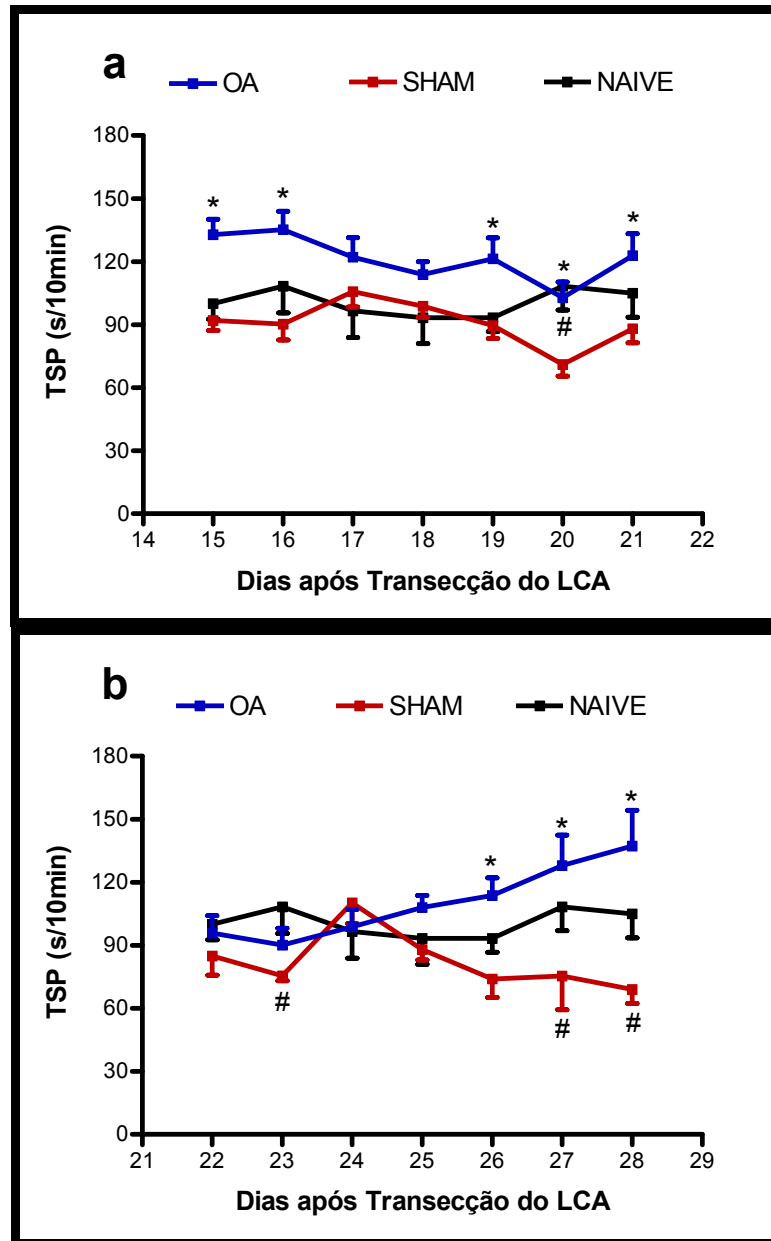


Figura 2: Cinética da incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). O grupo OA foi submetido à Transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE não foram manipulados. A incapacitação articular foi avaliada diariamente pelo Tempo de Suspensão da Pata (TSP) em segundos, até vinte e um (a) ou vinte e oito dias (b) após a transecção do LCA. Os dados representam média±EPM. n=10-16 por grupo. *p<0,05 relação a SHAM, #p<0,05 em relação a NAIVE (ANOVA seguida de Tukey).

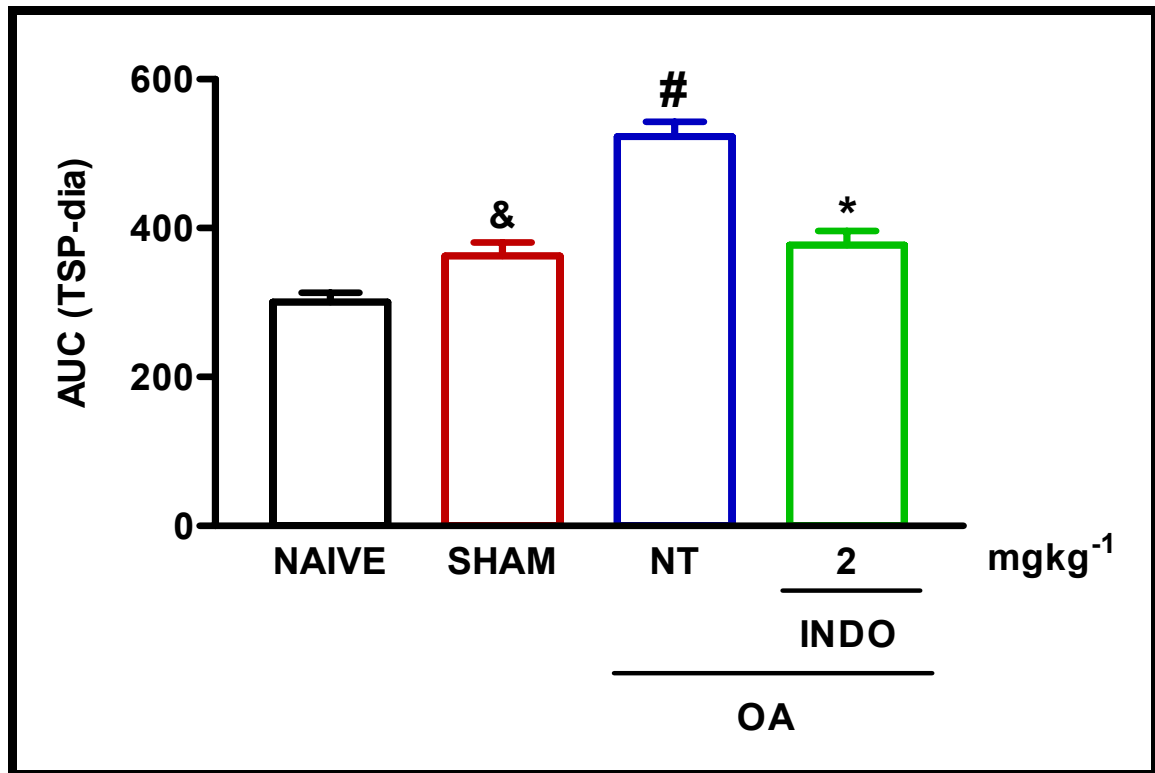


Figura 3: Efeito da administração profilática sistêmica de indometacina sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). O grupo OA foi submetido à Transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Grupo não tratado (NT) recebeu salina s.c. Indometacina (2mg/kg/dia s.c.) foi administrada trinta minutos antes da Transecção do LCA e das avaliações de incapacitação articular, registrada pelo Tempo de Suspensão da Pata (TSP) em segundos. Os dados são expressos como a área (AUC) sob o TSP *versus* tempo após cirurgia articular, entre o quarto e o sétimo dias. As barras representam média±EPM. n=6-11 por grupo. *p<0,001 em relação a NT; #p<0,001 em relação a SHAM; &p<0,05 em relação a NAIVE (ANOVA seguida de Tukey).

1.2. CELULARIDADE DO EXSUDATO ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA)

Não houve diferença significativa na contagem de leucócitos entre os grupos OA, SHAM e NAIVE, em quaisquer dos tempos estudados. Sete dias após a cirurgia articular, o número de células encontrado em 1 mm^3 de exsudato articular dos grupos OA, SHAM e NAIVE foi de 45 ± 16 células/ mm^3 , 70 ± 23 células/ mm^3 e 49 ± 12 , respectivamente. Semelhantemente ao observado em articulações NAIVE, células linfomononucleares ($\geq 80\%$) predominam no lavado articular dos grupos OA e SHAM (Figura 4).

1.3. LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CAVIDADES ARTICULARES DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA)

Os níveis de nitrito no grupo OA foram detectados em concentração maior que os encontrados no exsudato articular de animais NAIVE ($p < 0.001$) ou SHAM ($p < 0.05$), ao fim da primeira semana após a cirurgia articular (OA: $8,2\pm 1,4\mu\text{M}$; SHAM: $4,8\pm 1,0\mu\text{M}$ NAIVE: $1,1\pm 0,4\mu\text{M}$). Os níveis de nitrito em exsudatos do grupo OA apresentaram-se significativamente superiores, por até 28 dias, em relação àqueles encontrados para o grupo NAIVE (Figura 5).

1.4. QUANTIFICAÇÃO DE CONDROITIN-SULFATO TOTAL NA MATRIZ DA CARTILAGEM ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA)

Uma concentração significativamente elevada ($p < 0,05$) de condroitin-sulfato foi encontrada na matriz da cartilagem de animais do grupo OA aos quatorze dias após a ruptura do LCA, quando comparados a cartilagens do grupos SHAM de mesmo período (OA: $21, \pm 2,2\mu\text{g}/\text{mg}$, SHAM: $12,2\pm 1,7\mu\text{g}/\text{mg}$). Não houve diferença na concentração de condroitin-sulfato em cartilagens do grupo SHAM medida aos

sete, quatorze ou vinte e oito dias após a artrotomia, em comparação com o grupo NAIVE. (Figura 6).

1.5. IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A NO SINTASE INDUZIDA (iNOS) EM SINÓVIAS DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA)

A atividade da enzima NO sintase induzida (iNOS) no tecido sinovial foi determinada de maneira semi-quantitativa através de marcação imunohistoquímica. Foi encontrado um aumento da atividade da iNOS na sinóvia dos animais do grupo OA, sacrificados sete dias após a transecção do LCA, quando comparados a espécimes de animais SHAM e NAIVE. A análise permitiu observar que a marcação era mais intensa em células da superfície da membrana sinovial, em relação às áreas mais profundas. (Figura 7).

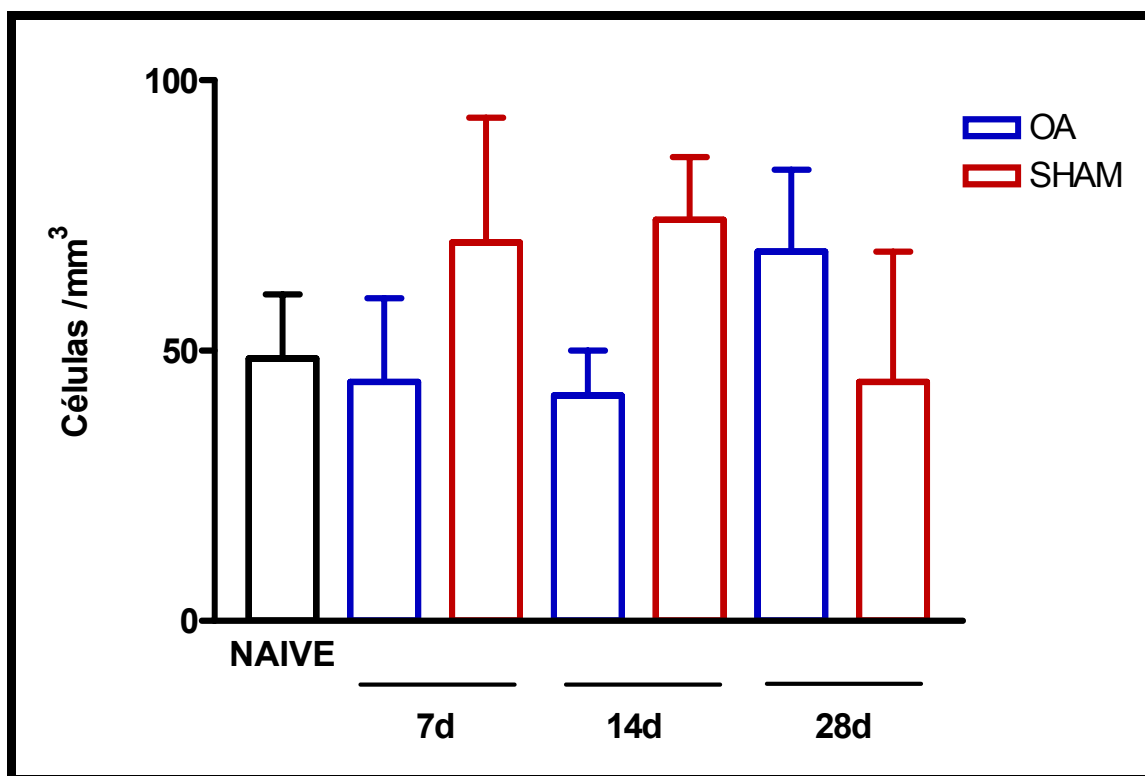


Figura 4: Celularidade do exsudato articular de animais sujeitos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). O grupo OA foi submetido à transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Os animais foram sacrificados ao fim de sete, quatorze ou vinte e oito dias. O número total de leucócitos foi quantificado no exsudato articular mediante contagem em câmara de Neubauer. Os dados representam média±EPM. n=6 por grupo (ANOVA seguida de Tukey).

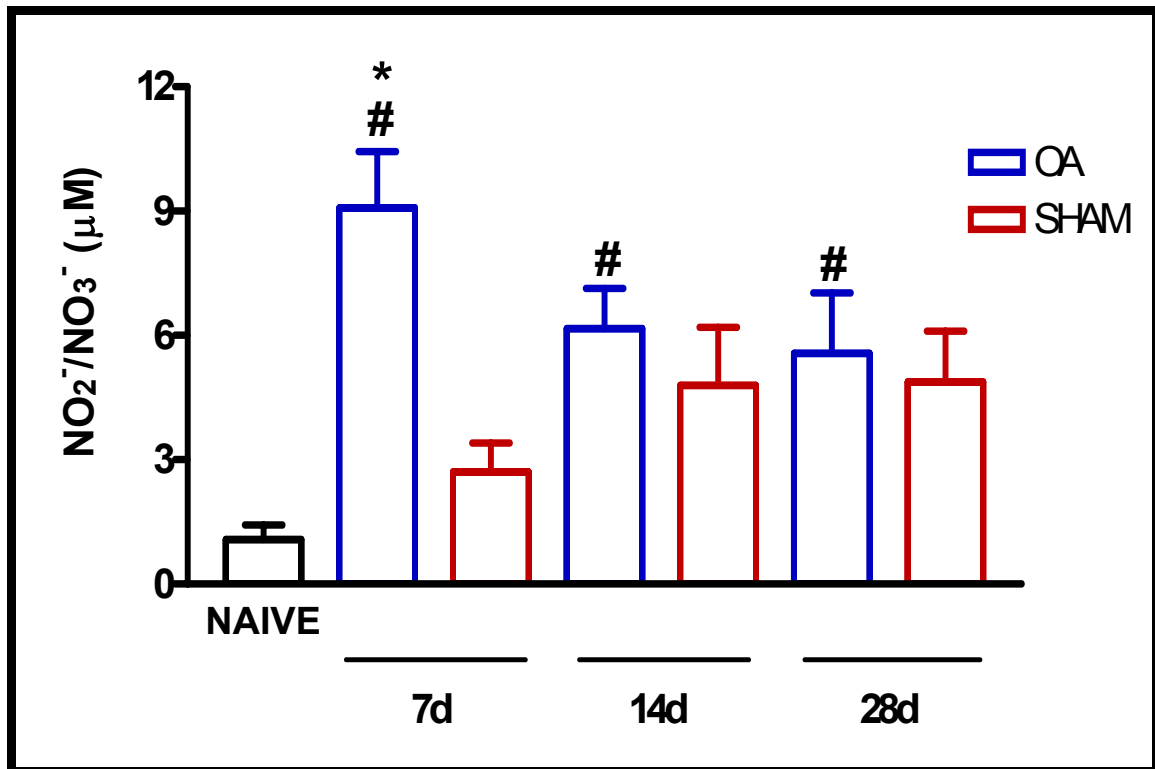


Figura 5: Liberação de NO na cavidade articular de ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). O grupo OA foi submetido à transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Os animais foram sacrificados ao fim de sete, quatorze ou vinte e oito dias. A liberação de NO foi determinada indiretamente pela técnica de Griess, através da detecção da concentração total de nitrito no lavado articular tratado com nitrato redutase (de *Aspergillus sp*) em presença de NADPH. Os dados representam média±EPM. n=6 por grupo. *p<0.05 em relação a SHAM de mesmo período; #p<0.05; em relação a NAIVE (ANOVA seguida de Tukey).

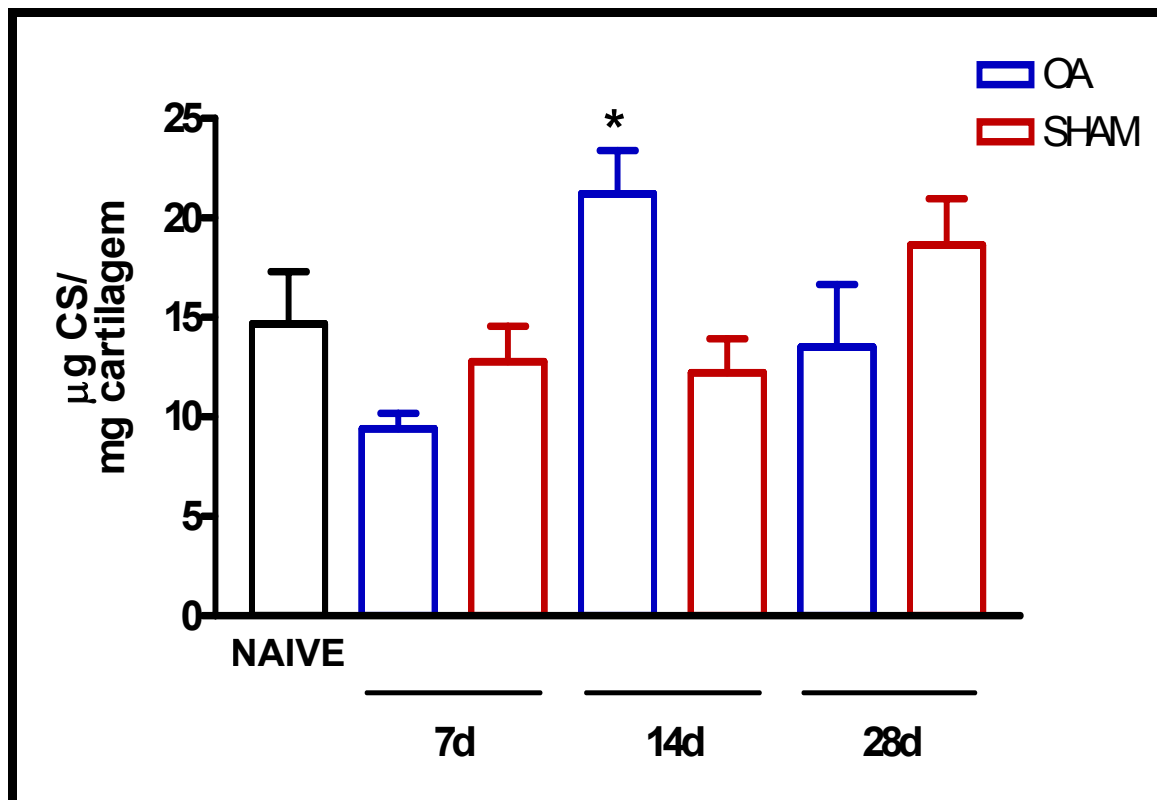


Figura 6: Concentração de Condroitin-sulfato (CS) total na matriz da cartilagem articular de ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA)r. O grupo OA foi submetido à transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Os animais foram sacrificados ao fim de sete, quatorze ou vinte e oito dias. As cartilagens dos côndilos femorais foram degradadas por protease alcalina e os glicosaminoglicanos liberados foram separados eletroforicamente e quantificados por comparação a padrões de concentrações conhecidas. Os dados representam média±EPM. n=6 por grupo. *p<0,05 em relação a SHAM de mesmo período (ANOVA seguida de Tukey).

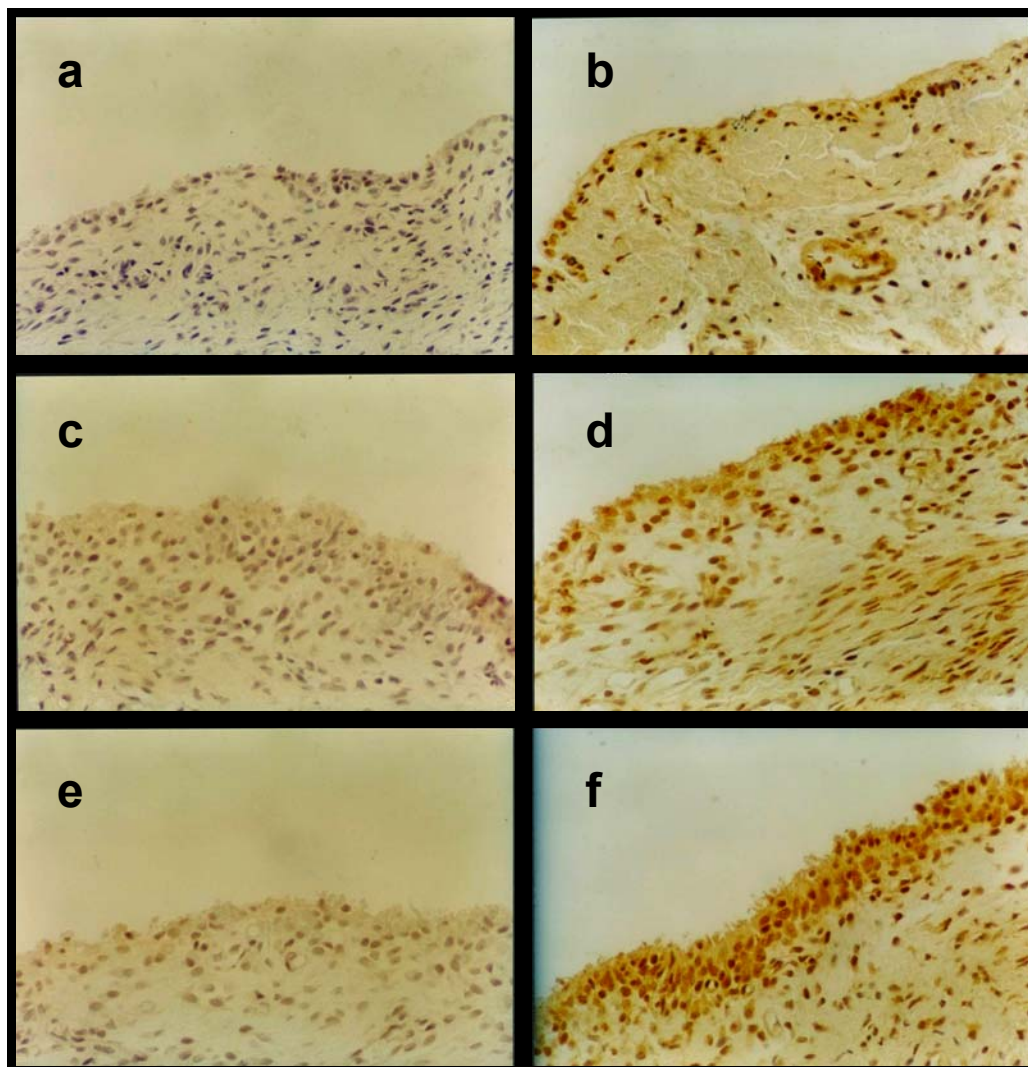


Figura 7: Fotomicrografia de tecidos sinoviais marcado por imunohistoquímica para a iNOS. O grupo OA foi submetido à transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Os animais foram sacrificados ao fim de sete dias. As figuras **a**, **c** e **e** correspondem respectivamente a sinóvias NAIVE, SHAM e OA incubadas na ausência do anticorpo primário anti-iNOS. As figuras **b**, **d** e **f** correspondem respectivamente a sinóvias NAIVE, SHAM e OA incubadas na presença de anticorpo primário anti-iNOS. Os espécime foram fotografados sob aumento de 400 vezes.

2. MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA POR INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO DA HIPERALGESIA ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR

2.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PROFILÁTICA SISTÊMICA DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO (L-NAME E 1400W) SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LCA

A administração profilática de L-NAME ou 1400W inibiu de forma significativa a incapacitação articular, determinada pela área sob o TSP *versus* o tempo após cirurgia articular, entre o quarto e o sétimo dias. L-NAME e 1400W reduziram em 28,8% e 28,2%, respectivamente, a área sobre a curva (AUC) apresentado pelo grupo submetido à transecção do LCA (OA), durante a primeira semana (Figura 8). Esse efeito foi revertido pela co-administração de L-arginina (500mg/kg/d) e L-NAME (30mg/kg/d) ao passo que L-arginina isoladamente foi desprovida de efeito.

2.2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA TERAPÊUTICA DE INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÓXIDO NÍTRICO (L-NAME E DE 1400W) SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LCA

A administração de L-NAME ou de 1400W, a partir do quarto dia (intervenção terapêutica) após a indução do modelo, não alterou a incapacitação articular, quando comparado a animais do grupo OA que receberam o veículo (Figura 9).

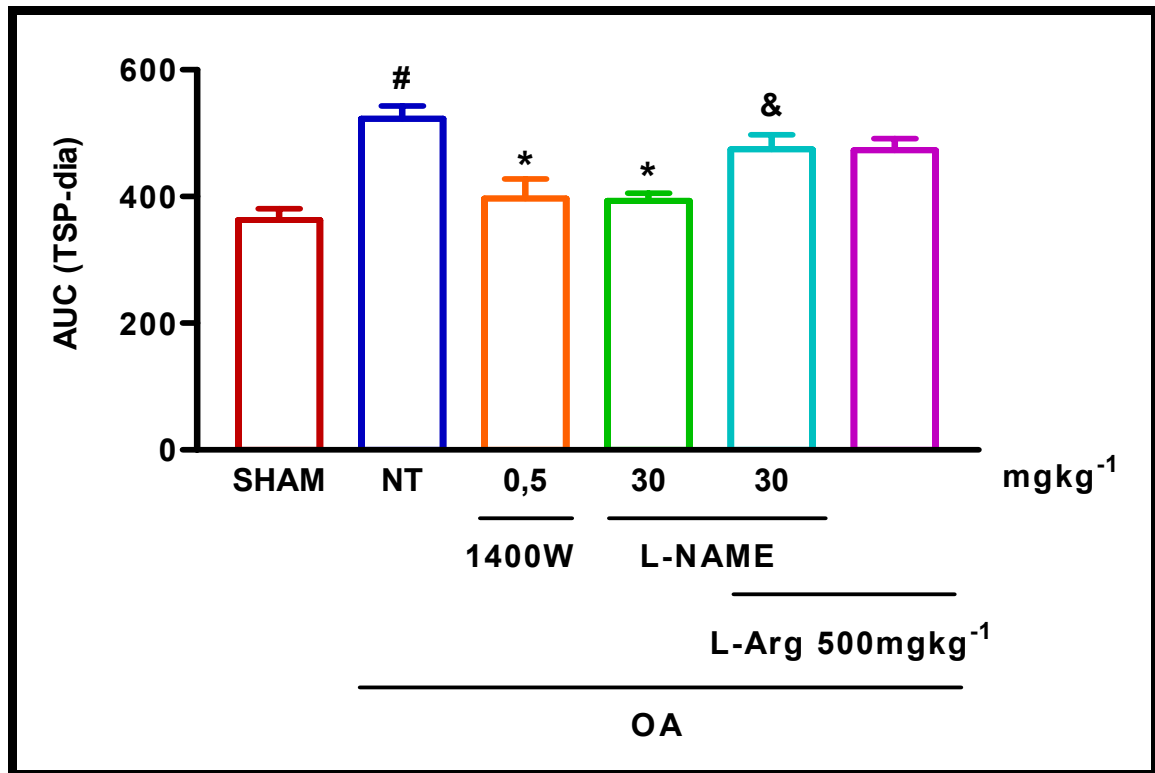


Figura 8: Efeito da administração profilática sistêmica de L-NAME ou 1400W sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). O grupo OA foi submetido à transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Grupo NT recebeu salina i.p. L-NAME (30mg/kg i.p., a cada doze horas) ou 1400W (0,5mg/kg s.c. a cada vinte e quatro horas) foram administrados trinta minutos antes da secção do LCA e das avaliações de incapacitação articular, registrada pelo Tempo de Suspensão da Pata (TSP) em segundos. L-arginina (500mg/kg s.c.) foi administrada trinta minutos antes do L-NAME. Os dados são expressos como a área (AUC) sob o TSP *versus* tempo após cirurgia articular, entre o quarto e o sétimo dias. As barras representam média±EPM. n=5-11 por grupo. *p<0,001 em relação a NT; #p<0,001 em relação a SHAM; &p<0,01 em relação a L-NAME (ANOVA seguida de Tukey).

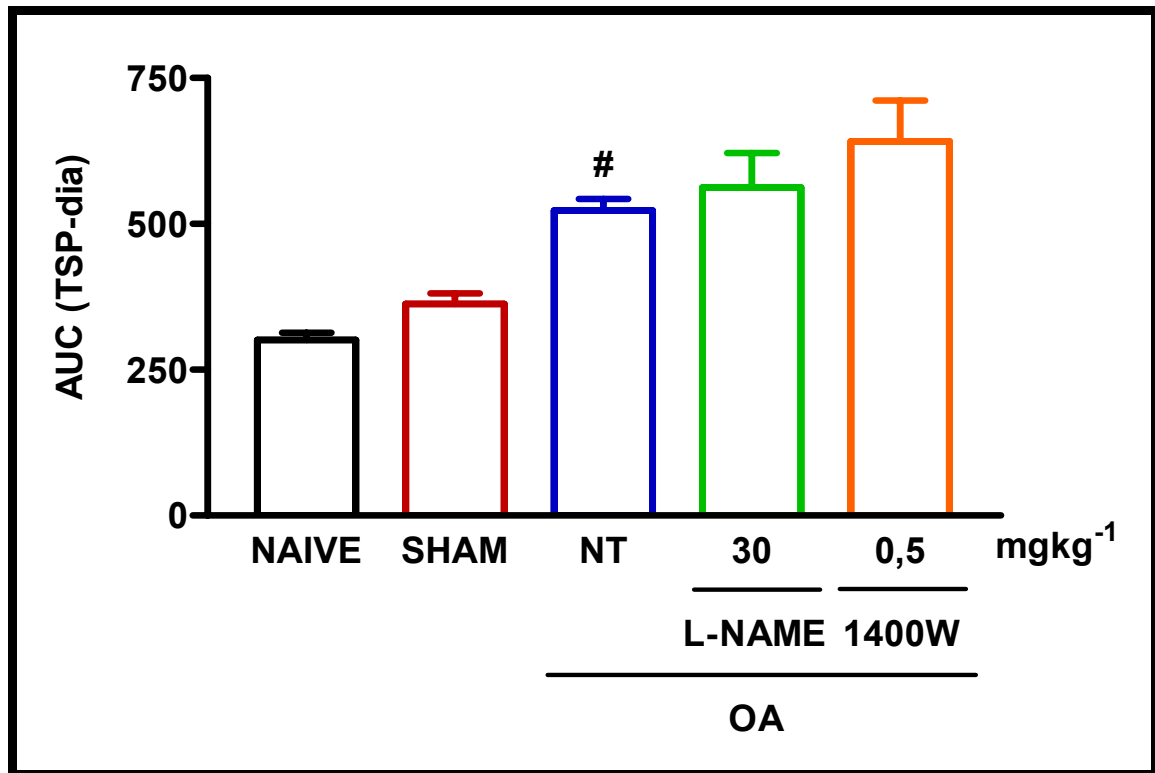


Figura 9: Efeito da administração terapêutica sistêmica de L-NAME e 1400W sobre o pico de incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA). O grupo OA foi submetido à Transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Grupo NT recebeu salina s.c. L-NAME (30mg/kg i.p., a cada doze horas) ou 1400W (0,5mg/kg s.c. a cada vinte e quatro horas) foram administrados entre o quarto e o sétimo dias após a cirurgia articular. Os dados são expressos como a área (AUC) sobre o TSP *versus* tempo após cirurgia articular, entre o quarto e o sétimo dias. As barras representam média±EPM. n=5-11 por grupo. [#]p<0,01 em relação a SHAM (ANOVA seguida de Tukey).

3. ESTUDO QUÍMICO DO POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR E DO HILANO G-F 20

3.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CONTAMINAÇÃO PROTEÍCA EM AMOSTRAS DE GOMA GUAR

Em estudos preliminares, obtivemos que a Goma Guar, da forma comercialmente disponível, promovia incapacitação articular e influxo celular na cavidade articular (vide abaixo). No intuito de excluir a contaminação protéica como responsável por essas ações da Goma Guar, procedemos à sua purificação, que consistiu na eliminação de proteína na Goma Guar. A Goma Guar em sua forma comercialmente disponível, que chamaremos de não purificada (GGNP), apresentou um teor de nitrogênio igual a 0,62%, determinado por análise elementar. A purificação da GG obtida pela associação dos métodos físico e Fehling (GGP), tornou indetectável o nitrogênio, sugerindo eliminação total de proteína contaminante. (Tabela 1). O teor de proteína nessas amostras foi estimado mediante um fator de conversão igual a 5,87, utilizado para galactomananas.

3.2. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR VISCOSIMÉTRICA DE AMOSTRAS DE GOMA GUAR

A goma guar purificada pelos método físico seguido pelo método de Fehling (GGP) apresenta viscosidade intrínseca (η) reduzida em relação à GGNP (5,2 dL/g e 12,8 dL/g, respectivamente), determinada em soluções de concentração igual a 0,07% (Tabela 2). A massa molar viscosimétrica (MM) estimada pela equação de Mark - Howink a partir de valores de viscosidade intrínseca, foi 3,5 vezes inferior para a GGP em relação a GGNP ($5,5 \times 10^5$ g/mol e $1,9 \times 10^6$ g/mol, respectivamente).

3.3. ESTUDO REOLÓGICO COMPARATIVO ENTRE GOMA GUAR EM SOLUÇÃO OU GEL RETICULADO E HILANO G-F 20

Os géis reticulados a partir de soluções de goma guar 0,8%, não purificada (gGGNP) ou purificada (gGGP), apresentaram viscosidade em mesma ordem de grandeza àquela apresentada pelo Hilano G-F 20 (gGGNP: 140Pa x s; gGGP: 116Pa x s; Hilano G-F 20: 169Pa x s), determinada sob uma taxa de cisalhamento de $0,04s^{-1}$, à temperatura de 36°C (Tabela 3). Essas preparações na forma de gel apresentaram viscosidade em ordem de grandeza superior às obtidas em soluções de goma guar (sGGNP: 3,64Pa x s; sGGP: 2,78Pa x s).

4. EFEITO DE PREPARAÇÕES DE GOMA GUAR EM CAVIDADES ARTICULARES DE RATOS

A administração de goma guar não purificada (GGNP) em solução provocou incapacitação articular dose-dependente, máxima entre a terceira e quarta hora. Entretanto, soluções de goma guar purificada (GGP) não provocaram incapacitação articular quando comparados a animais controle (salina i.a.) (Figura 10). Valores de TSP para soluções de GGNP diferem significativamente ($p<0,01$) daqueles obtidos pela solução de GGP para a dose de 400µg intra-articular (GGNP: $32,95\pm 4,05s$ e GGP: $17,91\pm 1,71s$).

A incapacitação articular foi maior em animais que receberam goma guar não purificada na forma de gel (gGGNP), os quais apresentaram valores de TSP significativamente superiores ($p<0,001$) aos apresentados pela goma guar purificada não purificada na forma de solução (sGGNP) (GGNP: $49,13\pm 4,72s$ e sGGNP: $32,95\pm 4,05s$).

De maneira similar, a administração intra-articular de soluções de goma guar não purificada (GGNP) provocou influxo celular dose-dependente, um efeito não apresentado por soluções de goma guar purificada (GGP) (Figura 11). O influxo celular foi maior em cavidades articulares que receberam goma guar não purificada na forma de gel (GGNP: $1,969\pm 0,331 \times 10^4$ células/mm³).

Tabela 1: Teor de proteína em amostras de goma guar

Amostra	Teor de nitrogênio (%)	Teor de proteína (%)
GGNP	0,62	3,64
GGP	0	0

Amostras de goma guar não purificada (GGNP) e de goma guar purificada pelo método físico seguido pelo método de Fehling (GGP), foram submetidas à análise elementar em microanalisador CARLO ERBA EA1108, para determinação do teor de nitrogênio. O teor de proteínas foi estimado utilizando-se um fator de conversão igual a 5,85.

Tabela 2: Viscosidade intrínseca (η) e massa molar viscosimétrica (MM) para soluções de amostras de goma guar a 0,07%

Amostra	Viscosidade Intrínseca [μ]	Massa molar (g/mol)
GGNP	12,8 dL/g	$1,9 \times 10^6$
GGP	5,2 dL/g	$5,5 \times 10^5$

Amostras de goma guar não purificada (GGNP) e de goma guar purificada pelo método físico seguido pelo método de Fehling (GGP) foram dissolvidas em água para obtenção de soluções com concentração igual a 0,07%. A viscosidade intrínseca dessas soluções foi determinada em viscosímetro de capilar de Ubbelohde I – 71, e a massa molar foi estimada pela equação de Mark-Howink.

Tabela 3: Viscosidades de amostras de goma guar em solução ou reticulada (gel), e do Hilano G-F 20.

Amostra	Viscosidade (Pa x s)
sGGNP	3,64
sGGP	2,78
gGGNP	140
gGGP	116
Hilano G-F20	169

Soluções aquosas a 0,8% foram preparadas com Amostras de goma guar não purificada (sGGNP) e de goma guar purificada pelo método físico seguido pelo método de Fehling (sGGP). Géis reticulados foram preparados à mesma concentração, para amostras de goma guar não purificada (gGGNP) ou purificada pelos métodos físico seguido de Fehling (gGGP). As viscosidades dessas preparações e do Hilano G-F 20 foram determinadas em reômetro digital BROOKFIELD D-V III, sob uma taxa de cisalhamento de $0,04s^{-1}$, em uma temperatura de 36°C.

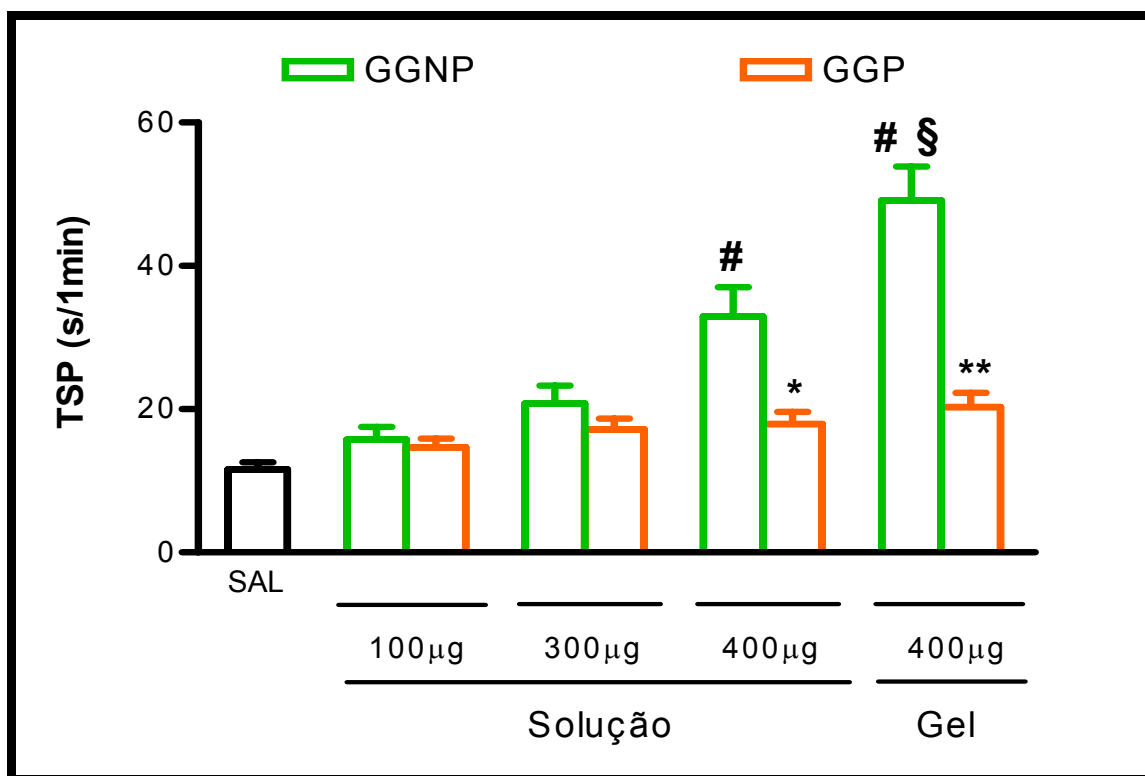


Figura 10: Efeito da administração intra-articular de preparações de GG sobre a incapacitação articular em joelhos de ratos. GG não purificada (GGNP) ou purificada pelos métodos físico + Fehling (GGP) foi administrada como solução (30-400µg i.a.), ou gel reticulado (400µg i.a.). Animais controle receberam salina i.a. A incapacitação articular foi determinada pelo valor máximo entre a 3ª e 4ª horas. Os dados representam média±EPM. #p<0,001 em relação a salina; *p<0,01; **p<0,001 em relação a GGNP, na mesma dose; §p<0,001 em relação a GGNP 400µg em solução. n=6 para todos os grupos (ANOVA seguida de Tukey).

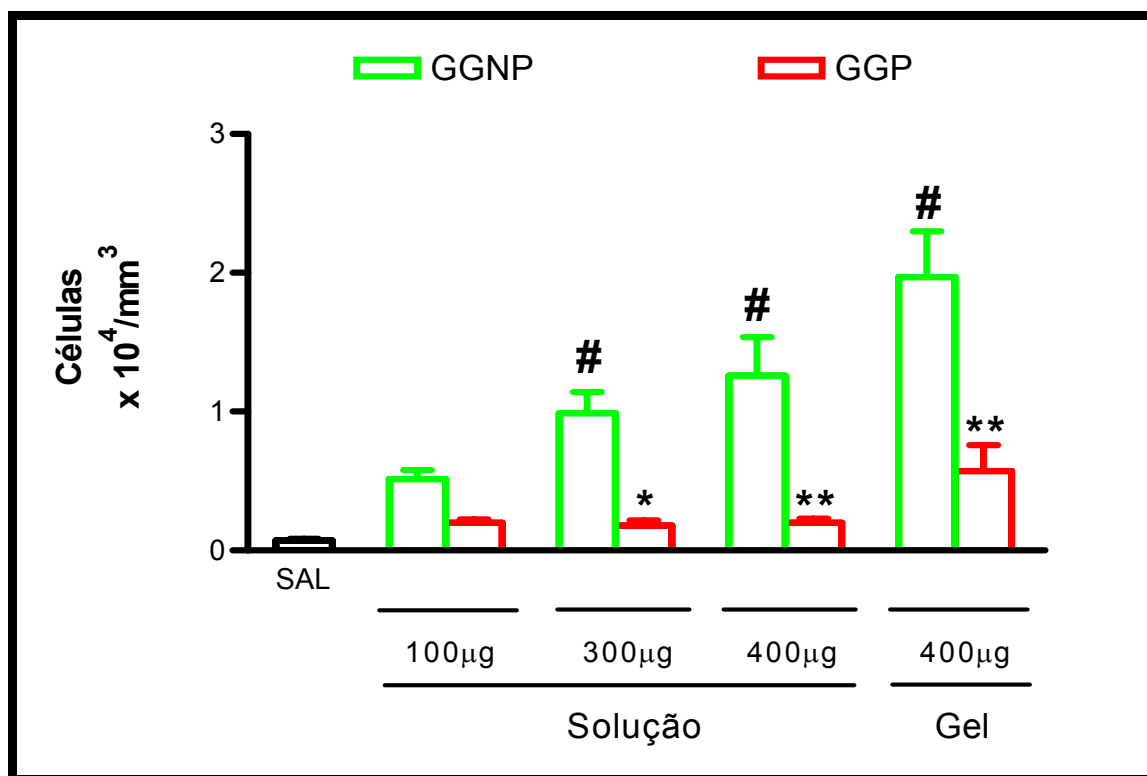


Figura 11: Efeito da administração intra-articular de preparações de GG sobre a celularidade em joelhos de ratos. GG não purificada (GGNP) ou purificada pelos métodos físico + Fehling (GGP) foi administrada como solução (30-400µg i.a.), ou gel reticulado (400µg i.a.). Animais controle receberam salina i.a. A contagem total de leucócitos no exsudato articular foi realizada 6 horas após administração intra-articular. Os dados representam média±EPM. #p<0,001 em relação a salina; *p<0,01; **p<0,001 em relação a GGNP, na mesma dose. n=6 para todos os grupos (ANOVA seguida de Tukey).

5. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR TERAPÊUTICA DE GOMA GUAR (GEL E SOLUÇÃO) E DO HILANO G-F 20 SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LCA

Na prática clínica, o Hilano G-F 20 é utilizado como administrações semanais, em pacientes portadores de osteoartrite, principalmente de joelhos, que apresentem mínimo ou nenhum derrame articular. No presente estudo, administramos diariamente o gel de Goma guar purificada, a partir de 3 dias de transecção do LCA. Nessa estratégia, obtivemos aumento da incapacitação articular, quando comparado a animais do grupo OA não tratados. Considerando que as injeções diárias a partir de 3 dias de indução do modelo de OA, por trauma local ou por aumento de pressão intra-articular, pudessem estar promovendo esse incremento na incapacitação articular, decidimos fazer uma administração única da goma guar e observar o efeito nos dias subsequentes. A figura 12 mostra que a goma guar purificada pelos métodos físico seguido de Fehling (GGP), em gel ou solução, assim como o Hilano G-F 20, na dose de 100µg intra-articular, no quarto dia após a secção, reduziram a incapacitação articular observada em animais submetidos à transecção do LCA. O efeito de GGP em solução e Hilano G-F 20 foram observados a partir do quarto dia, enquanto o efeito de GGP em gel, a partir do quinto dia. Goma guar em gel ou solução e Hilano G-F 20 reduziram em 34,2%, 32,3%, e 34,2%, respectivamente, a área sob a curva (AUC) para grupo submetido à transecção do LCA (OA)(Figura 13). Interessante salientar que a inibição da incapacitação articular obtida pelo gel ou pela solução de goma guar foram absolutamente semelhantes ao resultado obtido com o Hilano G-F 20.

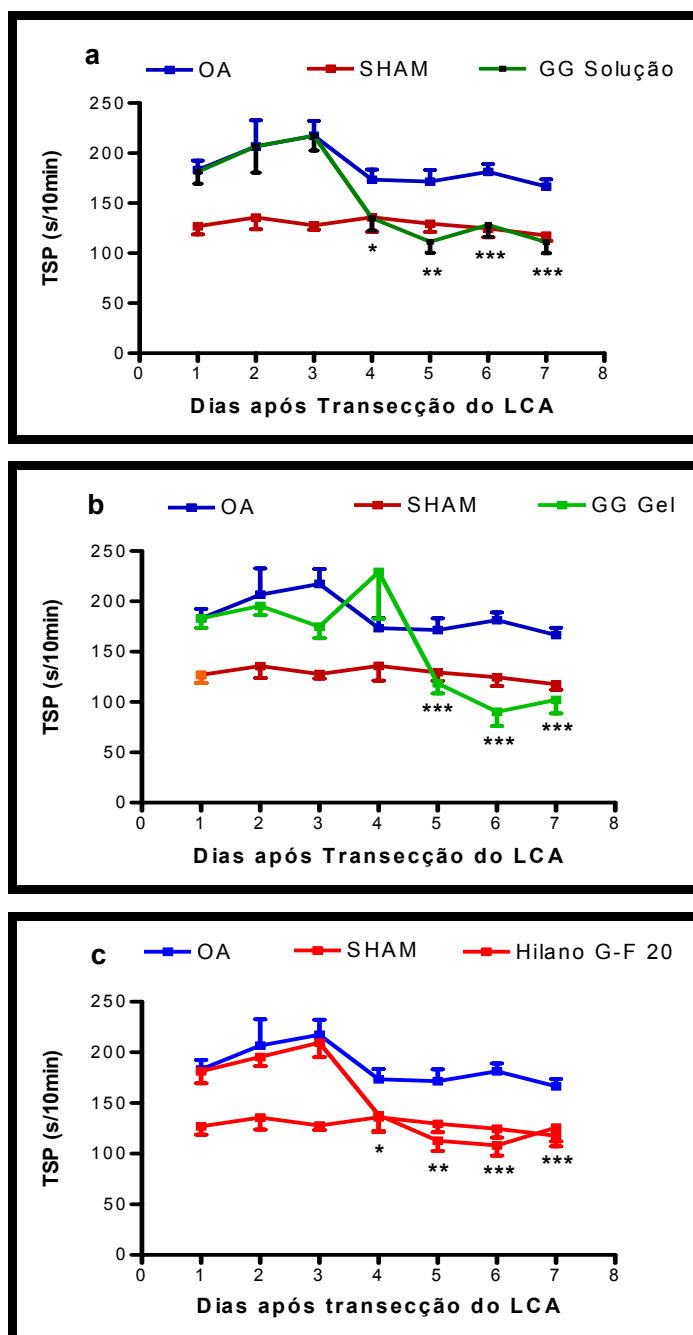


Figura 12: Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução (a) ou reticulada (gel) (b) e Hilano G-F 20 (c) em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (LCA)– curso temporal. O grupo OA foi submetido à Transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Grupo NT recebeu salina i.a. GG (100µg i.a., gel ou solução) e Hilano G-F 20 (100µg i.a.) foram administrados no quarto dia após a cirurgia articular. A incapacitação articular foi avaliada diariamente pelo Tempo de Suspensão da Pata (TSP) em segundos, até sete dias após a transecção do LCA Os dados representam média±EPM. n=5-12 por grupo. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 em relação a OA; #p<0,001 em relação a SHAM (ANOVA seguida de Tukey).

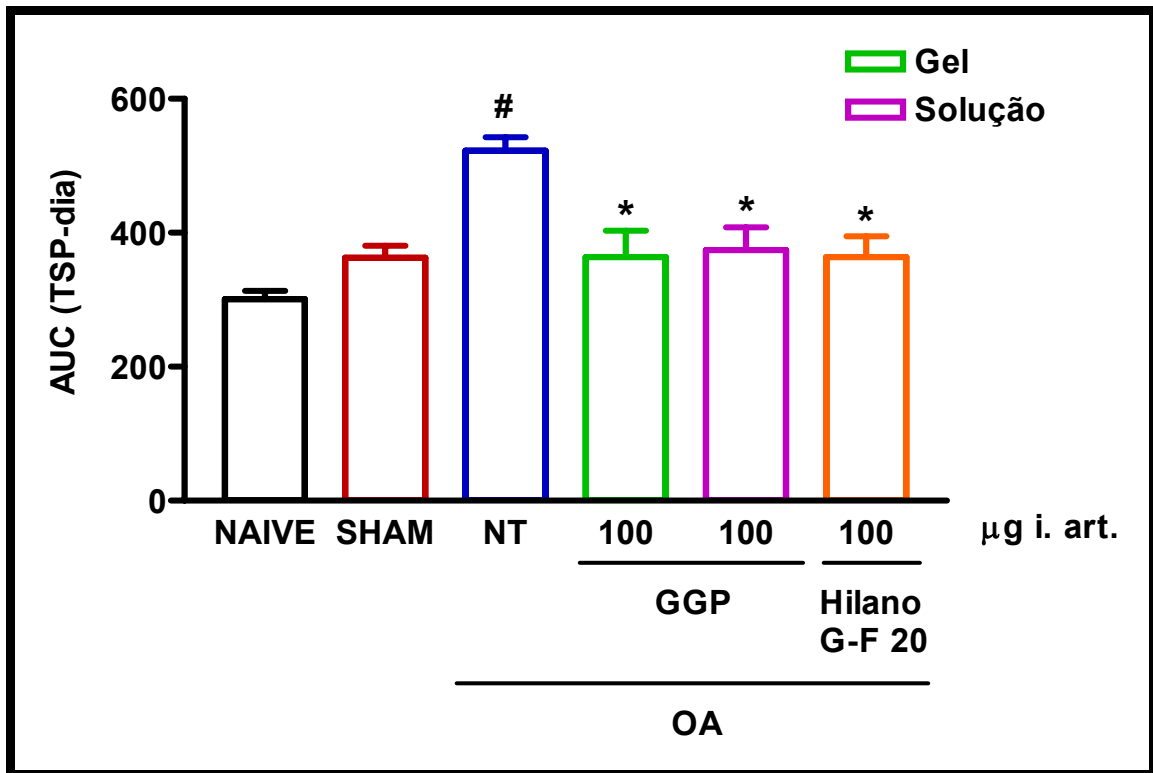


Figura 13: Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução ou reticulada (gel) e Hilano G-F 20 sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção fazem Ligamento Cruzado Anterior (LCA) . O grupo OA foi submetido à Transecção do LCA. O grupo SHAM foi submetido à artrotomia, sem transecção do LCA. Animais NAIVE são controles não manipulados. Grupo NT recebeu salina i.a. GG (100µg i.a., gel ou solução) e Hilano G-F 20 (100µg i.a.) foram administrados no quarto dia após a cirurgia articular. Os dados são expressos como a área (AUC) sob o TSP *versus* tempo após cirurgia articular, entre o quarto e o sétimo dias. As barras representam média±EPM. n=5-11 por grupo *p<0,001 em relação a NT; #p<0,001 em relação a SHAM (ANOVA seguida de Tukey).

Discussão

V. DISCUSSÃO

1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE OSTEOARTRITE POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR EM RATOS

1.1. INCAPACITAÇÃO ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA) EM RATOS

Na execução do presente trabalho, tivemos por objetivo principal a caracterização de um modelo de osteoartrite em ratos, que reproduzisse distúrbios de deambulação relacionados à dor articular sofrida por pacientes portadores desta patologia (Horwitz et al., 1999).

Em nosso laboratório, é-nos familiar a utilização do teste de incapacitação articular para ratos, proposto inicialmente por Tonussi & Ferreira (1992), e adaptado às nossas condições por Magalhães et al. (1997). Nesse teste, os animais são postos a deambular em um cilindro giratório durante um minuto, sendo registrado o tempo de suspensão da pata, ou seja, o período de tempo durante o qual o animal deixa de tocar a pata acometida no cilindro. No presente estudo, expandimos o período de observação para dez minutos. Essa adaptação deveu-se à pequena diferença do TSP entre animais submetidos à transecção do LCA e animais falso-operados (SHAM), se tomássemos a medida em um minuto, obtida em estudos preliminares. Admitindo que a inflamação associada à osteoartrite seria menos intensa que a observada na artrite por zymosan ou carragenina, modelos com os quais temos grande familiaridade (Rocha et al., 1999; Magalhães et al., 1997) decidimos aumentar o tempo de observação para dez minutos no modelo de TLCA, a fim de melhor definir diferenças entre os animais do grupo experimental e os falso-operados.

Observamos que ratos submetidos à transecção do LCA apresentaram alteração na deambulação normal, com elevação no Tempo de Suspensão da Pata. Valores de TSP para ratos submetidos à transecção do LCA foram significativamente superiores, durante dezesseis dias seguidos, aos apresentados por animais SHAM (artrotomia sem transecção do LCA). A incapacitação articular observada em animais deficientes do LCA foi máxima durante os primeiros sete dias.

É sabido que estabilidade da articulação de joelhos é dependente do estado preservado das estruturas componentes, tais como meniscos e ligamentos

(Sakane et al., 1999) e que, dentre essas estruturas, o ligamento cruzado anterior estabiliza a junta por reduzir a intensidade dos movimentos translacional anterior e rotacional tibiais (Li et al, 2002).

A desestabilização articular decorrente da transecção do LCA é comumente acompanhada por distúrbios de deambulação. Em gatos, observou-se que animais cujo LCA havia sido seccionado aplicaram força de impulso vertical menos intensa contra o solo, quando comparados a animais normais. Nesses animais, as fases de flexão inicial e extensão propulsiva foram pouco evidentes (Suter et al., 1998). Também cães portadores de juntas submetidas à ruptura do LCA por radiofrequência também aplicaram reduzida força de impulso vertical contra o solo e apresentaram translação ântero-posterior e rotação médio-lateral intensas, compatíveis com instabilidade articular (Lopez et al., 2003).

Tais distúrbios de deambulação em animais desprovidos do LCA poderiam ser entendidos como um comportamento defensivo de proteção à junta cirurgicamente desestabilizada. Para cães submetidos à transecção do LCA, encontrou-se que a redução da força de reação contra o solo parece ser dependente da integridade de vias nervosas aferentes. A ganglionectomia ipsilateral da raízes dorsais, realizada previamente à transecção do LCA, reverte parcialmente a redução observada força de impulso vertical contra o solo (O'Connor et al., 1999), sugerindo que a cessação de estímulos relacionados à dor permita a esses animais aplicar uma sobrecarga de peso à junta instável, ou que, em raciocínio inverso, cães deficientes para o LCA não sobrecarreguem a junta instável devido a estímulos sensoriais de natureza álgica.

Ao nosso conhecimento, apenas duas publicações apresentam métodos de avaliação de dor articular em osteoartrite. Cães portadores de displasia de quadril apresentaram distúrbios de locomoção e sinais de dor avaliados por escala visual analógica (Hielm-Bjorkman et al. 2003). Apesar da relevância clínica deste achado, tal modo de avaliação de dor é passível a erro inerente ao observador.

Kobayashi et al. (2003), utilizando um modelo de OA induzida por injeção intra-articular de iodo-acetato de sódio em ratos, observaram a redução dose-dependente da força aplicada pela pata em que se induziu a OA, e atribuíram a esse comportamento a ocorrência de hiperalgesia articular.

Sabendo que as drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINES) são utilizadas na prática clínica para o alívio da dor articular presente em pacientes de

OA (Lane, 1997; Creamer, 2000), decidimos validar esse método de estudo da hiperalgesia articular na OA, que ora propomos, mediante modulação farmacológica com antagonistas e/ou inibidores de substâncias reconhecidas como hiperalgênicas. Para avaliar se a incapacitação articular no modelo de transecção do LCA em ratos é responsiva ao tratamento por DAINES, animais submetidos à OA foram tratados profilaticamente com indometacina.

No nosso estudo, os animais submetidos à OA e tratados com indometacina apresentaram significativa redução da incapacitação articular. Além de servir como validação do modelo para o estudo de dor em OA, esse resultado sugere que prostaglandinas, reconhecidos mediadores hiperalgênicos, participam no mecanismo dessa incapacitação. As prostaglandinas são capazes de sensibilizar os nociceptores a estímulos mecânicos (Ferreira, 1972) e podem ser encontradas em concentrações elevadas no fluido sinovial em juntas de pacientes com OA (Sahap Atik, 1990).

In vitro demonstrou-se que macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo produzem PGE₂ em quantidade maior quando submetidos à distensão mecânica (Grottkau et al., 2002). No presente modelo, pode-se postular que a desestabilização articular pela transecção do LCA submeta o tecido sinovial a estresse mecânico, estimulando os sinoviócitos macrófagos-símile a liberar PGE₂.

Observamos, entretanto, que animais falso-operados apresentaram valores de TSP significativamente elevados em relação a animais NAIVE, até cinco dias após a artrotomia. A dissecação de tecidos com possíveis injúrias a estruturas periarticulares, decorrentes do procedimento cirúrgico, pode contribuir para a elevação transitória do TSP para esses animais (Marshall & Chan, 1996). De todo modo, a incapacitação articular observada nesses animais SHAM foi significativamente inferior à apresentada por animais OA no mesmo período, sugerindo que o trauma cirúrgico da artrotomia *per se* não é responsável pela hiperalgesia observada nos animais submetidos à ruptura do LCA.

1.2. CELULARIDADE DO EXSUDATO ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA)

Na osteoartrite humana, foi relatado presença de discreto infiltrado celular sinovial constituído por células mononucleares - linfócitos ou macrófagos (Ishii et al., 2002; Saito et al., 2002). Na OA, diferentemente da artrite reumatóide, a quantidade de leucócitos presentes no fluido sinovial é pequena (Freemont & Denton, 2003).

O número total de leucócitos determinado no exsudato articular de ratos submetidos à transecção do LCA (OA) apresentou-se semelhante ao encontrado no exsudato articular de animais SHAM, para animais sacrificados ao fim de sete, quatorze ou vinte e oito dias após cirurgia articular, ou de animais NAIVE. Em todos os grupos, ocorreu um predomínio de células mononucleares.

Em concordância a nossos dados, foi descrita a ocorrência em sinóvias de cães submetidos a transecção do LCA de um infiltrado monocitário cuja intensidade não se altera com a evolução (Brandt et al, 1991b). Esses resultados sugerem que, diferente do observado no modelo de artrite por zymosan em ratos (Rocha et al., 1999), a migração de polimorfonucleares neutrófilos não contribui para a hiperalgesia no modelo de OA por transecção do LCA. É possível que células residentes sinoviais e a estimulação mecânica de estruturas nociceptivas periarticulares possam contribuir para a hiperalgesia observada no presente estudo.

1.3. LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CAVIDADES ARTICULARES DE SUBMETIDOS A TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA)

Níveis elevados de nitrito foram encontrados no fluido sinovial de pacientes portadores de OA (Farrell et al., 1992; Karan et al., 2003).

À semelhança da doença em humanos, obtivemos concentrações elevadas de nitrito - metabólito estável do óxido nítrico - no exsudato articular de ratos submetidos à transecção do LCA, sacrificados ao fim de sete, quatorze ou vinte e oito dias, quando comparados a animais falso-operados.

Uma grande variedade de células pode expressar a NOS induzida após exposição a estímulos inflamatórios, como as citocinas IL-1 e TNF- α , presentes em concentrações elevadas nas doenças articulares inflamatórias. As fontes intra-articulares potenciais de NO incluem as células endoteliais dos capilares sinoviais, leucócitos infiltrantes e as células mesenquimais residentes na articulação (Stefanovic-Racic et al., 1993).

Apesar da observação de que células endoteliais, pelo menos no cérebro, possam ser estimuladas a expressar a NOS induzida além da NOS constitutiva, é pouco provável que o NO produzido por células endoteliais dos capilares sinoviais difunda-se para o interior da cavidade articular em quantidades suficientes para exercer importantes influência na fisiopatologia de artropatias (Stefanovic-Racic et al., 1993). Entretanto neutrófilos, linfócitos, mastócitos e, especialmente, macrófagos são capazes de produzir grandes quantidades de NO (Stefanovic-Racic et al., 1993; Weinberg et al., 1995; Wheeler et al., 1997).

Os condrócitos são uma fonte potencial de NO na OA. Condrócitos de pacientes portadores de OA expressam uma NO sintase de peso molecular semelhante à NOS neuronal e produzem espontaneamente NO em cultura (Amin et al., 1995). Quando estimulados em cultura, condrócitos humanos normais expressam a NOS induzida (iNOS) (Charles et al., 1993). Condrócitos de cães submetidos à transecção do LCA produzem NO espontaneamente *in vitro* (Spreng et al, 2000). Evidências *in vitro* sugerem que a produção de NO por condrócitos seja influenciada por estímulos mecânicos. Concentrações elevadas de nitrito foram detectadas em cartilagem bovina submetida a estresse mecânico por compressão *in vitro* (Loening et al, 2000). Encontrou-se também que aumento na expressão do RNA mensageiro da iNOS em cartilagens de pacientes com OA submetidas a pressão hidrostática elevada (Islam et al., 2002).

Danos aos ligamentos e meniscos privam a articulação da ação atenuante de forças por essas estruturas, ocasionando um padrão alterado na distribuição e magnitude de forças sobre a superfície da cartilagem articular *in vivo* (Setton et al, 1999). Foi observada também a deformação mecânica *in vivo* de condrócitos na cartilagem de gatos (Clark et al., 2003). É racional, então, supor que condrócitos de articulações deficientes para o LCA estejam submetidos a forças mecânicas capazes de estimulá-los a sintetizar NO.

Além dos condrócitos, foi relatado que sinoviócitos produzem NO na OA eqüina (von Rechemberg et al., 2000). Nessa perspectiva, investigamos por marcação imunohistoquímica a expressão de iNOS em espécimes de tecido sinovial provenientes de animais NAIVE e de animais OA e SHAM, ambos ao sétimo dia da cirurgia articular. Encontramos aumento da expressão da iNOS na sinóvia dos animais submetidos à transecção do LCA, quando comparados a falso-operados e controle. A marcação foi difusa, envolvendo inclusive vasos sinoviais. Entretanto, a

maior intensidade foi observada nas células sinoviais, sugerindo serem elas uma das fontes articulares produtoras de óxido nítrico no modelo de OA por transecção do LCA em ratos. Em concordância a nossos resultados, foi demonstrado que a iNOS está expressa em macrófagos CD68+ presentes em sinóvias OA humanas e, em menor extensão, em fibroblastos sinoviais (Grabowski et al, 1997).

1.4. QUANTIFICAÇÃO DE CONDROITIN-SULFATO TOTAL NA MATRIZ DA CARTILAGEM ARTICULAR DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (LCA)

Macroscopicamente a degeneração da cartilagem na osteoartrite tem sido descrita como fibrilação da superfície articular, fissuração e perda parcial ou completa do tecido, com exposição ou desnudamento do osso subcondral (revisto em Setton et al., 1999). Embora, na fase inicial da OA possa haver aumento na produção de matriz orgânica, posteriormente ocorre perda de proteoglicanos (Malemud, 1991). Esses componentes da matriz da cartilagem articular são formados a partir de cadeias polissacarídicas de glicosaminoglicanos (GAGs) constituídas por condroitin-4 sulfato, condroitin-6-sulfato e keratan-sulfato (Sledge, 1993).

A quantificação de GAGs, provenientes da degradação dos proteoglicanos, no exsudato articular foi descrita como indicador de lesão articular em artrites (Sharif et al., 1996). Concentrações de condroitins sulfatados e de keratan sulfato encontram-se aumentadas no líquido sinovial de pacientes de OA (Poole et al., 1994). Concentrações elevadas de neo-epítomos de condroitin-sulfato são também encontradas no líquido sinovial de cães submetidos à secção do LCA (Johnson et al., 2002).

Considerando que o dano estrutural à cartilagem se reflita como redução de proteoglicanos da cartilagem articular, pode-se quantificar essa lesão através da determinação do conteúdo de GAG na cartilagem, comparando a controles. No modelo de artrite induzida por zymosan em ratos, foi demonstrado pelo nosso grupo, recentemente, que a quantificação dos GAGs da matriz da cartilagem se associou à perda dessas substâncias, observada à histopatologia (Bezerra et al., 2004). Assim,

padronizamos um método quantitativo de lesão estrutural, que poderia ser estendido a outros modelos de artropatia.

No presente estudo, determinamos a quantidade de condroitin-sulfato total presente na cartilagem dos côndilos femorais de ratos NAIVE, OA (transecção do LCA) ou SHAM, sacrificados ao fim de sete, quatorze ou vinte e oito dias após a cirurgia articular. Observamos que as cartilagens de animais OA sacrificados quatorze dias após a transecção do LCA apresentaram quantidade de condroitin-sulfato total significativamente superior às determinadas para animais falso-operados (SHAM).

De forma semelhante ao que observamos, foi descrita a ocorrência de reparo hipertrófico da cartilagem articular em cães submetidos à transecção do LCA (Johnson & Poole, 1990; Adams & Brandt, 1991). Uma vez que não foi alcançada a redução da concentração de condroitin-sulfato na cartilagem OA em quatro semanas de indução do modelo, faz-se necessário avaliar esse parâmetro com ratos em fases mais avançadas do modelo, na tentativa de demonstrar uma perda do referido GAG da matriz da cartilagem.

Foi demonstrado que a degeneração da cartilagem articular em ratos deficientes para o LCA inicia-se na superfície articular, na qual o desenvolvimento de fibrilação está correlacionado ao dano ao colágeno tipo II (Stoop et al., 2001). Nessas regiões fibriladas, foi perceptível a redução na coloração da Safranina O (específica para proteoglicanos) em animais após quatro semanas de OA. Essa lesão parece se associar a um aumento na expressão de metaloproteinases. Em um modelo semelhante de OA em coelhos observou-se aumento na expressão de MMP-13 (colagenase-3), MMP-1 (colagenase-1) e MMP-3 (estromelina) (Bluteau et al., 2002).

A superfície da cartilagem articular é caracterizada por fibras de colágeno tipo II paralelamente dispersas e por um reduzido conteúdo de proteoglicano (Muir et al., 1970). Cartilagens articulares com superfícies fibriladas tornam-se mais complacentes ou deformáveis por compressão (Kempson et al., 1971). É compreensível então que a sobrecarga transmitida às regiões mais profundas da cartilagem torne-se maior com a expansão da extensão e da profundidade nas áreas fibriladas, comprometendo a homeostase dos condrócitos residentes em regiões profundas, onde a concentração de proteoglicanos é maior. Nessa seqüência

postulada, o dano às fibras colágenas antecede o dano aos proteoglicanos, conforme observado por Stoop et al. (2001).

2. PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA HIPERALGESIA ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR

Conforme discutimos acima, observamos aumento da expressão de iNOS na membrana sinovial dos animais submetidos à transecção do LCA. A determinação de nitrito total – metabólito estável do óxido nítrico – foi realizada no exsudato sinovial de ratos deficientes para o LCA também neste trabalho. Concentrações de nitrito foram máximas no exsudato articular coletado aos sete dias após a indução do modelo. Uma vez que os níveis elevados de nitrito coincidem temporalmente com os valores máximos de incapacitação articular, decidimos investigar, pelo uso de ferramentas farmacológicas, a participação do óxido nítrico (NO) no desenvolvimento da hiperalgesia articular neste modelo.

Observamos de maneira inédita que a administração profilática sistêmica de N^w-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME), inibidor não-seletivo de NOS, reduziu significativamente a incapacitação articular apresentada por ratos submetidos à transecção do LCA. A co-administração de L-arginina, aminoácido substrato para a síntese de NO, reverteu, ao menos parcialmente, a inibição da incapacitação articular realizada pelo L-NAME. Interessante notar que a inibição da incapacitação articular foi obtida tanto pela administração profilática sistêmica de L-NAME, quanto pela administração profilática sistêmica de 1400W, inibidor seletivo para o bloqueio da NOS induzida (iNOS). Diante do resultado obtido para 1400W, sugerimos que o NO produzido pela iNOS parece estar relacionado à hiperalgesia articular presente neste modelo de OA.

Em concordância aos dados apresentados neste trabalho, a literatura relata ações hiperalgésicas do NO. Foi demonstrado que L-NAME produz efeito antinociceptivo no modelo de hiperalgesia induzida por formalina em patas de rato e no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (Moore et al., 1991). De modo similar, a administração intra-tecal de aminoguanidina e 2-amino-5,6-hidroximetiltiazina, inibidores seletivos para a iNOS, reduziram a hiperalgesia térmica induzida por carragenina em ratos (Osborne & Coderre, 1999). Na artrite induzida

por carragenina-caolin em ratos, a hiperalgesia térmica foi prevenida pela administração local de L-NAME ou de 7-nitro-indazol, um inibidor seletivo para a nNOS (Lawand et al., 1997). Mais ainda, o NO pode promover hiperalgesia diretamente. Elevadas doses de SIN-1, um doador de NO, foram hiperalgésicas no teste de compressão de pata de ratos (Aley et al., 1998). Em humanos, demonstrou-se que injeções intra-dérmicas ou intravenosas de NO podem produzir dor (Holthusen & Arndt, 1994; Kindgen-Milles & Arndt, 1996).

Entretanto, dados da literatura também apontam para um papel antinociceptivo do NO. Em ratos cujas patas foram sensibilizadas com carragenina ou PGE₂, foi demonstrado que a analgesia periférica da acetilcolina envolvia a participação do sistema L-arginina:NO:GMPc (Duarte et al., 1990). Outro estudo demonstrou que SIN-1 reduziu a hiperalgesia induzida por PGE₂ (Ferreira et al., 1991a). Em humanos, encontrou-se que a administração intra-dérmica de nitrato de isossorbida, molécula doadora de NO, reduziu a dor pós-operatória (Lauretti et al., 1999), e que esse mesmo composto aliviou parcialmente a dor de pacientes portadores de periartrite (Berrazueta et al., 1996). Em concordância a esses dados, foi relatada no teste de contorções abdominais em ratos a atividade antinociceptiva do sildenafil, uma droga inibidora da degradação de GMPc pela enzima fosfodiesterase 5. Tal atividade foi potenciada pelo nitroprussiato de sódio, doador de NO, ou por L-arginina (Jain et al., 2001).

Diante do paradoxo relatado na literatura quanto às ações do NO sobre a hiperalgesia, Rocha et al. (2002) investigaram o efeito de inibidores das NO sintases e de doadores de NO na hiperalgesia articular existente na fase aguda da artrite induzida por zymosan. Nesse estudo, nosso grupo observou que inibidores de NOS não reduzem a hiperalgesia inflamatória quando administrados de forma terapêutica, isto é, após a indução da artrite por zymosan. Entretanto, a administração intra-articular terapêutica de nitroprussiato de sódio ou de 3-morfolinossidnonimina, duas substâncias doadoras de NO, promoveu analgesia (Rocha et al., 2002).

No presente estudo, encontramos que a inibição da incapacitação articular em ratos submetidos ao modelo de osteoartrite foi alcançada apenas quando a inibição da síntese de NO foi realizada antes da indução do protocolo isto é, profilaticamente. À semelhança de Rocha et al. (2002), postulamos que o efeito antinociceptivo de inibidores das NOS administrados profilaticamente previna a

liberação de mediadores hiperalgésicos decorrente de danos às estruturas articulares por forças cuja distribuição ou magnitude possam estar alteradas. Já a administração terapêutica de inibidores das NOS não conseguiria prevenir a ativação inicial dos nociceptores por mediadores hiperalgésicos já formados. Semelhantemente ao ocorrido na artrite por zymosan, é possível haver uma ação dual do NO na hiperalgisia articular em ratos deficientes para o LCA. Para tanto, o efeito de doadores de NO sobre a hiperalgisia articular nesse modelo necessita ser investigada.

3. EFEITO DE POLISSACARÍDEOS DE ELEVADO PESO MOLECULAR SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR

3.1 EFEITO DO HILANO G-F 20 SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR

A reposição intra-articular de ácido hialurônico, denominada de viscosuplementação, constitui uma alternativa terapêutica para a osteoartrite (Wright et al., 2000). Achados clínicos em humanos apontaram para a redução dos sintomas da osteoartrite, dentre eles a dor articular (Evanich et al., 2001).

Como já discutido anteriormente, ratos cujos LCAs foram rompidos cirurgicamente apresentaram incapacitação articular relacionada à ocorrência de hiperalgisia na junta acometida. Diante desse fato, investigamos se, à semelhança do efeito manifesto em humanos, a viscosuplementação promoveria analgesia no modelo de osteoartrite por transecção do LCA em ratos. Para tanto, utilizamos o Hilano G-F 20, uma preparação de ácido hialurônico de peso molecular e viscosidade elevados, comumente utilizada na OA. Observamos que animais OA tratados terapêuticamente com Hilano G-F 20 intra-articular apresentaram redução significativa no TSP imediatamente após a administração, alcançando valores semelhantes aos encontrados para animais SHAM. É interessante observar que a analgesia pôde ser obtida por 72 horas após uma única administração.

Segundo a hipótese da viscosuplementação (Balazs & Denlinger, 1993), o restabelecimento da viscoelasticidade do fluido sinovial reduziria o atrito entre as estruturas articulares durante o movimento. Uma vez que o atrito excessivo seria prejudicial à integridade da articulação, provocando a degeneração articular

acompanhada de sintomas como dor e disfunção, a viscosuplementação, por reduzir tal atrito, contribuiria para a diminuição dos sintomas de OA. Diante dessa hipótese, é coerente esperar uma redução da incapacitação articular imediatamente após a administração de Hilano G-F 20. Entretanto os resultados de analgesia persistente não são conveniente explicados pela hipótese da viscosuplementação. Embora o *clearance* de ácido hialurônico em articulações de ratos não tenha sido ainda determinado, dados a partir de coelhos sugerem uma meia vida inferior a vinte e quatro horas para juntas saudáveis (Lindenhayn et al., 1997), podendo, porém, ser abreviada na OA face à vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular que ocorrem em artrites.

Embora o efeito analgésico das preparações de ácido hialurônico tenha sido relatado em estudos clínicos com humanos, pouco é conhecido acerca de seu mecanismo de ação, advindo desse fato a importância do desenvolvimento de modelos animais que simulem a dor articular presente na OA humana. Foi observado que o ácido hialurônico intra-articular, por ligação ao receptor específico CD44, produziu analgesia prolongada peso-molecular dependente em articulações de ratos estimuladas por bradicinina (Gotoh et al., 1993). Um estudos *in vitro* demonstrou que a produção de NO por células provenientes de meniscos e sinóvias de coelhos submetidos à transecção do LCA é inibida quando os animais são tratados com hialuronano intra-celular (Takahashi et al., 2001).

Encontramos liberação de óxido nítrico, provavelmente a partir de células sinoviais, em ratos cirurgicamente deficientes para o LCA e observamos a participação do NO liberado na hiperalgesia articular. Seria possível supor, então, uma das ações do ácido hialurônico contribuintes para a analgesia fosse a inibição da síntese de NO a partir das células sinoviais. Intrigantemente, a produção de NO por condrócitos não pareceu ser inibida por hialuronano em coelhos deficientes para o LCA (Takahasri et al., 2000). Em cultura de condrócitos eqüinos estimulados com IL-1, a liberação de nitrito não foi inibida por hialuronano (Tung et al., 2002).

Foi relatada também que a produção de PGE₂ em culturas de células sinoviais de pacientes portadores de OA, sob o estímulo de IL-1, foi suprimida por ácido hialurônico intra-articular de forma dose-dependente e variando também com o peso molecular (Yasui et al., 1992). Em um estudo com pacientes de artrite reumatóide, a administração intra-articular de ácido hialurônico reduziu a concentração de PGE₂, bem como a dor e a inflamação articulares (Goto et al.,

2001). A dor articular presente em ratos cujos LCAs foram rompidos foi responsiva à indometacina, sugerindo que prostaglandinas (PGs) participem nesta dor articular. A inibição da síntese de PGs pelo ácido hialurônico pode contribuir também para a analgesia nesse modelo de OA.

Foi sugerido também que o ácido hialurônico seria capaz de modular a atividade de nociceptores. Registros de *patch-clamp* em ovócitos de *Xenopus laevis* demonstraram que a ativação de canais iônicos por distensão mecânica foi reduzida na presença de hialanos, preparações de ácido hialurônico de elevado peso molecular (Pena Ede et al., 2002). Em juntas de ratos submetidas à inflamação, a administração de ácido hialurônico intra-articular reduziu de maneira peso molecular-dependente a frequência do impulso nervoso aferente induzido por manipulação mecânica (Gomis et al., 2004).

3.2. EFEITO DA GOMA GUAR (GEL E SOLUÇÃO) SOBRE A INCAPACITAÇÃO ARTICULAR

A viscosuplementação é um procedimento recente em reumatologia e ortopedia e não está claro o seu mecanismo de ação. Uma recente pesquisa mostrou que derivados carboximetilados da quitina, polissacarídeo constituinte do exoesqueleto de artrópodes, promovem redução das alterações histológicas na cartilagem de coelhos submetidos à transecção do LCA, bem como redução da expressão de MMP-1 (Hongbin et al., 2004).

Soluções de elevada viscosidade podem ser preparadas a partir de gomas naturais. Entre as gomas naturais, encontra-se a goma guar, extraída do endosperma da semente da *Cyamopsis tetragonobola*. A goma guar é muito utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia, tanto pela viscosidade de suas soluções quanto pelo reduzido custo em sua obtenção (Cheng et al., 2000).

As soluções de goma guar (GG) são biocompatíveis, como as soluções de carboximetil-quitina. Em atenção a esse fato, aplicações biológicas de soluções de GG foram sugeridas, como em substituintes do muco cervical (Burruano et al., 2002). Nessa perspectiva, avaliamos o efeito de preparações de goma guar sobre a incapacitação articular de ratos submetidos à transecção do LCA. Para tal fim utilizamos a GG em solução salina ou um gel reticulado a partir de GG em solução.

A reação de reticulação consiste na ligação cruzada das cadeias lineares de GG, formando complexos de elevado peso molecular e de viscosidade semelhante à obtida pelo Hilano G-F 20.

Antes, porém, do teste da eficácia de preparações de GG sobre a incapacitação articular em ratos, realizamos testes a fim de verificar a segurança no uso das mesmas em cavidades articulares de ratos. Obtivemos que a goma guar, tal como provém do fabricante, em solução salina, promoveu incapacitação articular dose-dependente em ratos. A incapacitação foi significativamente maior em uma preparação de GG na forma de gel reticulado. Ainda, a GG promoveu influxo celular leucocitário para a cavidade articular de ratos, sugerindo uma ação pró-inflamatória da goma guar industrializada.

Os polissacarídeos de origem vegetal estão normalmente associados a proteínas (Terce-Laforgue et al., 1980), as quais poderiam induzir uma reação inflamatória em tecidos. Desse modo, determinamos a presença de contaminação protéica na GG industrializada, encontrando um valor igual a 3,64% em massa. O decréscimo na massa molecular da GG sugere a extração de proteína associada a estruturas polissacarídicas. A natureza desse contaminante protéico não foi, todavia, investigada.

Para testar a hipótese de que os eventos inflamatórios da GG fossem devidos à contaminação protéica, amostras de GG foram submetidas à purificação pelos métodos físico (combinação de métodos de solubilização e precipitação) e método Fehling. Para amostras purificadas seqüencialmente pelos respectivos métodos, a presença de proteínas foi indetectável. Após a retirada do contaminante protéico, amostras de GG, tanto em solução quanto em gel, não promoveram inflamação articular avaliada por incapacitação articular ou influxo celular leucocitário.

A partir do material isento de contaminação protéica, avaliamos o efeito da administração intra-articular terapêutica de GG em solução ou gel reticulado sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à transecção do LCA. Observamos que a solução de GG promoveu, semelhantemente ao Hilano G-F 20, redução da incapacitação articular avaliada imediatamente após a administração. O efeito prolongado da GG em solução foi observado por 72 horas após a administração. Para a GG em gel observamos a redução da incapacitação articular entre 24 e 72 horas após a administração. À semelhança com o discutido para o Hilano G-F 20, os

resultados obtidos não são coerentemente explicados pela hipótese da viscosuplementação de Balazs e Denlinger (1993). De fato, a viscosidade determinada para soluções de goma guar está em ordem de grandeza inferior àquela determinada para géis de goma guar ou Hilano G-F 20. O registro do elevado *clearance* do ácido hialurônico em joelhos de coelhos osteoartrosicos (Lindenhayn et al., 1997) pode ser inferido para joelhos de ratos, permitindo supor que a permanência da GG nas cavidades seja abreviada suficientemente para promover analgesia por lubrificação das estruturas articulares. Em terceiro lugar, a analgesia promovida pela GG em gel manifestou-se tardiamente, fato incoerente para a hipótese de um elevado *clearance* dos polissacarídeos na articulação de ratos.

Há um relato na literatura de atividade analgésica para mananas. Foi demonstrada a redução da hiperalgesia térmica em ratos por uma D-manana O-acetilada extraída do corpo de frutificação do fungo *Dictyophora indusiata* (Ukai et al., 1983). Já os resultados de analgesia promovida pela galactomanana constituinte da goma guar são, ao nosso conhecimento, a primeira demonstração de efeito analgésico para esses compostos. O mecanismo de ação da analgesia promovida pela GG em ratos submetidos à transecção do LCA é, possivelmente, farmacológico. A determinação desse mecanismo de ação demanda uma criteriosa investigação, a qual será objetivo de continuidade deste trabalho.

A partir dos resultados obtidos com a incapacitação articular, podemos sugerir que preparações de GG parecem ser promissores substitutos para o ácido hialurônico na terapia da OA. Para conclusão dessa proposição, o efeito de polissacarídeos de GG sobre a lesão da cartilagem necessita ser avaliado.

Conclusões

VI. CONCLUSÕES

1. O modelo proposto permite, de maneira inédita, o estudo de dor articular em um modelo de osteoartrite em ratos, sendo reprodutível, de fácil manuseio e independente de avaliação subjetiva pelo observador.
2. Indometacina reduz significativamente a hiperalgesia no modelo por transecção do LCA em ratos.
3. A hiperalgesia observada no modelo por transecção do LCA está associada a um aumento na expressão de NOS induzida, levando a aumento na liberação de NO na cavidade articular.
4. A inibição profilática da síntese de NO reduz a hiperalgesia no modelo por transecção do LCA em ratos.
5. O uso de polissacarídeos de goma guar, de alto peso molecular, à semelhança e na mesma magnitude que o Hilano G-F 20, reduz de forma significativa a hiperalgesia no modelo de OA por transecção do LCA em ratos. Esse efeito independe do polissacarídeo de goma guar estar em solução ou em forma reticulada.

**Referências
bibliográficas**

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. E.; BRANDT, K. D. Hypertrophic repair of canine articular cartilage in the osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. **J. Rheumatol.**, **18(3)**: 428-435, 1991.

ADAMS, M. E.; LUSSIER, A. J.; PEYRON, J. G. A risk-benefit assessment of injections of hyaluronan and its derivatives in the treatment of osteoarthritis of the knee. **Drug Saf.**, **23(2)**:115-130, 2000.

AIGNER T.; MCKENNA, L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. **Cell Mol. Life Sci.**, **59(1)**: 5-18, 2002.

ALEY, K. O.; McCARTER, G.; LEVINE, J. D. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. **J. Neurosci.**, **18(17)**: 7008-7014, 1998.

ALTMAN, R; ASCH, E; BLOCH, D.; BOLE, G.; BORENSTEIN, D.; BRANDT, K. D.; CHRISTY, W.; COOKE, T. D.; GREENWALD, R.; HOCHBERG, M. et al.. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. **Arthritis Rheum.**, **29(8)**: 1039-1049, 1986.

ALTMAN, R. D. Intra-articular sodium hyaluronate in osteoarthritis of the knee. **Semin. Arthritis Rheum.**; **30(2)**: 11-18, 2000.

ALTMAN, R.; LOZADA, C. J. Osteoarthritis and related disorders: clinical features. In: HOCHBERG, M.C.; SILMAN, A.J.;SMOLEN, J.S; WEINBLAT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Rheumatology**. Volume two. 3rd edition. London: Mosby, 2003.

AMIN, A. R.; Di CESARE, P. E.; VYAS, P; ATTUR, M.; TZENG, E.; BILLIAR, T.R.; STUCHIN, S. A.; ABRAMSON, S. B. The expression and regulation of nitric oxide

synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, **182(6)**: 2097-2102, 1995.

ARUFFO, A.; STAMENKO, I.; MELNICK, M.; UNDERHILL, C.B.; SEED, B. CD44 is the principal cell- surface receptor for hyaluronate. **Cell**, **61**: 1303-1313, 1990.

BALAZS, E. A.; BRILLER, S. O.; DENLINGER, J. L. Na-hyaluronate molecular size variations in equine and human arthritic synovial fluids and the effect on phagocytic cells. **Osteoarthr. Symp. Semin. Arthritis Rheum.**, **Suppl. 1**: 141-143, 1980.

BALAZS, E. A.; DENLINGER, J.L. Sodium hyaluronate and joint function. **Equine Vet. Sci.**, **5**: 217-228, 1985.

BALAZS, E. A.; DENLINGER, J. L. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, **20(Suppl. 39)**: 3-9, 1993.

BALI, J.-P., COUSSE, H., NEUZIL, E. Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system. **Semin. Arthritis Rheum.**, **31(1)**: 58-68, 2001.

BANK, R.A.; SOUNDRY, M.; MAROUDAS, A.; MIZRAHI, J.; TEKOPPELE, J.M. The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. **Arthritis Rheum.**, **43**: 2202-2210, 2000.

BAU, B.; GEBHARD, P.M.; HAAG, J.; KNORR, T.; BARTNIK, E.; AIGNER, T. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. **Arthritis Rheum.**, **46(10)**: 2648-2657, 2002.

BAYLISS, M.T.; OSBORNE, D., WOODHOUSE, S.; DAVIDSON, C. Sulfatation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical

position, and zone of cartilage on tissue composition. **J. Biol. Chem.**, **274**: 15892-15900, 1999.

BELENKY, S. N.; ROBBINS, R. A.; RUBISTEIN, I. Nitric oxide synthases inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis in vitro. **J. Leukoc. Biol.**, **53(5)**: 498-503, 1993a.

BELENKY, S. N.; ROBBINS, R. A.; STEPHEN, S. I.; RENNARD, S. I.; GOSSMAN, G. L.; NELSON, K. J.; RUBISTEIN, I. Inhibitors of nitric oxide synthase attenuate human neutrophil chemotaxis in vitro. **J. Lab. Clin. Med.**, **122**: 388-394, 1993b.

BERNARDEAU, C.; BUCKI, B.; LIOTÉ, F. Acute arthritis after intra-articular hyaluronate injection: onset of effusions without crystal. **Ann Rheum Dis**; **60(5)**: 518-520, 2001.

BERRAZUETA, J. R.; LOSADA, A.; POVEDA, J.; OCHOTECO, A.; Riestra, A.; SALAS, E.; AMADO, J. A. Successful treatment of shoulder pain syndrome due to supraspinatus tendinitis with transdermal nitroglycerin. A double blind study. **Pain**, **66(1)**: 63-67, 1996.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GREENACRE, S.; JERÔNIMO, S. M. B.; MELO, L. B.; KEEBLE, J., ROCHA, F. A. C. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Br. J. Pharmacol.**, **141(1)**: 172-182, 2004.

BLANCO, F. J.; OCHS, R. L.; SCHWARZ, R. L.; LOTZ, M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. **Am. J. Pathol.**, **146(1)**: 75-85, 1995.

BLUTEAU, G.; GOUTTENOIRE, J.; CONROZIER, T.; MATHIEU, P.; VIGNON, E.; RICHARD, M.; HERBAGE, D.; MALLEIN-GERIN, F. Differential gene expression analysis in a rabbit model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament (ACL) section. **Biorheology**, **39(1-2)**: 247-258, 2002.

BRANDT, K.D. Pain, synovitis, and articular cartilage changes in osteoarthritis. **Semin. Arthritis Rheum.**, **18 (2)**: 77-80, 1989.

BRANDT, K. D.; BRAUNSTEIN, E. M.; VISCO, D. M.; O'CONNER, B.; HECK, D.; ALBRECHT, M. Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. **J. Rheum.**, **18**: 436-446, 1991a.

BRANDT, K. D.; MYERS, S. L.; BURR, D.; ALBRECHT, M. Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. **Arthritis Rheum.**, **34(12)**: 1560-1570, 1991b.

BREW, K.; DINAKARPARNDIAN, D., NAGASE, H. Tissue inhibitor of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochem. Biophys. Acta**, **1477**: 267-283, 2000.

BURNETT, A. L. Role of nitric oxide in the physiology of erection. **Biol. Reprod.**, **52(3)**: 485-489, 1995.

BURRUANO, B. T.; SCHNAARE, R. L.; MALAMUD, D. Synthetic cervical mucus formulation. **Contraception**, **66(2)**:137-140, 2002.

CAPLAN, A.J. Cartilage. **Sci. Amer.**, **251**: 82-90, 1984.

CARNEY, S.L. Targets for drug discovery in osteoarthritis. **DNP**, **6**: 69-77, 1993.

CHAMBERS, T.J.; FOX, S.; JAGGER, C.J.; LEAN, J.M.; CHOW, J.W. The role of prostaglandins and nitric oxide in the response of bone to mechanical forces. **Osteoarthr. Cart.**, **7(4)**: 422-423, 1999.

CHAMPE, P.; HARVEY, R. **Bioquímica Ilustrada**. 2ª edição. Editora Artes Médicas, 1997.

CHANDRASEKHARAN; N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **99(21)**:13926-13931, 2002.

CHARLES, I. G.; PALMER, R. M. J.; HICKEY, M. S.; BAYLISS, M. T.; CHUBB, A. P.; HALL, V. S.; MOSS, D. W.; MONCADA, S. Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90(11)**: 419-423, 1993.

CHENG, Y.; BROWN, K. M.; PRUD'HOMME, R. K. Preparation and characterization of molecular weight fractions of guar galactomannans using acid and enzymatic hydrolysis. **Int. J. Biol. Macromolecules**, **31(1-3)**: 29-35, 2002.

CLARK, A. L.; BARCLAY, L. D.; MATYAS, J. R. HERZOG, W. In situ chondrocyte deformation with physiological compression of the feline patellofemoral joint. **J. Biomech.**, **36(4)**: 553-568, 2003.

COHEN, N.; ROBINSON, D.; BEN-EZZER, J.; HEMO, Y.; HASHARONI, A.; WOLMANN, Y.; OTREMSKI, I.; NEVO, Z. Reduced NO accumulation in arthrotic cartilage by exposure to methylene blue. **Acta Orthop. Scand.**, **71(6)**: 630-636, 2000.

CONNOR, J. R.; MANNING, P. T.; SETTLE, S. L. et al. Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Eur. J. Pharmacol.**, **273(1-2)**: 15-24, 1995.

CORBETT, J. A.; TILTON, R. G.; CHANG, K.; HASAN, K. S.; IDO, Y.; WANG, J. L.; SWEETLAND, M. A.; LANCASTER Jr., J. R.; WILLIAMSON, J. R.; Mc DANIEL, M. L. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation prevents diabetic vascular dysfunction. **Diabetes**, **41(4)**: 552-556, 1992.

CREAMER, P.; LETHBRIDGE-CEJKU, M.; HOCHBERG, M.C. Where does the hurt? Pain localization in osteoarthritis of the knee. **Osteoarthritis Cartilage**, **6**: 318-323, 1998.

CREAMER, P. Osteoarthritis pain and its treatment. **Curr. Opin. Rheumatol.**, **12(5)**: 450-455, 2000.

CROFFORD, L.J. COX-2 in synovial tissues. **Osteoarthr. Cart.**, **7(4)**: 406-408, 1999.

CULTY, M.; O'MARA, T. E.; UNDERHILL, C. B.; YEAGER Jr., H.; SWARTZ, R. P. Hyaluronan receptor (CD44) expression and function in human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, **56**: 605-611, 1994.

DAHL, L. B.; DAHL, I. M. S.; ENGSTROM-LAURENT, A.; GRANATH, K. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. **Ann. Rheum. Dis.**, **44(12)**: 817-822, 1985.

DANDY, D.J.; FLANAGAN, J.P.; STEENMEYER, V. Arthroscopy and the management of the ruptured anterior cruciate ligament. **Clin. Orthop.**, **167**: 43-49, 1982.

Del CARLO, M.; LOESER, R. F. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. **Arthritis Rheum.**, **46(2)**: 394-403, 2002.

DENNISON, E.; COOPER, C. Osteoarthritis: epidemiology and classification. In: HOCHBERG, M.C.; SILMAN, A.J.;SMOLEN, J.S; WEINBLAT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Rheumatology**. Volume two. 3rd edition. London: Mosby, 2003.

DeWITT, D.L.; MEADE, E.A. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. **Inflamm. Res.**, **46(2)**: 72-77, 1997.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH; S.M.C. Electrophoresis behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Annal. Biochem.**, **70**: 645-647, 1976.

DIETRICH, C.P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz. J med. Biol. Res.**, **17**: 5-13, 1984.

DOHERTY, N.S.; POUBELLE, P.; BERGEAT, P.; BEAVER, T.H.; WESTRICH, G.L.; SCHRADER, N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, **30(5)**: 769-789, 1985.

DOHERTY, N.S.; BEAVER, T.H.; CHAN, K.Y.; COUTANT, J.E.; WESTRICH, G.L. The role of prostaglandins in the nociceptive response induced by intraperitoneal injection in zymosan in mice. **Br. J. Pharmacol.**, **91**: 39-47, 1987.

DOUGADOS, M. Sodium hyaluronate therapy in osteoarthritis: arguments for a potential beneficial structural effect. **Semin. Arthritis Rheum.**; **30(2)**:19-25, 2000.

DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, **186**: 289-293, 1990.

DUARTE, I. D. G.; SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, **217**: 225-227, 1992.

EDWARDS, J. C. W. The synovium. In: HOCHBERG, M.C.; SILMAN, A.J.; SMOLEN, J.S; WEINBLAT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Rheumatology**. Volume two. 3rd edition. London: Mosby, 2003.

EGG, D. Concentrations of prostaglandin D2, E2, F2 alpha, 6-keto-F1 alpha and thromboxane B2 in synovial fluid from patients with inflammatory joint disorders and osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, **43(2)**: 89-96, 1984.

EVANICH, J. D.; EVANICH, C.J.; WRIGHT, M. B.; RYDLEWICZ, J. A. Efficacy of intraarticular hyaluronic acid injections in knee osteoarthritis. **Clin Orthop**; (**390**):173-81, 2001.

FAHMI, H.; DI BATTISTA, J.A.; PELLETIER, J. P.; MINEAU, F.; RANGER, P.; MARTEL-PELLETIER. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1 beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. **Arthritis Rheum.**, **44(3)**: 595-607, 2001.

FAHMI, H.; PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J. PPAR gamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses on arthritis. An overview. **J. Rheumatol.**, **29**: 3-14, 2002a.

FAHMI, H.; PELLETIER, J. P, MINEAU, F; MARTEL-PELLETIER, J. 15d-PGJ2 is acting as a dual agent on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. **Osteoarthr. Cart.**, **10(11)**: 845-848, 2002b.

FARRELL, A.J.; BLAKE, D. R.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, **51(11)**: 1219-1222, 1992.

FEAGIN, J.A.; CURL, W.W. Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5-year follow-up study. **Am. J. Sports Med.**, **4**: 95-100, 1976.

FELSON, D.T.; CHAISSON, C.E.; HILL, C.L.; TOTTERMAN, S.M.; GALE, M.E.; SKINNER, K.M.; KAZIS, L.; GALE, D.R. The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. **Ann. Intern. Med.**, **134**: 541-549, 2001.

FERNANDES, J.C.; MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J.P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. **Biorheology**, **39(1-2)**: 237-246, 2002.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat. New Biol.**, **240(102)**: 200-203, 1972.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORRÊA, F.M.A. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, **53**: 39-48, 1978.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B. Molecular basis of acetylcholine and morphine analgesia. **Agents action**, **32**: 101-106, 1991a.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D. G.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, **201(1)**: 121-122, 1991b.

FREEMONT, A. J.; DENTON, J. Synovial fluid analysis. In: HOCHBERG, M.C.; SILMAN, A.J.; SMOLEN, J.S; WEINBLAT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Rheumatology**. Volume two. 3rd edition. London: Mosby, 2003.

FUKUTO, J. M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **35**: 165-194, 1995.

FUJII, K.; TANAKA, Y.; HUBSCHER, S.; SAITO, K., OTA, T.; ETO, S. Cross-linking of CD44 on rheumatoid synovial cells up-regulates VCAM-1. **J. Immunol.**, **162**: 2391-2398, 1999.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, **53(5)**: 557-573, 1983.

GARVEY, E. P.; OPLINGER, J. A.; FURFINE, E. S.; KIFF, R. J.; LAZLO, F.; WHITTLE, B. J.; KNOWLES, R. G. 1400W is a slow, tight binding and highly selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **J. Biol. Chem.**, **272(8)**: 4959-4963, 1997.

GILMAN, S.C.; CHANG, J.; ZEIGLER, P.R.; UHL, J.; MOCHAN, E. Interleukin-1 activates phospholipase A2 in human synovial cells. **Arthritis Rheum.**, **31(1)**: 126-130, 1988.

GHOSH, P.; GUIDOLIN, D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? **Semin. Arthritis Rheum.**, **32(1)**: 10-37, 2002.

GLIKO-KABIR, I.; PENHASI, A.; RUBINSTEIN, A. Characterization of crosslinked guar by thermal analysis. **Carbohydr. Res.**, **316(1-4)**: 6-13, 1999.

GOMIS, A.; PAWLAK, M.; BALAZS, E. A.; SCHIMIDT, R. F.; BELMONTE, C. Effects of different molecular weight elastoviscous hyaluronan solutions on articular nociceptive afferents. **Arthritis Rheum.**, **50(1)**: 314-326, 2004.

GOTO, M.; HANYU, T.; YOSHIO, T.; MATSUNO, H.; SHIMIZU, M.; MURATA, N.; SHIOZAWA, S.; MATSUBARA, T.; YAMANA, S.; MATSUDA, T. Intra-articular

injection of hyaluronate (SI-6601D) improves joint pain and synovial fluid prostaglandin E2 levels in rheumatoid arthritis: a multicenter clinical trial. **Clin. Exp. Rheumatol.**; **19(4)**:377-383, 2001.

GOTOH, S.; ONAYA, J.; ABE, M.; MIYAZAKI, K.; HAMAI, A.; HORIE, K.; TOKUYASU, K. Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. **Ann. Rheum. Dis.**, **52(8)**: 817-822, 1993.

GRABOWSKI, P. S.; WRIGHT, P. K.; VANT'HOF, R. J.; HELFRICH, M. H.; OHSHIMA, H.; RALSTON, S. H. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Br. J. Rheumatol.**, **36(6)**: 651-655, 1997.

GRANATOS-SOTO, V. RUFINO, M. O.; LOPES, L. D. G.; FERREIRA, S. H. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception in morphine in the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.**, **340**: 177-180, 1997.

GREENWARD, R. A. Oxygens radicals, inflammation, and arthritis – pathophysiological considerations and implications for treatment. **Semin. Arthritis Rheum.**, **20(4)**: 219-240, 1991.

GREISBERG, J; BLISS, M.; TEREK, R. The prevalence of nitric oxide in apoptotic chondrocytes of osteoarthritis. **Osteoarthr. Cart.**, **10(3)**: 207-211, 2002.

GROTTKAU, B. E.; NOORDIN, S.; SHORTKROFF, S.; SCHAFFER, J. L.; THORNHILL, T. S.; SPECTOR, M. Effect of mechanical perturbation on the release of PGE(2) by macrophages in vitro. **J. Biomed. Mater. Res.**, **59(2)**: 288-293, 2002.

HANASHI, D.; KOSHINO, T.; UESUGI, M.; SAITO, T. Effect of femoral nerve resection on progression of artilage degeneration induced by anterior cruciate ligament transaction in rabbits. **J. Orthop. Sci.**, **7(6)**: 672-676, 2002.

HASHIMOTO, S.; TAKAHASHI, K.; AMIEL, D.; COUTTS, R.D.; LOTZ, M. Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, **41(7)**: 1266-1274, 1998a.

HASHIMOTO, S.; OCHS, R.L.; KOMIYA, S.; LOTZ, M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, **41(9)**:1632-1638, 1998b.

HASHIMOTO, S.; TAKAHASHI, K.; OCHS, R.L.; COUTTS, R.D.; AMIEL, D.; LOTZ, M. Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, **42(10)**: 2123-2131, 1999.

HASHIMOTO, S.; CREIGHTON-ACHERMANN, L.; TAKAHASHI, K.; AMIEL, D.; COUTTS, R.D.; LOTZ, M. **Osteoarth. Cart.**, **10(3)**: 180-187, 2002.

HAYWOOD, L.; McWILLIAMS, D.F.; PEARSON, C.I.; GILL, S.E.; GANESAN, A.; WILSON, D.; WALSH, D.A. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, **48(8)**: 2173-2177, 2003.

HEINEGARD, D. AND OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. **FASEB**, **3**: 2042–2051, 1989.

HERAUD, F.; HERAUD, A.; HARMAND, M.F. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Ann. Rheum. Dis.** ,**59(12)**:959-965, 2000.

HIELM-BJORKMAN, A. K.; KUUSELA, E.; LIMAN, A.; MARKKOLA, A.; SAARTO, E.; HUTTUNEN, P.; LEPPALOUTO, J.; TULAMO, R. M.; RAEKALLIO, M. Evaluation of methods for assessment of pain associated with chronic osteoarthritis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **222(11)**: 1552-1558, 2003.

HOCHBERG, M.C.; LAWRENCE, R.C.; EVERETT, D.F.; CORNONI-HUNTLEY, J. Epidemiologic associations of pain in osteoarthritis of knee: data from the National Health and Nutrition Examination Survey and the National Health and Nutrition Examination I: epidemiologic follow-up survey. **Semin. Arthritis Rheum.**, **18 (2)**: 4-9, 1989.

HOCHBERG, M. C. Role of intra-articular hyaluronic acid preparations in medical management of osteoarthritis of the knee. **Semin. Arthritis Rheum.**, **30(2)**:2-10, 2000.

HOFF, T.; DeWITT, D.; KAEVER, V.; RESCH, K.; GOPPEL-STRUEBE, M. Differentiation-associated expression of prostaglandin G/H synthase in monocytic cells. **FEBS Lett.**, **320(1)**: 38-42, 1993.

HOLSCHER, C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. **Trends Neurosci.**, **20(7)**: 298-303, 1997.

HOLTHUSEN, H.; ARNDT, J. Nitric oxide evokes pain in humans on intracutaneous injection. **Neurosci. Lett.**, **165(1-2)**: 71-74, 1994.

HOLLANDER, A. P.; PIDOUX, I.; REINER, A.; RORABECK, C.; BOURNE, C.; POOLE, A. R. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. **J. Clin. Invest.**, **96**: 2859-2869, 1995.

HONGBIN, W.; JINGYUAN, D.; LINYUN, C.; YUMING, D. Carboxymethylated chitin reduces MMP-1 expression in rabbit ACLT osteoarthritic cartilage. **Ann. Rheum. Dis.**, **63**: 369-372, 2004.

HUSKISSON, E. C.; DONNELLY, S. Hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis of the knee. **Rheumatology (Oxford)**; **38(7)**: 602-607, 1999.

HURWITZ, D. E.; SHARMA, L.; ANDRIACCHI, T. P. Effect of Knee pain on joint loading in patients with osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, **11(5)**: 422-426, 1999.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84(4)**: 9265-9269, 1987.

IGNARRO, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Ann. Vet. Pharmacol. Toxicol.**, **30**: 535-560, 1990.

ISHIGURO, N.; ITO, T.; ITO, H.; IWATA, H.; JUGESSUR, H.; IONESCU, M.; POOLE, A.R. Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, **42(1)**: 129-136, 1999.

ISLAM, N.; HAQQI, T. M.; JEPSEN, K. J.; KRAAY, M.; WELTER, J. F.; GOLDBERG, V. M.; MALEMUD, C. J. Hydrostatic pressure induces apoptosis in human chondrocytes from osteoarthritic cartilage through up-regulation of tumor necrosis factor – alpha, inducible nitric oxide synthase, p53, c-myc, and bax – alpha, and suppression of bcl-2. **J. Cell Biochem.**, **87(3)**: 266-278, 2002.

ISHII, H.; TANAKA, H.; KATOH, K.; NAKAMURA, H.; NAGASHIMA, M.; YOSHINO, S. Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. **Osteoarth. Cart.**, **10(4)**: 277-281, 2002.

JAHN, M.; BAYNES, J. W.; SPITELLER, G. The reaction of hyaluronic acid and its monomers, glucuronic acid and N-acetylglucosamine, with reactive oxygen species. **Carbohydr. Res.**, **321(3-4)**:228-34, 1999.

JAIN, N. K.; PATIL, C. S.; SINGH, A.; KULKAMI, S. K. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Brain Res.**, **909**: 170-178, 2001.

JAQUES, L.B.; BALLIEUX, R.E.; DIETRICH, C.P.; KANAGH, L.W. A microelectrophoresis method for heparin. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, **46**: 351-360, 1968.

JENNER, P.; PLOANOW, C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, **47 (6 Suppl 3)**: 161-170, 1996.

JOHNSON, K.; JUNG, A.; MURPHY, A.; ANDREYEV, A.; DYKENS, J.; TERKELTAUB, R. Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. **Arthritis Rheum.**, **43(7)**: 1560-1570, 2000.

JOHNSON, K.A.; HAY, C.W.; CHU, Q.; ROE, S.C.; CATERSON, B. Cartilage-derived biomarkers of osteoarthritis in synovial fluid of dogs with naturally acquired rupture of cranial cruciate ligament. **Am. J. Vet. Res.**, **63(6)**: 775-781, 2002.

JOHNSON, R. G.; POOLE, A. R. The early response of articular cartilage to ACL transection in a canine model. **Exp. Pathol.**, **38(1)**: 37-52, 1990.

JONES, J.; STOODLEY, R. Fractionation using copper complexes. **Methods Carbohydr. Chem.**: 5: 36, 1965.

JOUZEAU, J-Y.; TERLAIN, B.; P ABID, A.; NÉDÉLEC, E.; NETTER, P. Cyclooxygenase isoenzymes. **Drugs**, **53(4)**: 565-582, 1997

JOUZEAU, J-Y.; GILLET, P.; NETTER, P. Interest of animal models in preclinical screening of anti-osteoarthritic drugs. **Joint Bone Spine**, **67**: 565-569, 2000.

KANWAR, Y.S. and FARQUHAR, M.G. Increase permeability of glomerular basement membrane to ferritin after removal glycosaminoglycans (heparin sulfate) by enzyme digestion. **J. Cell Biol.**, **8(6)**: 688-693, 1980.

KARAN, A.; KARAN, M. A.; VURAL, P.; ERTEN, N.; TASCIOGLU, C.; AKSOY, C.; CANBAZ, M.; ONCEL, A. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. **Clin. Rheumatol.**, **22(6)**: 397-399, 2003.

KEMPSON, G. E.; FREEMAN, M. A. R.; SWANSON, S. A. V. The determination of a creep modulus for articular cartilage from indentation tests on the human femoral head. **J. Biomechanics**, **4**: 239-250, 1971.

KENGATHARAN, M.; SZABO, C.; De KIMPE, S. J. et al. S-methyl-isothiurea, a potent inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase has beneficial haemodynamic effects in Gram positive and Gram negative forms of circulatory shock. **FASEB J.**, **9**: A28-A32, 1995.

KENGATHARAN, M.; De KIMPE, S. J.; THIEMERMANN, C. Role of nitric oxide in the circulation failure and organ injury in a rodent model of Gram-positive shock. **Br. J. Pharmacol.**, **119**: 1411-1421, 1996.

KEUTTNER, K; GOLDBERG, V.M. eds. Osteoarthritic disorders. In: ROSEMONT, I.L. **American Academy of Orthopedic Surgeons**: xxi-xxv. 1995.

KIAER, T.; GRONLUND, J.; SORENSEN, K. H. Intraosseus pressure and partial pressures of oxygen and carbon dioxide in osteoarthritis. **Semin. Arthritis Rheum.**; **18(2)**: 57-60, 1989.

KINDGEN-MILLES, D.; ARNDT, J. O. Nitric oxide as a chemical link in generation of pain from veins in humans. **Pain**, **64**: 139-142, 1996.

KIEFFER, D.A.; CURNOW, R.J.; SOUTHWELL, R.B.; TUCKER, W.F.; KENDRICK, K.K. Anterior cruciate ligament arthroplasty. **Am. J. Sports Med.**, **12**: 301-3012, 1984.

KIRWAN, J. Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee? **Knee**, **8(2)**: 93-101, 2001.

KNUDSON, C. B. Hyaluronan-receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix. **J. Cell Biol.**, **120**: 825-834, 1993.

KOBAYASHI, K.; IMAIZUMI, R.; SUMICHIKA, H.; TANAKA, H.; GODA, M.; FUKUNARI, A.; KOMATSU, H. Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. **J. Vet. Med. Sci.**, **65(11)**: 1195-1199, 2003.

KRAUSE, W; BELLOMO, E; COLBY, R. Rheology of sodium hyaluronate under physiological conditions. **Biomacromolecules**, **2(1)**:65-69, 2001.

KRISHNAIAH, Y. S., SATYANARAYANA, S, PRASAD, Y. V. Studies of guar gum compression-coated 5-aminosalicylic acid tablets for colon-specific drug delivery. **Drug Dev Ind Pharm.** **25(5)**:651-657, 1999.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 4651-4655, 1991.

KUBES, P.; KANWAR, S.; NIU, X. F.; GABOURY, J. P. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. **FASEB J.**, **7(13)**: 1293-1299, 1993.

LANE, N. E. Pain management in osteoarthritis: the role of COX-2 inhibitors. **J. Rheumatol.**, **49**: 20-24, 1997.

LASZLO, F.; EVANS, S.M.; WHITTLE, B. J. R. Aminoguanidine inhibits both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in rat intestinal microvasculature in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, **272**: 169-175, 1995.

LAURETTI, G. R.; de OLIVEIRA, R.; REIS, M. P.; MATTOS, A. L.; PEREIRA, N. L. Transdermal nitroglycerine enhances spinal sufentanil postoperative analgesia following orthopedic surgery. **Anesthesiology**, **90(3)**: 734-739, 1999.

LAWAND, N. B.; WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. **Neurorep.**, **8**: 895-899, 1997.

LECO, K. J.; KHOKHA, R., PAVLOFF, N.; HAWKES, S. P.; EDWARDS, D. R. Tissue inhibitor metalloproteinase-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. **J. Biol. Chem.**, **269(12)**: 9352-9360, 1994.

LEE, M.S.; TRINDADE, M. C.; IKENOUE, T.; SCHURMAN, D. J.; GOODMAN, S. B.; SMITH, R. L. Effects of shear stress on nitric oxide and matrix protein gene expression in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. **J. Orthop. Res.**, **20(3)**: 556-561, 2002.

LESLEY, J.; HOWES, N.; PERSCHL, A.; HYMAN, R. Hyaluronan binding function on CD44 is transiently activated on T cells during an in vivo immune response. **J. Exp. Med.**, **180**: 383-387, 1994.

LEVY, D.; ZOCHODNE, D. W. Local nitric oxide synthase activity in a model of neuropathic pain. **Eur. J. Neurosci.**, **10(5)**: 1846-1855, 1998.

LEVY, D.; HOKE, A.; ZOCHODNE; D. W. Local expression of inducible nitric oxide synthase in a animal model of neuropathic pain. **Neurosci. Lett.**, **260(3)**: 207-209, 1999.

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

LIANG, M.H.; FORTIN, P. Management of osteoarthritis of the hip and knee. **N. Eng. J. Med.**, **325**: 125-127, 1991.

LICIANI, A.; SYLVESTER, J.; LI, W.Q.; HUANG, W.; DEHNADE, F.; AHMAD, M.; ZAFARULLAH, M. Inductuion of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. **Exp. Cell Res.**, **288(1)**: 208-217, 2003.

LINDBLAD, S.; HEDFORS, E. Arthroscopic and synovial correlates of pain in osteoarthritis. **Semin. Arthritis Rheum.**, **18(2)**: 91-93, 1989.

LINDBLON, U. et al. Pain terms. A current list with definitions and notes on usage. Apud MERSKEY, H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain (Supplement)**, **3**: 215-221, 1986.

LINDENHAYN, K.; HEILMANN, H. H.; NIEDERHAUSEN, T.; WALTHER, H. U.; POHLENZ, K. Elimination of tritium-labelled hyaluronic acid from normal and osteoarthritic rabbit knee joints. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, **35(5)**:355-363, 1997.

LIU, S. F.; CRAWLEY, D. E.; ROHDE, J. A. L.; EVANS, T. W.; BARNES, P.J. role of nitric oxide and guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate in mediating nonadrenergic,

noncholinergic relaxation in guinea-pig pulmonary arteries. **Br. J. pharmacol.**, **107**: 861-866, 1992.

LOENING, A. M.; JAMES, I. E.; LEVENSTON, M. E.; BADGER, A. M.; FRANK, E. H.; KURZ, B.; NUTTALL, M. E.; HUNG, H. H.; BLAKE, S. M.; GROZINSKY, A. J.; LARK, M. W. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. **Arch. Biochem. Biophys.**, **381(2)**: 205-212, 2000.

LOHMANDER, L.S.; IONESCU, M.; JUGESSUR, H.; POOLE, A.R. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, **42(3)**: 534-544, 1999.

LOPEZ, M. J.; KUNZ, D.; VANDERBY Jr., R.; HEISEY, D.; BOGDANSKE, J.; MARKEL, M. M. A comparison of joint stability between anterior cruciate intact and deficient knees: a new canine model of anterior cruciate ligament disruption. **J. Orthop. Res.**, **21**: 222-230, 2003.

MACH, D.B.; ROGERS, S.D.; SABINO, M.C.; LUGER, N.M.; SCHWEI, M.J.; POMONIS, J.D.; KEYSER, C.P.; CLOSIHY, D.R.; ADAMS, D.J.; O'LEARY, P.; MANTYH, P.W. Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. **Neuroscience**, **113 (1)**: 155-166, 2002.

MALEMUD, C. J. Changes in proteoglycans in osteoarthritis: biochemistry, ultrastructure and biosynthetic processing. **J. Rheumatol. Suppl.**,**27**: 60-62, 1991.

MANEK, N. J.; CICUTTINI, F. M.; SPECTOR, T. D. The genetics of osteoarthritis. In: HOCHBERG, M.C.; SILMAN, A.J.;SMOLEN, J.S; WEINBLAT, M. E.; WEISMAN, M. H. **Rheumatology**. Volume two. 3rd edition. London: Mosby, 2003.

MANKIN, H.J., LIPPIELLO, L. The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage. **J. Clin. Invest.**, **50**: 1712-1719, 1971.

MANKIN, H.J.; BRANDT, K.D.; SHULMAN, L.E. Workshop on etiopathogenesis of osteoarthritis: proceeding and recommendation. **J. Rheumatol.**, **13**:1130-1160, 1986.

MARSHALL, K. W.; CHAN, A. D. M. Arthroscopic anterior cruciate ligament transection induces canine osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, **23**: 338-342, 1996.

MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. **Biogerontology**, **3(5)**:257-264, 2002.

McCALL, T. B.; FEELISCH, M.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. **Br. J. Pharmacol.**, **102**: 234-238, 1991.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain**: descriptions of chronic pain syndromes and definitions in pain terms. 2nd edition. Seattle: IASP Press, 1994.

MIWA, M.; SAURA, R.; HIRATA, S.; HAYASHI, Y.; MIZUNO, K.; ITOH, H. Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP-dependent pathway. **Osteoarthr. Cart.**, **8(1)**: 17-24, 2000.

MIYAMOTO, M.; ITO, H.; MUKAI, S.; KOBAYASHI, T.; YAMAMOTO, H.; KOBAYASHI, M.; MARUYAMA, T.; AKIYAMA, H.; NAKAMURA, T. Simultaneous stimulation of EP2 and EP4 is essential to the effect of prostaglandin E2 in chondrocyte differentiation. **Osteoarth. Cart.**, **11(9)**: 644-652, 2003.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; The L-arginine:nitric oxide pathway in the vessel wall. In: MONCADA, S; HIGGS, E. A. **Nitric Oxide from L-arginine: a bioregulatory system**. London, Elsevier Science Publishers, 1990, p.19-33.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, **43**: 109-142, 1991.

MONCADA, S.; FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of analgesia of aspirin-like drugs in the dog knee joint. **Eur. J. Pharmacol.**, **31(2)**: 250-260, 1975.

MOORE, P. K.; OLUYOMI, A. O.; BABBEDGE, R. C.; WALLACE, P.; HART, S. L. L- N^G -nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, **102**: 198-202, 1991.

MOSS, M.L.; JIN, S.L.; MILLA, M.E. et al. Cloning of a desintegrin metalloproteinase that process tumour-necrosis factor-alpha. **Nature**, **385**: 733-736., 1997.

MUIR, H.; BULLOUGH, P.; MAROUDAS, A. The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications. **J. Bone Joint Surg.**, **52B**: 554-563, 1970.

MURPHY, G.; CRABBE, T. Gelatinases A e B. **Methods Enzimol.**, **248**: 470-484, 1995.

MURRELL, G. A.; JANG, D.; WILLIAMS, R. J. Nitric oxide activates metalloproteinase enzymes in articular cartilage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **206(1)**: 15-21, 1995.

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol. Chem.**, **378**: 151-160, 1997.

NAKAMURA, A.; FUJITA, M.; SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanisms of bradykinin-induced peripheral hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, **117(3)**: 407-412, 1996.

NAKANE, M.; KLINGHOFER, V.; KUK, J.; DONNELLY, J. L.; BUDZIK, G. P.; POLLOCK, J. S.; BASHA, F. CARTER, G. W. Novel potent and selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase. **Mol. Pharmacol.**, **47(4)**: 831-834, 1995.

NOTOYA, K.; JOVANOVIC, D. V.; REBOUL, P.; MARTEL-PELLETIER, J.; MINEAU, F.; PELLETIER, J. P. The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. **J. Immunol.**, **165(6)**: 3402-3410, 2000.

OBRINK, B.; PERTOFT, H.; IVERUIS, P. et al. The effect of calcium on the macromolecular properties of heparan sulfate. **Connec. Tiss. Res.**, **3**:187-193, 1975.

O'CONNOR, B. L.; VISCO, D. M.; ROGERS, P. I.; MAMLIM, L. A.; BRANDT, K. D. Serial force plate analyses of dogs with unilateral knee instability, with or without interruption of sensory input from the ipsilateral limb. **Osearthr. Cart.**, **7**: 567-573, 1999.

OSBORNE, M. G.; CODERRE, T. J. Effects on intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, **126**: 1840-1846, 1999.

OSWALD, I. P.; GAZZINELI, R. T.; SHER, A.; JAMES, S. L. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. **J. Immunol.**, **148**: 3578-3582, 1992.

OU, P.; WOLFF, S. P. Aminoguanidine: a drug proposed for prophylaxis in diabetes inhibit catalase and generated hydrogen peroxyde in vivo. **Biochem. Pharmacol.**, **46**: 1139-1144, 1993.

KNOWLTON, R. G.; KATZENSTEIN, P. L.; MASKOWITZ, R. W. et al. Genetic linkage to a polymorphism in the type II collagen gene (COL2A1) to primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. **N. Eng. J. Med.**, **322**: 526-530, 1990.

PASQUALI RONCHETTI, I.; GUERRA, D.; TAPARELLI, F.; BORALDI, F.; BERGAMINI, G.; MORI, G.; ZIZZI, F.; FRIZZIERO, L. 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 (Oxford)**, **40(2)**: 158-169, 2001.

PATWARI, P.; COOK, M.N.; DiMICCO, M.A.; BLAKE, S.M.; JAMES, I.E.; KUMAR, S.; COLE, A.A.; LARK, M.W.; GRODZINSKY, A.J. Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. **Arthritis Rheum.**, **48(5)**: 1292-1301, 2003.

PELLETIER, J. P.; LASCAU-COMAN, V.; JOVANOVIC, D.; FERNANDES, J. C.; MANNING, P.; CONNOR, J. R.; CURRIE, M. G.; MARTEL-PELLETIER, J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors. **J. Rheumatol.**, **26(9)**: 2002-2014, 1999.

PELLETIER, J. P.; JOVANOVIC, D. V.; LASCAU-COMAN, V.; FERNANDES, J. C.; MANNING, P. T.; CONNOR, J. R.; CURRIE, M. G.; MARTEL-PELLETIER, J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo: possible link with the reduction in chondrocyte apoptosis and caspase 3 level. **Arthritis Rheum.**, **43(6)**: 1290-1299, 2000.

PELLETIER, J.M.; WELSCH, D.J.; PELLETIER, J.P. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, **15(5)**: 805-829, 2001.

PELLETIER, J. M. Pathophysiology of osteoarthritis. **Osteoarthr. Cart.**, 2003 (in press).

PENA EDE, L.; SALA, S.; ROVIRA, J. C.; SCHIMIDT, R. F.; BELMONTE, C. Elastoviscous substances with analgesic effects on joint pain reduce stretch-activated ion channel activity in vitro. **Pain**, **99(3)**: 501-508, 2002.

PINALS, R.S. Mechanisms of joint destruction, pain and disability in osteoarthritis. **Drugs**, **52(3)**: 14-20, 1996.

POOLE, A. R.; IONESCU, M.; SWAN, A.; DIEPPE, P.A. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. **J. Clin. Invest.**, **94(1)**: 25-33, 1994.

RAJFER, J.; ARONSON, W.J; BUSH, P.A.; DOREY, F. J.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. **New Engl. J. Med.**, **326**: 90-94, 1992.

RAISZ, L. G. Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology. **Osteoarthr. Cart.**,**79**: 83-84, 1999.

RAND, M. J. Nitrenergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, **19(3)**: 147-169, 1992.

REES, D. D.; CELLEK, S.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxides synthase and the associated effect on vascular tone. An insight into endotoxin shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **173**: 541-547, 1990a.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br. J. Pharmacol.**, **101(3)**: 746-752, 1990b.

Von RECHENBERG, B.; McILWRAITH, C. W.; AKENS, M. K.; FRISBIE, D. D.; LEUTENEGGER, C.; AUER, J. A. Spontaneous production of nitric oxide (NO), prostaglandin (PGE₂) and neutral metalloproteinases (NMPs) in media of explant cultures of equine synovial membrane and articular cartilage from normal and osteoarthritic joints. **Equine Vet. J.**, **32(2)**: 140-150, 2000.

RICKERY, M. S.; BAYLISS, M. T. Interleukin-1 induced nitric oxide inhibits sulphatation of glycosaminoglycan chains in human articular chondrocytes. **Biochem. Biophys. Acta**, **1425**: 282-290, 1998.

RITISMAKI, A.; NARKO, K.; HLA, T. Down-regulation of cytokine-induced cyclooxygenase-2 transcript isoforms by dexamethazone: evidence for post-transcriptional regulation. **Biochem. J.**, **318(1)**: 325-331, 1996.

ROBINSON, G. ROSS-MURPHY, S.; MORRIS, E. Viscosity-molecular weight relationships, intrinsic chain flexibility, and dynamic solution properties of guar gum. **Carbohydrate Res.**, **107(1)**: 17-32, 1982.

ROCHA, F. A. C.; ARAGÃO Jr., A. G. M.; OLIVEIRA, R. C.; POMPEU, M. M. L.; VALE, M. R.; RIBEIRO, R. A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation Res.**, **48**: 485-490, 1999.

ROCHA, J. C. S.; PEIXOTO, M. E. B.; JANCAR, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, **136**: 588-596, 2002.

SAHA, N.; MOLDOVAN, F.; TARDIF, G. et al. Interleukin-1beta-converting enzyme in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. **Arthritis Rheum.**, **42**: 1577-1587, 1999.

SAHAP AKIT, O. Leukotriene B4 and prostaglandin E2-like activity in synovial fluid in osteoarthritis. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, **39(4)**: 253-254, 1990.

SAITO, I.; KOSHINO, T.; NAKASHIMA, K.; UESUGI, M.; SAITO, T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. **Osteoarthr. Cart.**, **10(2)**: 156-162, 2002.

SAKANE, M.; LIVESAY, G.A.; FOX, R.J.; RUDY, T. W.; RUNCO, T. J.; WOO, S. L. Relative contribution of the ACL, MCL, and bony contact to the anterior stability of the knee. **Knee Surg. Sports Tramamol. Arthrosc**, **7(2)**: 93-97, 1999.

SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; YONEZAWA, A.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Effect of spinal nitric oxide inhibition of capsaicin-induced nociceptive response. **Life Sci.**, **59(11)**: 921-930, 1996.

SASAKI, K.; HATTORI, T.; FUJISAWA, T.; TAKAHASHI, K.; INUOE, H.; TAKIGAWA, M. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. **J. Biochem. (Tokyo)**, **123(3)**: 431-439, 1998.

SCHARSTUHL, A.; van BEUNINGER, H.M.; VITTER, E.L., van der KRAAN, P.M.; van der BERG, W.B. Loss of transforming growth factor counteraction on interleukin 1 mediated effects in cartilage of old mice. **Ann. Rheum. Dis.**, **61(12)**: 1095-1098, 2002.

SCHARSTUHL, A.; VITTER, E.L., van der KRAAN, P.M.; van der BERG, W.B. Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral

overexpression in transforming growth beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, **48(12)**: 3442-34521, 2003.

SCHUMACHER, H. R. The role of inflammation and crystals in the pain of osteoarthritis. **Semin. Arthritis Rheum.**, **18(2)**: 81-85, 1989.

SCOTT, D.; COLEMAN, P.; MASON, R.; LEVICK, J. R. Action of polysaccharides of similar average mass but differing molecular volume and charge on fluid drainage through synovial interstitium in rabbit knees **J. Physiol.**, **528(3)**: 609-618, 2000.

SEGUIN, C.A.; BERNIER, S.M. TNFalpha suppresses link protein and type II collagen in chondrocytes: Role of MEK1/2 and NF-kappaB signaling pathways. **J. Cell. Physiol.**, **197(3)**: 356-369, 2003.

SERRE, C.M.; FARLAY, D.; DELMAS, P.D.; CHENU, C. Evidence for a dense and intimate innervation of bone tissue, including glutamate-containing fibers. **Bone**, **25(6)**: 623-629, 1999.

SETTON, L. A.; ELLIOTT, D. M.; MOW, V. C. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. **Osteoarthr. Cart.** **7**: 2-14, 1999.

SHARIF, M.; OSBORNE, D. J.; MEADOWS, K.; WOODHOUSE, S. M.; COLVIN, E. M.; SHEPSTONE, L. DIEPPE, P. A. The relevance of chondroitin and keratan sulphate markers in normal and arthritis synovial fluid. **Br. J. Rheumatol.**, **35**: 951-957, 1996.

SILVER, F.H.; BRADICA, G.; TRIA A. Relationship among biomechanical, biochemical, and cellular changes associated with osteoarthritis. **Crit. Rev. Biomed. Eng.**, **29 (4)**:373-91, 2001a.

SILVER, F.H.; BRADICA, G.; TRIA, A. Viscoelastic behavior of osteoarthritic cartilage. **Connect Tissue Res.**, **42(3)**: 223-233, 2001b.

SLEDGE, C. B. Biology of the joint. In: KELLY, W. N.; HARRIS Jr., E. D.; RUDDY, S.; SLEDGE, C. B. **Textbook of Rheumatology**. Vol 1.3rd edition. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1993.

SMITH, M.D.; TRIANTAFILLOU, S.; PARKER, A.; YOUSSEF, P.P.; COLEMAN, M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, **24(2)**: 365-371, 1997.

SOPPIRNARTH, K. S.; AMINABHAVI, T. M. Water transport and drug release study from cross-linked polyacrylamide grafted guar gum hydrogel microspheres for the controlled release application. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, **53(1)**: 87-89, 2002.

SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP signaling pathway in rat brain. **Neuropharmacol.**, **32(11)**: 1267-1277, 1993.

SOUTHAN, G. Z.; SZABO, C.; THIERMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **Br. J. Pharmacol.**, **114**: 510-516, 1995.

SPRENG, D.; SIGRIST, N.; JUNGI, T.; BUSATO, A.; LANG, J.; PFISTER, H.; SCHAWALDER, P. Nitric oxide metabolite production in the cranial cruciate ligament, synovial membrane, and articular cartilage of dogs with cranial cruciate ligament rupture. **Am. J. Vet. Res.**, **61(5)**: 530-536, 2000.

STAIR-NAWY, S.; CSOKA, A. B.; STERN, R. Hyaluronidases expression in human skin fibroblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **266(1)**: 268-273, 1999.

STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; EVANS, C.H. Nitric oxide and arthritis. **Arthritis Rheum.**, **36(8)**: 1038-1044, 1993.

STEFANOVIC-RACIC, M., MEYERS, K.; MESCHTER, C.; COFFEY, J. W.; HOFFMAN, R. A.; EVANS, C. H. N-monomethyl-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, suppresses the development of adjuvant arthritis in rats. **Arthritis Rheum.**, **37(7)**: 1062-1069, 1994.

STEPHENS, R. W.; GHOSH, P.; TAYLOR, T. K. F.; GALE, C. A.; SWANN, J. C.; ROBINSON, R. G., WEBB, J. The origins and relative distribution of polysaccharidases in rheumatoid and osteoarthritic fluids. **J. Rheumatol.**, **2(4)**: 393-400, 1975.

STICHTENOTH, D. O.; FRÖLICH, J. C. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. **Br. J. Rheumatol.**, **37**: 246-257, 1998.

STOOP, R.; BUMA, P.; van der KRAAN, P. M.; HOLLANDER, A.P.; BILLINGHURST, R.C.; MEIJERS, T.H.M.; POOLE, A.R.; van den BERG, W.B. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. **Arthritis Rheum.**, **43(9)**: 2121-2131, 2000.

STOOP, R.; BUMA, P.; van der KRAAN, P. M.; HOLLANDER, A.P.; BILLINGHURST, R.C.; MEIJERS, T.H.M.; POOLE, A.R.; van den BERG, W.B. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. **Osteoarthr. Cart.**, **9(4)**: 308-315, 2001.

STOVE, J.; GERLACH, C.; HUCH, K.; GUNTHER, K.P.; BRENNER, R.; PUHL, W.; SCHARF, H.P. Gene expression of stromelysin and aggrecan in osteoarthritic cartilage. **Pathobiology**, **69(6)**: 333-338, 2001.

STUDER, R. K.; LEVICOFF, E.; GEORGESCU, H.; MILLER, L.; JAFFURS, D.; EVANS, C. H. Nitric oxide inhibits chondrocyte response to IGF-I: inhibition of IGF-IRbeta tyrosine phosphorylation. **Am. J. Cell Physiol.**, **279(4)**: C961-964.

STUDER, R. K.; DECKER, K.; MELHEM, S.; GEORGESKU, H. Nitric oxide inhibition of IGF-1 stimulated proteoglycan synthesis: role of cGMP. **J. Orthop. Res.**, **21(5)**: 914-921, 2003.

SUTER, E.; HERZOG, W.; LEONARD, T.R.; NGUYEN, H. One-year changes in hind limb kinematics, ground reaction forces and knee stability in an experimental model of osteoarthritis. **J. Biomechanics**, **31**: 511-517, 1998.

TAKAHASHI, K.; HASHIMOTO, S.; KUBO, T.; HIRASAWA, Y.; LOTZ, M.; AMIEL, D. Effect of hyaluronan on chondrocyte apoptosis and nitric oxide production in experimentally induced osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, **27(7)**: 1713-1720, 2000.

TAKAHASHI, K.; HASHIMOTO, S.; KUBO, T.; HIRASAWA, Y.; LOTZ, M.; AMIEL, D. Hyaluronan suppressed nitric oxide production in the meniscus and synovium of rabbit osteoarthritis model. **J. Orthop. Res.**, **19(3)**: 200-203, 2001.

TASKIRAN, D.; STEFANOVIC-RACIC, M.; GEORGESCU, H.; EVANS, C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **200(1)**: 142-148, 1994.

TEDESCO, L. S.; FUSELER, J.; GRISHAM, M.; WOLF, R.; ROERIG, S. C. Therapeutic administration of nitric oxide synthase inhibitors reverses hyperalgesia but not inflammation in a rat model of polyarthritis. **Pain**, **95**: 215-223, 2002.

TERCE-LAFORGUE, T.; CHARBONNIER, L.; MOSSE, J. Isolation and characterization of beta-gliadin fractions. **Biochim. Biophys. Acta**, **625(1)**:118-26, 1980.

TETLOW L. C.; ADLAM D. J.; WOOLLEY, D. E. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic

cartilage: associations with degenerative changes. **Arthritis Rheum.** **44(3)**: 585-594, 2001.

THIERMERMANN, C.; VANE, J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, **182**: 591-595, 1990.

THOMASSEN, M. J.; KAVURU, M. S. Human alveolar macrophages and monocytes as a source and target for nitric oxide. **Intern. Immunopharmacol.**, **1**: 1479-1490, 2001.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Rat knee joint incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, **48(3)**: 421-427, 1992.

TORTORELLA, M.; PRATTA, M.; LIU, R. Q.; ABBASZADE, I.; ROSS, H.; BURN, T.; ARNER, E. The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. **J. Biol. Chem.**, **275(33)**: 25791-25797, 2000.

TUNG, J.T.; VENTA, P. J.; CARON, J. P. Inducible nitric oxide expression in equine articular chondrocytes: effects of antiinflammatory compounds. **Osteoarthr. Cart.**, **10(1)**: 5-12, 2002.

UKAI, S.; KIHO, T.; HARA, C.; KURUMA, I.; TANAKA, Y. Polysaccharides in fungi. XIV. Anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. **J. Pharmacobiodyn.**, **6(12)**: 983-990, 1983.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biol.**, **231**: 232-235, 1971.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the model of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, **44**: 1-10, 1995.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, **38**: 97-120, 1998.

VANE, J.; BOTTING, R.; EMERY, P.; KARIM, Z.; CONAGHAN, P.G. **Clinician's manual on COX-2 inhibition and arthritis**. 1st edition. London: Science Press Ltd., 2000.

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

WEINBERG, J. B.; MISUKONIS, M. A.; SHAMI, P. J.; MASON, S. N.; SAULS, D. L. ; DITTMAN, W. A.; WOOD, E. R.; SMITH, G. K.; Mc DONALD, B.; BACHUS, K. E. et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **Blood**, **86(3)**: 1184-1195, 1995.

WHEELER, M. A. SMITH, S. D.; GARCIA GARDENA, G.; NATHAN, C. F.; WEISS, R. M.; SESSA, W. C. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. **J. Clin. Invest.**, **99(1)**: 110-116, 1997.

WIENTJES, R.; DUIJS, M.; JONGSCHAAP, R.; MELLEMA, J. Linear Rheology of Guar Gum Solutions. **Macromolecules**, **33**: 9594-9597, 2000.

WILKINSON, L. S.; EDWARDS, J. C. W. Microvascular distribution in normal human synovium. **J. Anat.**, **167**: 129-136, 1999.

WILKINSON, L. S.; PITSILLIDES, A. A.; WORRALL, J. G.; EDWARDS, J. C. W. Light microscopic characterization of the fibroblastic synovial lining cell (synoviocyte). **Arthritis Rheum.**, **35**: 1179-1184, 1992.

WILLIAMS, T.J.; MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature**, **246**: 215-217, 1973.

WILLIAMS, T.J. Prostaglandins E2, prostaglandin I2 and their vascular changes of inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, **65(3)**: 517-524, 1979.

WITTENBERG, R.H.; WILLBURGER, R.E.; KLEEMEYER, K.S.; PESKAR, B.A. In vitro release of prostaglandins and leukotrienes from synovial tissue, cartilage, and bone in degenerative joint diseases. **Arthritis Rheum.**, **36(10)**: 1444-1450, 1993.

WYKE, B. The neurology of joints: a review of general principles. **Clin. Rheumatol. Dis.**, **(7)**: 223-239, 1981.

WOBIG, M.; BACH, G.; BEKS, P.; DICKHUT, A.; RUNZHEIMER, J.; SCHWIEGER, G.; VETTER, G.; BALAZS, E. The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan G-F 20 and a lower-molecular-weight hyaluronan. **Clin. Ther.**, **21(9)**:1549-1562, 1999.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.**, **5**: 2145-2154, 1991.

WOLFF, D. J.; LUBESKIE, A. Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase. **Arch. Biochem. Biophys.**, **316(1)**: 290-301, 1995.

WOODIEL, F. N.; FALL, P. M.; RAISZ, L. G. Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae: structure-activity relations and signal transduction pathway. **J. Bone Miner. Res.**, **11**: 1249-1255, 1996.

WRIGHT, K. E.; MAURER, S. G.; Di CESARE, P. E. Viscosupplementation for osteoarthritis. **Am. J. Orthop.**, **29(2)**:80-88, 2000.

WU, W.; BILLINGHURST, R.C.; PIDOUX, I.; ANTONIOU, J.; ZUKOR, D.; TANZER, M.; POOLE, A. R. Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. **Arthritis Rheum.**, **46(8)**: 2087-2094, 2002.

YASUI, T.; AKATSUKA, M.; TOBETTO, K.; HAYAISHI, M.; ANDO, T. The effect of hyaluronan on interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. **Agents Actions**, **37(1-2)**:155-156, 1992.

YOON, Y. W.; VANDIVIER, R. W.; SUFFREDINI, A. F.; DANNER, R. L. Human polymorphonuclear leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. **Br. J. Pharmacol.**, **123(3)**: 390-399, 1998.

ZIESSEN, T.; MONCADA, S.; CELLEK, S. Characterization of the non-nitregic NANC relaxation response in the rabbit vaginal wall. **Br. J. Pharmacol.**, **135(2)**: 546-554, 2002.

Anexo

VIII. ANEXO

ANEXO 1: Declaração de aprovação junto ao CEPA-UFC.



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
CEP: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 288-8338 Fax: (85) 288-8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 03/03, sobre o projeto intitulado **“Modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior em ratos efeitos de fármacos antiinflamatórios”**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) em reunião realizada em 27 de agosto de 2003.

Fortaleza, 03 de setembro de 2003

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal - CEPA

Apêndices

APÊNDICE A- Incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

OA						
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
169,06	216,32	184,75	174,73	179,61	187,20	140,04
156,59	132,40	225,61	203,78	169,95	209,67	190,54
223,63	293,91	267,99	179,53	174,92	202,09	169,15
190,83	184,90	217,13	203,73	229,60	195,65	221,47
166,96	205,98	191,29	189,28	239,40	156,19	157,35
163,14	-	-	215,09	128,02	222,35	171,05
150,00	-	-	123,71	123,23	169,07	146,00
190,48	-	-	131,60	157,50	149,89	175,03
153,40	-	-	116,58	162,45	144,30	140,71
204,56	-	-	187,29	130,73	168,23	171,14
246,87	-	-	181,54	192,06	190,28	150,35

Nota: dados representam TSP em s/10min

D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
122,50	95,14	156,00	135,95	109,10	181,88	137,07
198,08	230,28	191,07	288,65	245,22	175,40	224,93
156,51	125,09	129,84	140,85	177,81	228,79	128,64
173,66	122,90	137,49	272,57	129,64	183,63	146,78
138,97	167,00	83,24	250,40	119,80	115,86	77,86
232,15	138,24	110,69	103,00	141,18	122,09	103,29
144,33	143,17	216,58	155,44	105,99	116,01	104,52
159,75	217,80	139,46	119,78	182,29	134,70	139,22
166,48	171,43	159,75	175,06	144,94	135,62	102,68
175,10	175,73	159,08	160,81	124,27	126,64	136,23
149,40	153,79	126,80	132,36	-	102,30	113,60
117,35	153,78	141,77	104,54	-	137,91	152,63
174,78	124,02	49,05	133,76	-	164,54	125,50
136,65	126,73	208,01	147,62	-	196,11	123,56
30,58	117,17	119,98	129,31	-	115,31	114,17
167,32	128,97	160,69	227,40	-	232,83	175,91

Nota: dados representam TSP em s/10min

OA						
D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21
91,66	96,91	88,33	86,65	135,57	75,59	122,58
153,94	185,57	185,62	129,71	158,66	134,91	148,79
92,26	127,33	107,74	132,37	111,70	91,49	119,58
151,15	117,36	138,55	116,30	136,34	144,02	142,55
162,14	116,64	73,91	108,80	68,69	80,82	90,70
134,40	139,87	148,59	147,75	153,96	130,41	-
138,60	117,29	114,10	119,50	111,99	82,02	-
150,04	147,35	111,95	121,08	147,56	102,52	-
114,02	102,99	124,57	82,93	58,03	74,15	-
123,36	163,25	105,70	91,18	121,46	110,34	-
149,92	173,07	144,04	117,02	129,45	105,19	-

Nota: dados representam TSP em s/10min

OA

D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28
97,74	-	116,21	99,14	163,49	120,19	128,86
128,90	-	103,12	128,42	151,04	176,19	147,62
153,41	-	135,86	117,70	116,73	109,53	123,08
111,73	-	146,43	116,16	124,66	141,85	197,18
73,02	-	87,67	114,29	130,78	91,96	99,42
106,44	121,64	86,14	117,04	110,34	-	-
89,16	92,22	64,03	73,51	68,87	-	-
84,87	99,98	89,08	101,969	99,62	-	-
62,35	66,14	58,16	139,35	94,14	-	-
77,73	76,30	90,33	87,04	82,21	-	-
68,50	84,74	109,66	93,50	108,96	-	-

Nota: dados representam TSP em s/10min

SHAM						
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
146,08	108,09	133,61	-	158,04	160,04	151,73
176,31	166,58	118,88	-	117,94	126,44	115,85
143,51	247,41	157,06	-	174,89	158,51	135,15
108,60	120,66	125,14	-	168,49	170,48	131,75
101,26	138,12	108,05	-	86,08	106,41	94,84
109,54	90,73	117,27	-	88,01	96,07	120,17
118,90	112,88	133,41	164,04	123,61	110,68	96,37
103,26	104,47	119,37	101,87	116,39	83,58	101,20
108,47	117,51	106,03	145,80	123,24	95,57	121,14
135,01	138,75	149,67	112,61	116,62	159,39	139,06
176,44	141,28	131,33	103,36	126,52	106,88	99,57
96,26	141,37	133,80	187,57	153,97	121,63	104,20

Nota: dados representam TSP em s/10min

SHAM

D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
128,83	167,46	123,31	115,67	117,53	128,25	81,84
163,54	151,04	97,99	98,23	93,57	91,76	101,92
85,18	163,61	97,32	86,32	92,09	106,34	82,34
130,61	125,96	90,03	98,04	83,17	166,52	93,44
138,77	115,82	105,21	78,29	81,21	97,75	98,11
86,26	103,47	97,56	80,72	81,37	75,63	81,53
84,36	131,90	74,44	90,13	122,63	85,18	118,13
108,65	90,80	81,02	86,71	81,57	87,25	96,07
120,33	115,47	131,93	90,99	106,44	113,25	104,77
142,42	141,69	104,68	104,53	130,80	142,32	104,81
104,07	110,98	89,42	74,75	156,42	86,79	141,52
156,15	115,65	127,67	112,71	124,99	102,24	111,30

Nota: dados representam TSP em s/10min

SHAM						
D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21
90,87	-	136,04	98,31	97,67	-	-
84,10	-	88,78	117,30	122,34	-	-
105,84	-	104,55	137,32	113,21	-	-
107,66	-	117,28	104,82	105,75	-	-
58,90	-	156,56	81,42	116,41	-	-
85,78	-	84,24	79,39	64,17	-	-
76,68	98,63	93,52	93,31	62,45	56,53	62,50
97,09	95,33	134,03	95,27	60,55	70,03	92,68
115,68	116,69	98,19	98,62	91,23	95,47	105,46
74,36	91,68	98,74	113,71	77,92	73,82	95,14
99,59	69,03	91,22	95,81	78,57	60,42	98,52
108,07	69,81	65,88	70,29	85,30	70,40	73,92

Nota: dados representam TSP em s/10min

SHAM

D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28
137,00	77,00	161,00	97,00	90,00	63,00	70,00
60,00	75,00	98,00	80,00	60,00	56,00	57,00
116,00	67,00	126,00	87,00	72,00	107,00	80,00
-	-	-	-	-	-	-
60,00	68,70	127,00	-	-	-	-
63,28	70,29	81,86	-	-	-	-
96,28	91,09	94,77	-	-	-	-
70,81	81,26	141,93	-	-	-	-
68,23	78,07	78,70	-	-	-	-
92,68	71,62	81,89	-	-	-	-

Nota: dados representam TSP em s/10min

NAIVE						
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
70,00	120,00	120,00	90,00	100,00	80,00	110,00
100,00	140,00	150,00	70,00	110,00	70,00	110,00
90,00	60,00	80,00	100,00	70,00	140,00	70,00
110,00	130,00	70,00	70,00	80,00	120,00	110,00
120,00	120,00	80,00	150,00	110,00	130,00	80,00
110,00	80,00	80,00	80,00	90,00	110,00	150,00

Nota: dados representam TSP em s/10min

NAIVE						
D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
70,00	120,00	120,00	90,00	100,00	80,00	110,00
100,00	140,00	150,00	70,00	110,00	70,00	110,00
90,00	60,00	80,00	100,00	70,00	140,00	70,00
110,00	130,00	70,00	70,00	80,00	120,00	110,00
120,00	120,00	80,00	150,00	110,00	130,00	80,00
110,00	80,00	80,00	80,00	90,00	110,00	150,00

Nota: dados representam TSP em s/10min

NAIVE

D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21
70,00	120,00	120,00	90,00	100,00	80,00	110,00
100,00	140,00	150,00	70,00	110,00	70,00	110,00
90,00	60,00	80,00	100,00	70,00	140,00	70,00
110,00	130,00	70,00	70,00	80,00	120,00	110,00
120,00	120,00	80,00	150,00	110,00	130,00	80,00
110,00	80,00	80,00	80,00	90,00	110,00	150,00

Nota: dados representam TSP em s/10min

NAIVE						
D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28
70,00	120,00	120,00	90,00	100,00	80,00	110,00
100,00	140,00	150,00	70,00	110,00	70,00	110,00
90,00	60,00	80,00	100,00	70,00	140,00	70,00
110,00	130,00	70,00	70,00	80,00	120,00	110,00
120,00	120,00	80,00	150,00	110,00	130,00	80,00
110,00	80,00	80,00	80,00	90,00	110,00	150,00

Nota: dados representam TSP em s/10min

APÊNDICE B - Efeito da administração profilática sistêmica de indometacina sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

OA-NT	SHAM	NAIVE	INDO
524,2	363,9	280,0	368,3
576,8	301,5	270,0	312,5
551,4	352,3	295,0	418,5
637,9	401,8	290,0	365,1
568,9	334,9	355,0	357,0
543,4	421,8	315,0	442,2
427,2	-	-	-
460,7	-	-	-
435,4	-	-	-
478,2	-	-	-
548,3	-	-	-

Nota: dados representam área sob TSP versus tempo em dias

**APÊNDICE C - Celularidade do exsudato articular de animais sujeitos à
Transecção do Ligamento Cruzado Anterior**

	NAIVE			OA			SHAM		
		7d	14d	28d		7d	14d	28d	
50	15	15	90	15	125	10			
40	50	50	85	120	40	10			
70	35	35	85	75	75	150			
20	30	30	35	10	60	80			
95	75	75	105	50	65	10			
25	45	45	10	150	80	5			

Nota: dados representam células/mm³

APÊNDICE D - Liberação de nitrito na cavidade articular de ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

	NAIVE			SHAM		
	7d	14d	28d	7d	14d	28d
0,8	15,4	6,0	5,7	4,2	4,9	2,7
2,5	12,7	5,3	5,1	1,3	1,0	3,0
0,4	6,4	3,0	2,3	1,3	5,2	7,8
1,7	4,8	6,6	3,3	5,2	1,4	6,0
0,6	10,2	10,3	12,4	3,0	10,6	-
0,4	3,1	5,8	4,6	1,2	5,6	-
	10,1	-	-	-	-	-
	6,6	-	-	-	-	-
	12,3	-	-	-	-	-

Nota: dados representam $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (μM)

APÊNDICE E - Concentração de Condroitin-sulfato (CS) total na matriz da cartilagem articular de ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

NAIVE	OA			SHAM		
	7d	14d	28d	7d	14d	28d
11,8	11,3	22,6	9,7	11,6	18,2	27,9
13,4	9,9	29,5	23,7	10,1	11,5	18,0
8,9	8,6	21,7	7,5	21,2	7,6	24,2
23,3	7,8	13,3	-	8,9	12,6	14,4
22,0	-	21,8	8,7	12,7	11,2	19,5
8,7	-	18,40	18,0	12,2	-	17,4
-	-	-	-	-	-	9,0

Nota: dados representam μg de condroitin-sulfato/mg de cartilagem seca

APÊNDICE F - Efeito da administração profilática sistêmica de L-NAME ou 1400W sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

SHAM	OA				
	NT	1400W	L-NAME	L-NAME + L-Arg	L-Arg
363,9	524,2	537,2	411,0	422,0	500,9
301,5	576,8	346,1	366,4	457,3	412,6
352,3	551,4	359,3	429,7	436,6	513,2
401,8	637,9	361,4	389,3	455,8	434,9
334,9	568,9	345,9	370,6	492,6	521,2
421,8	543,4	430,0	-	580,4	-
-	427,2	-	-	-	-
-	460,7	-	-	-	-
-	435,4	-	-	-	-
-	478,2	-	-	-	-
-	548,3	-	-	-	-

Nota: dados representam área sobTSP versus tempo em dias

APÊNDICE G - Efeito da administração terapêutica sistêmica de L-NAME e 1400W sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

NAIVE	SHAM	OA		
		NT	L-NAME	1400W
280,0	363,9	524,2	710,7	521,5
270,0	301,5	576,8	381,5	415,7
295,0	352,3	551,4	507,7	743,0
290,0	401,8	637,9	534,2	722,4
355,0	334,9	568,9	676,1	882,6
315,0	421,8	543,4	-	536,2
-	-	427,2	-	-
-	-	460,7	-	-
-	-	435,4	-	-
-	-	478,2	-	-
-	-	548,3	-	-

Nota: dados representam área sob TSP versus tempo em dias

APÊNDICE H - Efeito de preparações de GG sobre a deambulação em joelhos de ratos

SAL	GNP				GGP			
	Solução			Gel	Solução			Gel
	100µg	300µg	400µg	400µg	100µg	300µg	400µg	400µg
13,37	11,23	-	29,30	57,05	13,44	18,11	14,26	15,57
10,29	19,68	21,81	26,20	39,91	10,44	18,14	16,22	25,49
11,00	18,75	26,98	41,20	42,08	13,32	21,56	13,85	25,97
15,29	14,05	16,00	21,07	-	15,44	16,88	17,27	19,85
11,22	20,20	14,06	31,99	57,49	16,88	17,86	24,51	20,66
8,38	10,39	24,95	47,92	-	18,64	10,61	21,37	14,19

Nota: dados representam TSP em s/10min

APÊNDICE I - Efeito de preparações de GG sobre a celularidade em joelhos de ratos

SAL	GGNP				GGP			
	Solução			Gel	Solução			Gel
	100µg	300µg	400µg	400µg	100µg	300µg	400µg	400µg
0,60	0,635	0,755	2,065	1,715	0,114	0,232	0,108	0,205
0,133	0,485	0,635	0,630	1,630	0,160	0,346	-	0,185
0,074	0,350	1,645	1,215	1,800	0,250	0,070	0,200	0,405
0,051	0,495	0,725	0,445	1,430	0,158	0,144	0,292	0,110
0,057	0,760	1,050	1,185	-	0,284	0,138	0,220	1,100
0,051	0,360	1,120	2,015	3,270	0,224	0,136	0,175	0,478

Nota: dados representam células x 10⁴/mm³

APÊNDICE J - Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução ou reticulada (gel) e Hilano G-F 20 em ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior – curso temporal

OA						
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
169,06	216,32	184,75	174,73	179,61	187,20	140,04
156,59	132,40	225,61	203,78	169,95	209,67	190,54
223,63	293,91	267,99	179,53	174,92	202,09	169,15
190,83	184,90	217,13	203,73	229,60	195,65	221,47
166,96	205,98	191,29	189,28	239,40	156,19	157,35
163,14	-	-	215,09	128,02	222,35	171,05
150,00	-	-	123,71	123,23	169,07	146,00
190,48	-	-	131,60	157,50	149,89	175,03
153,40	-	-	116,58	162,45	144,30	140,71
204,56	-	-	187,29	130,73	168,23	171,14
246,87	-	-	181,54	192,06	190,28	150,35

Nota: dados representam TSP em s/10min

SHAM						
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
146,08	108,09	133,61	-	158,04	160,04	151,73
176,31	166,58	118,88	-	117,94	126,44	115,85
143,51	247,41	157,06	-	174,89	158,51	135,15
108,60	120,66	125,14	-	168,49	170,48	131,75
101,26	138,12	108,05	-	86,08	106,41	94,84
109,54	90,73	117,27	-	88,01	96,07	120,17
118,90	112,88	133,41	164,04	123,61	110,68	96,37
103,26	104,47	119,37	101,87	116,39	83,58	101,20
108,47	117,51	106,03	145,80	123,24	95,57	121,14
135,01	138,75	149,67	112,61	116,62	159,39	139,06
176,44	141,28	131,33	103,36	126,52	106,88	99,57
96,26	141,37	133,80	187,57	153,97	121,63	104,20

Nota: dados representam TSP em s/10min

Goma guar solução						
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
169,06	216,32	184,75	135,10	104,48	135,99	148,75
156,59	132,40	225,61	143,33	132,90	139,90	109,03
223,63	293,91	267,99	188,43	138,49	155,40	110,00
190,83	184,90	217,13	130,58	104,17	78,80	103,95
166,96	208,78	191,29	99,13	77,15	107,04	66,02
-	-	-	114,03	-	152,42	129,25

Nota: dados representam TSP em s/10min

Goma guar gel						
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
169,06	187,20	140,04	132,26	118,69	83,20	76,60
156,59	209,67	190,54	123,93	73,73	81,60	55,40
223,63	202,09	169,15	288,21	126,84	78,70	104,90
190,83	195,65	221,47	130,89	115,19	138,00	105,00
166,96	156,19	157,35	318,33	131,67	100,10	117,80
163,15	222,35	171,05	381,77	145,87	-	151,80
150,00	-	-	-	-	-	-

Nota: dados representam TSP em s/10min

Hilano G-F 20						
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
169,06	187,20	184,75	131,94	93,64	106,96	98,30
156,59	209,67	225,61	179,61	143,48	143,14	175,15
223,63	202,09	267,99	137,35	120,18	110,32	134,10
190,83	195,65	217,13	85,12	87,24	99,23	70,60
166,96	156,19	191,29	156,41	119,46	80,43	150,80
-	222,35	171,05	-	-	-	-

Nota: dados representam TSP em s/10min

APÊNDICE L - Efeito de administração terapêutica intra-articular de Goma Guar em solução ou reticulada (gel) e Hilano G-F 20 sobre a incapacitação articular ratos submetidos à Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

NAIVE	SHAM	OA			
		NT	GGP gel	GGP solução	Hilano G-F 20
280,0	363,9	524,2	324,5	385,8	318,0
270,0	301,5	576,8	203,7	392,3	436,3
295,0	352,3	551,4	365,0	449,8	396,2
290,0	401,8	637,9	368,8	289,1	267,3
355,0	334,9	568,9	438,5	261,6	401,5
315,0	421,8	543,4	482,6	467,5	-
-	-	427,2	-	-	-
-	-	460,7	-	-	-
-	-	435,4	-	-	-
-	-	478,2	-	-	-
-	-	548,3	-	-	-

Nota: dados representam área sob TSP versus tempo em dias