



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DOS GLICOSAMINOGLICANOS
PROVENIENTES DE CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA INDUZEM
AUMENTO DE IL-1 β E IL-17 IN VIVO E IL-1 β IN VITRO, UM POSSÍVEL
BIOMARCADOR PARA A OSTEOARTRITE.**

Rodolfo de Melo Nunes

Orientador: Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

FORTALEZA-CEARÁ

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICA

ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DOS GLICOSAMINOGLICANOS PROVENIENTES
DE CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA INDUZEM AUMENTO DE IL-1 β E IL-17
IN VIVO E IL-1 β *IN VITRO*, UM POSSÍVEL BIOMARCADOR PARA A
OSTEOARTRITE.

RODOLFO DE MELO NUNES

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

Orientador: Francisco Airton
Castro da Rocha

FORTALEZA-CEARÁ

2018

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

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

N928a Nunes, Rodolfo de Melo Nunes.
ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS DOS GLICOSAMINOGLICANOS PROVENIENTES DE
CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA INDUZEM AUMENTO DE IL-1β E IL-17 IN VIVO E IL-
1β IN VITRO, UM POSSÍVEL BIOMARCADOR PARA A OSTEOARTRITE. / Rodolfo de Melo
Nunes Nunes. – 2018.
106 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.

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

1. Osteoartrite. 2. Análise Elementar. 3. Glicosaminoglicanos. 4. Citocinas. I. Título.

CDD 610

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Título do trabalho: Alterações fenotípicas dos glicosaminoglicanos provenientes de cartilagem osteoartrítica induzem aumento de IL-1 β e IL-17 *in vivo* e IL-1 β *in vitro*, um possível biomarcador para a osteoartrite.

Autor: Rodolfo de Melo Nunes

Conceito: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Orientador (UFC)

Prof. Pablyana Leila Rodrigues Cunha

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Ana Carolina Matias Dinelly

Centro Universitário Católico do Ceará

Prof. Francisco Saraiva da Silva Junior

**Instituto Superior de Teologia Aplicada
(Centro Universitário - UNINTA)**

Prof. Virgínia Carneiro Girão

Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

Aos meus amigos Joanatan, Paulo, Jair, Anderson, George, Enzo, Hilton, Edvan e Luís, pela sincera amizade, constante presença e exemplo de conhecimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos do LIO: Anelise, Morgana, Dayane Hellen, Pedro Vasconcelos, Joaquim Vasconcelos e Viviane pelo imenso apoio e aprendizado.

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

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

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

RESUMO

A Osteoartrite (OA) é uma doença crônico-degenerativa onde parece ocorrer desequilíbrio entre a síntese e degradação da cartilagem articular. Associa-se à dor crônica e incapacidade funcional. Entretanto, a manifestação desses dois sinais caracteriza um quadro crônico e avançado, uma vez que em humanos, a inexistência de métodos objetivos e confiáveis para avaliar a evolução da OA limita o seu estudo clínico. As dificuldades incluem indisponibilidade do tecido para análise histopatológica, em particular nas fases iniciais da doença, ausência de marcadores biológicos confiáveis e padronização inconclusa em métodos de imagem. Levando em consideração que o sulfato de condroitina (CS) é o glicosaminoglicano (GAG) predominante na cartilagem. Além disso, alterações na quantidade e no seu peso molecular já foram demonstradas em estudos anteriores em animais e em seres humanos, então nós resolvemos investigar quais os tipos de alterações moleculares existentes nos pacientes e se isso estava relacionada à alteração no potencial inflamatório, posto que a caracterização dessas modificações poderiam ser um biomarcadores da OA. GAGs de pacientes submetidos à artroplastia por OA ou fratura foram isolados por proteólise enzimática, quantificados, analisados quanto a massa molar e elementar, e carga elétrica, e depois foram administrados (50µg/mL) intra-articular (i.a) em camundongos, avaliando-se dor (hipernocicepção), migração celular, sinovite e liberação de citocinas (pg/mL), após 6h no lavado articular bem como em sinoviócitos de camundongo cultivados na presença de GAG, medindo-se liberação de citocinas (ELISA – IL-1, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, CXCL-1, γ -INF e TNF- α); *= $p < 0.01$ e nd (não-detectado). A migração ainda foi avaliada após 7 dias. A mobilidade relativa e a massa molar do CS de seres humanos com OA não diferem, quando comparada com o grupo fratura, assim como elas não são alteradas pelo gênero e nem a massa molar do CS é alterado pela idade. Entretanto, a OA reduz as porcentagens de enxofre e carga negativa nos GAGs, quando comparado com o grupo fratura, bem como o gênero reduz as porcentagens de enxofre. GAG i.a de pacientes com ou sem OA induz influxo celular agudo. Todavia, eles não diferem quanto ao influxo celular agudo, crônico ou dor aguda, mas sim na sinovite. Já o influxo celular agudo é alterado pelo gênero. GAG i.a de pacientes com ou sem OA induz a liberação de citocinas, tais como: IL-6, IL-17, TNF- α , INF- γ , CXCL-1, IL-1 β e IL-10. Entretanto, a OA aumenta significativamente os níveis de IL-1 β e IL-17, assim como o grupo fratura aumenta significativamente os níveis de INF- γ e IL-10 no líquido sinovial, e a imunexpressão de iNOS na sinóvia. Ainda a liberação de citocinas induzida pelos GAGs não é alterado pelo gênero. In vitro, GAG induz a liberação de IL-6 in vitro. Contudo, somente os GAGs de pacientes com OA aumentam significativamente os níveis de IL-1 β . Essa é a primeira descrição que GAGs sofrem reduções elementares e na carga negativa. Além disso, promovem liberação de citocinas, cujo perfil difere em amostras de pacientes com e sem OA. A liberação in vivo é maior e mais diversificada que in vitro. A diferença no perfil de citocinas entre GAG de cartilagem de pacientes com e sem OA influi na definição de biomarcadores, uma necessidade não-atendida no manuseio dessa doença.

Palavras-chave: Osteoartrite, Análise Elementar, Glicosaminoglicanos, Citocinas

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative disease where there seems to be an imbalance between the synthesis and degradation of the articular cartilage. It is associated with chronic pain and functional disability. However, the manifestation of these two signs characterizes a chronic and advanced, since in humans, the lack of objective and reliable methods to evaluate the evolution of OA limits its clinical study. The difficulties include tissue unavailability for histopathological analysis, particularly in the early stages of the disease, absence of reliable biological markers, and unconventional standardization in imaging methods. Taking into account that chondroitin sulfate (CS) is the predominant glycosaminoglycan (GAG) in cartilage. In addition, changes in the amount and molecular weight have already been demonstrated in previous animal and human studies, so we decided to investigate the types of molecular changes in the patients and whether this was related to the change in inflammatory potential, since the characterization of these modifications could be a biomarkers of OA. GAGs of patients submitted to OA or fracture arthroplasty were isolated by enzymatic proteolysis, quantified, analyzed for molecular and elemental mass, and administered intra-articular (50 µg / mL) in mice, evaluating pain (hypernociception), (ELISA – IL-1, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, CXCL-1, γ -INF e TNF- α); * = p <0.01 and ud (undetected). The migration was still evaluated after 7 days. The relative motility and molar mass of CS from humans with OA do not differ as compared to the fracture group, as they are not altered by gender, nor does the molar mass of CS be altered by age. However, OA reduces sulfur and negative charge percentages in GAGs when compared to the fracture group, as well as the genus reduces sulfur percentages. GAG i.a from patients with or without OA induces acute cellular inflow. However, they do not differ in terms of acute, chronic or acute cellular influx, but in synovitis. Already the acute cellular influx is altered by gender. GAG i.a from patients with or without OA induces the release of cytokines, such as IL-6, IL-17, TNF- α , INF-Y, CXCL-1, IL-1 β and IL-10. However, OA significantly increases levels of IL-1 β and IL-17, as well as the fracture group significantly increases the levels of INF-Y and IL-10 in synovial fluid, and iNOS immunoexpression in synovium. Yet the release of cytokines induced by GAGs is not altered by gender. In vitro, GAG induces the release of IL-6 in vitro. However, only GAGs from patients with OA significantly increase IL-1 β levels. This is the first description that GAGs undergo elemental and negative charge reductions. In addition, they promote cytokine release, whose profile differs in samples from patients with and without OA. In vivo release is greater and more diverse than in vitro. The difference in the cytokine profile between cartilage GAG of patients with and without OA influences the definition of biomarkers, an unmet need in the handling of this disease.

Keywords: Osteoarthritis, Elementary Analysis, Glycosaminoglycans, Cytokines

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1.	INTRODUÇÃO	15
	1.1. Cartilagem articular	15
	1.1.1. Composição da cartilagem articular	15
	1.1.2. Colágeno	16
	1.1.3. Proteoglicanos	17
	1.1.4. Glicosaminoglicanos (GAGs)	20
	1.2. Osteoartrite (OA)	23
	1.2.1. Epidemiologia	24
	1.2.2. Fatores de risco	25
	1.2.3. Envelhecimento	25
	1.2.4. Obesidade	26
	1.2.5. Exercício repetitivo e de alto impacto	26
	1.2.6. Sexo	27
	1.2.7. Lesão	28
	1.2.8. Inflamação	29
	1.2.9. Dor	32
	1.2.10. Tratamentos da OA	34
	1.3. Modelos experimentais de OA	37
2.	JUSTIFICATIVA	41
3.	OBJETIVOS	43
	3.1. Objetivo geral	43
	3.2. Objetivos específicos	43
4.	MATERIAL E MÉTODO	44
	4.1. Coleta, extração e análise química de GAGs	44
	4.1.1. Coleta do material biológico humano	44
	4.1.2. Extração de GAGs da cartilagem articular humana e de ratos	46
	4.1.3. Identificação de GAGs da cartilagem articular humana por eletroforese em gel de agarose	48
	4.1.4. Quantificação de GAGs da cartilagem articular humana em gel de agarose	48
	4.1.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida	49
	4.1.6. Cromatografia de alta eficiência por exclusão de tamanho (HPSEC)	50
	4.1.7. Análise Elementar de GAGs da cartilagem articular humana	51
	4.1.8. Análise do potencial zeta	52
	4.2. Avaliação do potencial inflamatório de GAGs da cartilagem humana	52
	4.2.1. Animais	52
	4.2.2. Padronização da dose de GAG administrada intra-articular	52

	em camundongos naive.	
	4.2.3. Análise do influxo celular	53
	4.2.4. Análise da hipernocicepção	54
	4.2.5. Avaliação histopatológica	55
	4.2.6. Determinação dos níveis de CXCL-1, IL-17, IL-1 β , IFN- γ , IL-5, IL-6 e IL-10	55
	4.2.7. Imuno-histoquímica	56
	4.3. Estudo in vitro	57
	4.3.1. Cultura das células	57
	4.3.2. Ensaio do potencial inflamatório in vitro	58
	4.4. Análise estatística	58
5.	RESULTADOS	59
	5.1. Avaliação da massa molar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes por SDS-PAGE e HPSEC	59
	5.2. Avaliação da mobilidade e da massa molar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa de acordo com o gênero.	60
	5.3. Análise elementar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes sem ou com OA.	61
	5.4. Análise elementar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa de acordo com o gênero.	62
	5.5. Análise do potencial zeta dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes sem ou com OA	63
	5.6. Avaliação do influxo celular agudo induzido pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em animais naives	64
	5.7. Avaliação do influxo celular crônico induzido pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em animais naives	65
	5.8. Avaliação do influxo celular agudo induzido pela administração intra-articular de GAGs de acordo com o gênero.	66
	5.9. Avaliação da hipernocicepção aguda induzida pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em animais naives	67
	5.10. Avaliação da sinovite aguda induzida pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em animais naives	68
	5.11. Avaliação da liberação de mediadores inflamatórios agudos induzido pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em	69

animais naive.

5.12. Avaliação aguda da imunexpressão de iNOS na sinóvia de camundongos naive após à administração intra-articular de GAGs extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA.	71
5.13. Avaliação da liberação de mediadores inflamatórios agudos induzido pela administração intra-articular de GAGs de acordo com o gênero.	73
5.14. Avaliação da liberação de mediadores inflamatórios na cultura de sinoviócitos na presença de GAGs.	75
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÕES	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
9. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da matriz cartilaginosa em suas diferentes zonas ou camadas. Superficial (1), média (2), radiada (3) e calcificada (4), ossificação endocondral	17
Figura 2. Estrutura do proteoglicano. Fonte: Próprio autor.	19
Figura 3. Visão macroscópica e microscópica da matriz cartilaginosa. Fonte: Nunes 2013.	13
Figura 4. Esquema do protocolo de extração de glicosaminoglicanos da cartilagem articular.	48
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose. Fonte: Próprio autor.	49
Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Fonte: Próprio autor.	50
Figura 7. Cromatografia de alta eficiência por exclusão de tamanho (HPSEC) com GAGs. Fonte: Próprio autor.	51
Figura 8. Injeção intra-articular de GAGs em camundongos naïve. Fonte: Próprio autor.	53
Figura 9. Perfil cromatográfico (HPSEC) de amostras de paciente com e sem OA, respectivamente linha contínua e descontínua.	60
Figura 10. Imunoexpressão de iNOS na sinóvia de camundongos naïve após administração de GAGs	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características estruturais dos principais glicosaminoglicanos	22
Tabela 2. Dados demográficos e clínicos	44
Tabela 3. Mobilidade relativa e massa molar de pico dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.	59
Tabela 4. Avaliação da mobilidade e da massa molar dos GAGs de acordo com o gênero.	60
Tabela 5. Análise elementar dos GAGs dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.	61
Tabela 6. Análise elementar dos GAGs de acordo com o gênero.	62
Tabela 7. Análise do potencial zeta dos GAGs dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.	63
Tabela 8. Influxo celular induzido pela administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.	64
Tabela 9. Influxo celular crônico induzido pela administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.	65
Tabela 10. Influxo celular agudo induzido pelos GAGs de acordo com o gênero.	66
Tabela 11. Influxo celular induzido pela administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.	67
Tabela 12. Avaliação histopatológica aguda da sinovia de animais naives após a administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.	68
Tabela 13. Os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias após a administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.	70
Tabela 15. Liberação de citocinas agudas induzida pelos GAGs de acordo com o gênero.	74
Tabela 16. Liberação de citocinas in vitro.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

AGEs	Produtos finais de glicação avançada
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
BSA	Albumina bovina sérica
CEPA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CS	Sulfato de condroitina
CS4	Sulfato de condroitina 4
CS6	Sulfato de condroitina 6
CTV	Brometo de cetil-trimetil-amônio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
DMM	Desestabilização do menisco medial
DMOA	Drogas Modificadoras da Osteoartrite
D.O	Densidade ótica
EULAR	European League Against Rheumatism
FDA	Food and Drug Administration
GAGs	Glicosaminoglicanos
GPC	Cromatografia de permeação em gel
há	Ácido hialurônico
H&E	Hematoxilina – eosina
HPSEC	Cromatografia de alta eficiência por exclusão de tamanho
IASP	International Association for the Study of Pain
IL	Interleucina
IL-1Ra	Antagonista do receptor IL-1
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
NF- κ B	Fator nuclear-kappaB
MEM	Meio Essencial Mínimo
MMP	Metaloproteinases de matrix
NO	Óxido nítrico
ao	Osteoartrite
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
OPD	O-fenilenodiamina
PMAD	Padrões moleculares associados a danos
PBS	Tampão fosfato salino
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
This	Tris(hidroximetil)aminometano
TLCA	Transecção do ligamento cruzado anterior
TLR	Toll-like receptor
TNF	Fator de necrose tumoral

1.Introdução

1.1. Cartilagem articular

A cartilagem articular é um tecido altamente especializado que reveste as extremidades das articulações diartrodiais (livremente móveis), cuja função é proporcionar uma superfície lisa e lubrificada para as extremidades articulares, além de facilitar a transmissão e a distribuição de cargas que incidem sobre as superfícies ósseas. Apesar da ausência de vasos sanguíneos, ela é mantida pelo líquido sinovial e o osso subcondral (ARMIENTO et al., 2018). Por não possuir vasos, o transporte e a distribuição dos nutrientes ocorrem por difusão (MANSKE, 2015). Além da ausência de vasos sanguíneos e linfáticos, a cartilagem articular não apresenta inervação o que impossibilita a propagação do estímulo doloroso após sua lesão dificultando a detecção de alterações teciduais (ARMIENTO et al., 2018). Realmente, um dos primeiros sinais de dano ao tecido é a dor.

1.1.1. Composição da cartilagem articular

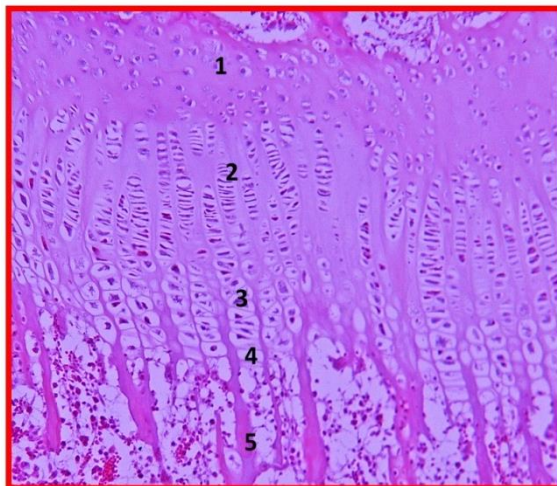
O tecido cartilaginoso é composto por condroblastos, condrócitos e matriz extracelular. Os condrócitos são células esféricas ou poliédricas que sintetizam e degradam os componentes orgânicos da matriz extracelular. Já os condroblastos (do grego *chondros* - cartilagem - e *blastos* - célula jovem) são originários de células estaminais mesenquimais (células tronco, ou seja, células embrionárias) e condrogênicas, possuem a forma arredondada, com núcleo central e vacúolos. Ainda essas células sintetizam a maior parte dos componentes da matriz, nomeadas de fibras de colágeno, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAGs) (AKKIRAJU & NOHE, 2015).

A matriz extracelular é formada por uma parte inorgânica, representada pelo fluido intersticial, e outra orgânica. A água é a principal molécula que compõe a parte inorgânica, correspondendo a 70-80% do peso total (PALUKURU et al., 2014). Já o componente orgânico, o qual representa 20-30% do peso úmido da cartilagem, é composto por glicoproteínas, colágeno, proteoglicano e GAGs.

1.1.2. Colágeno

O colágeno é a macromolécula mais abundante na cartilagem articular, cuja finalidade é garantir resistência a essa última. Sua distribuição varia de acordo com a profundidade da cartilagem, sendo mais concentrada nas camadas superficiais. Embora outros tipos de colágeno componham a matriz cartilaginosa, como o colágeno tipo III, IX e XI, VI, XIV, o tipo II, é o mais abundante, colaborando para a integridade estrutural da cartilagem. (LUO et al., 2017).

Embora ocorram diferenças na sua estrutura e composição, a cartilagem articular pode ser dividida em quatro regiões ou zonas, a saber: superficial, camada em contato com o líquido sinovial caracterizada pela cartilagem hialina sem alterações morfológicas, abundância de colágeno e escassez de proteoglicanos; média, caracterizada pela proliferação ativa de condrócitos enfileirados em colunas, presença de fibras colágenas dispostas quase obliquamente e proteoglicanos dispostos uniformemente; radiada, caracterizada por condrócitos hipertróficos e calcificação da matriz territorial, e por fibras dispostas paralelamente e abundância de proteoglicanos; calcificada, caracterizada pela matriz calcificada sob a forma de finos tabiques e em contato direto com o osso subcondral e presença de matriz mineralizada e pobre em proteoglicanos. (ESPANHA, 2010) (Figura 1)



Fonte:UNESP (<http://www.foa.unesp.br>)

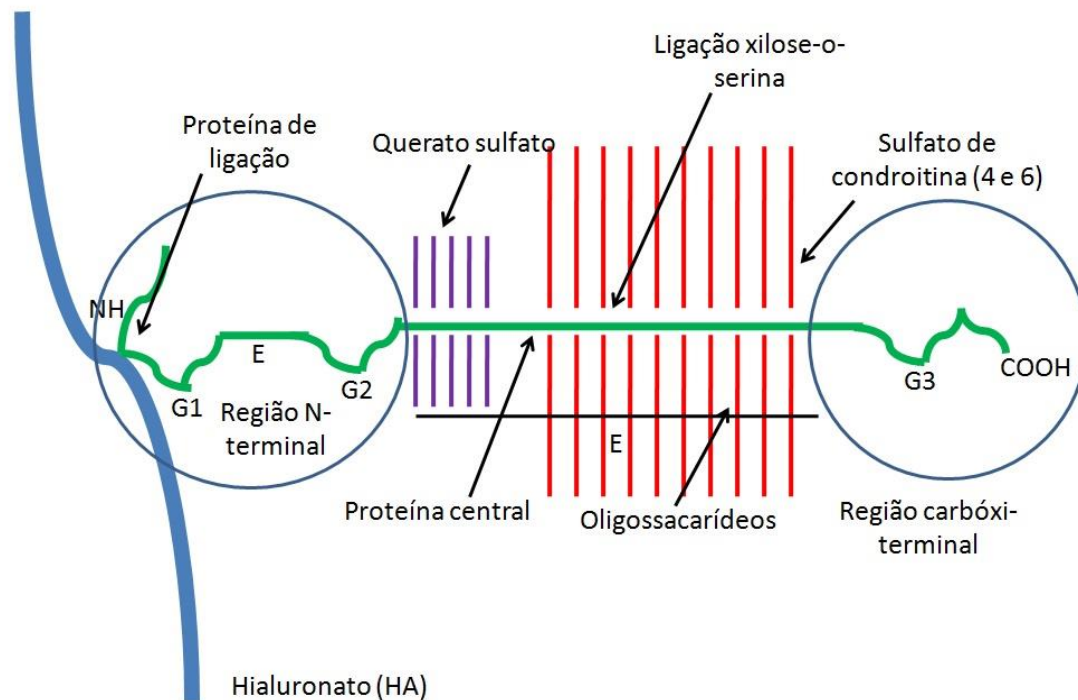
Figura 1-Estrutura da matriz cartilaginosa em suas diferentes zonas ou camadas. Superficial (1), média (2), radiada (3) e calcificada (4), ossificação endocondral

1.1.3. Proteoglicanos

Os proteoglicanos são moléculas formadas por um eixo proteico, no qual se ligam covalentemente cadeias laterais de GAGs. Eles podem ser divididos em quatro grupos, a saber: curtos, modulares, de superfície celular e intracelular. O primeiro se caracteriza por apresentar proteoglicanos curtos, ricos em leucina e formados por um centro proteico e uma cadeia de GAGs. Fazem parte desse grupo a decorina e o biglicano. Já os proteoglicanos modulares são aqueles que se encontram ligados ou não ao ácido hialurônico, como por exemplo, o agrecano e o proteoglicano ligado ao colágeno tipo IX. Quanto aos proteoglicanos de superfície celular, como a própria denominação indica, eles estão ligados à superfície celular (como, por exemplo, o sindecano e o glipicano). O último dos grupos é representado por proteoglicanos intracelulares, como o serglicano (IOZZO & SHAEFER, 2015; KÖWITSCH et al., 2017).

Independentemente do grupo de proteoglicanos ao qual pertença, os GAGs ligam-se ao centro protéico por meio do tetrassacarídeo, xilose-galactose-galactose-ácido glucurônico (GAG-GluGalGalXyl-O-CH₂-proteína ou xilose-o-serina), ou do N-asparaginil (NUNES, 2013).

Assim, a estrutura dos proteoglicanos, representada por uma proteína central (*core protein*), na qual se ligam perpendicularmente cadeias laterais de GAGs, associada à repulsão dessas cadeias pelas cargas negativas do ácido carboxílico e sulfato presentes nelas, contribue para o aspecto de “escova de tubo de ensaio” desses proteoglicanos. Por exemplo: o agrecano, considerado como o principal proteoglicano da cartilagem articular, o agrecano é formado por uma proteína nuclear ou axial, contendo duas regiões globulares próximas da região amino-terminal (G1 e G2) (ROUGHLEY et al., 2014, IOZZO & SHAEFER, 2015). G1, o maior dos complexos globulares, liga-se especificamente ao ácido hialurônico e proteína de ligação, conforme visto na figura 2. Entre as regiões G2 e G3 (terceiro domínio globular localizado na região carboxi-terminal), há uma região extensa de ligação aos GAGs (ROUGHLEY et al., 2014, IOZZO & SHAEFER, 2015). A ligação xilose-o-serina é responsável pela ligação dos GAGs à proteína central. Entretanto, a estrutura do agrecano pode variar em decorrência de alterações do comprimento, posição de sulfatação e substituição das cadeias de GAGs com a idade (NUNES, 2013).



Fonte: Próprio autor.

Figura 2 - Estrutura do proteoglicano.

No que diz respeito aos proteoglicanos presentes na cartilagem articular, esses compreendem o agrecano, decorina, biglicano, perlecano e versicano. Eles se diferenciam pela estrutura, função e concentração (SHAEFER & SHAEFER, 2010, IOZZO & SHAEFER, 2015).

Em relação às suas funções, eles podem agir na regulação da atividade de moléculas sinalizadoras; controle do tráfego de células e moléculas; co-receptores; interação com proteínas fibrosas da matriz; proliferação celular; seletividade da membrana basal; adesão e migração celular (IOZZO & SHAEFER, 2015).

Em relação à sua função, o agrecano ainda protege o ácido hialurônico da ação de hialuronidases, contribuindo para a manutenção do equilíbrio intra-tecidual. Portanto, pequenas modificações na estrutura do agrecano podem impactar diretamente

na função articular, posto que o agrecano está intimamente ligado à resistência cartilaginosa. De fato, ele resiste às forças incidentes sobre a cartilagem durante o uso da articulação (ROUGHLEY et al., 2014). Tal fenômeno ocorre da seguinte forma:

- a- As forças que incidem sobre a superfície articular promovem a aproximação das camadas de proteoglicanos e compressão do líquido pericelular, e, conseqüentemente, remoção do líquido.
- b- Após as forças cessarem, os proteoglicanos voltam a sua posição de origem e um novo líquido penetra essa região por difusão.

Esse fenômeno é extremamente importante para a manutenção do metabolismo da cartilagem, pois como ela não dispõe de vasos, o mecanismo de transporte dos nutrientes e de remoção de produtos liberados para o meio extracelular necessitam desse processo.

A degradação dos proteoglicanos ocorre usualmente na matriz extracelular, sendo executada por metaloproteases de matrix pertencentes à ADAMTS-family (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motifs). Quanto aos glicosaminoglicanos, sua degradação ocorre no lisossoma em uma sequência reversa à síntese (STANTON et al., 2011). Outras moléculas importantes dentro da estrutura do proteoglicano são os glicosaminoglicanos.

1.1.4. Glicosaminoglicanos (GAGs)

Os GAGs são polissacarídeos lineares, não-ramificados, constituídos de unidades dissacarídicas que se repetem. Essas são formadas por um açúcar aminado (N-acetil-glicosamina ou N-acetil-galactosamina) e um ácido urônico (ácido glicurônico ou idurônico) (KOWITSCH et al., 2017). Todavia, há exceções a essa estrutura,

representadas pelos sulfato de queratano e heparina, os quais apresentam uma galactose na posição do ácido urônico e uma glicosamina na posição do açúcar aminado, respectivamente (Tabela 1).

No que se refere a sua classificação, os GAGs se agrupam de acordo com a composição monomérica, tipo de ligações glicosídicas e grau e posição da sulfatação (Tabela 1).

Quanto aos GAGs que compõem os proteoglicanos, sobressaem o sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de queratano, heparina e ácido hialurônico (HA) (SOARES DA COSTA et al., 2017). O sulfato de condroitina (CS) é o GAG presente em maior quantidade na cartilagem articular. A sulfatação da N-acetil-galactosamina na posição C-4 ou C-6 origina o sulfato de condroitina 4 (CS4) ou sulfato de condroitina 6 (CS6), respectivamente. Ambos são componentes do agregano, contribuindo para a eletronegatividade desse proteoglicano e, conseqüente, retenção de líquido no tecido. Contudo, é possível que ocorra alteração da proporção de CS4 e CS6 com a idade (Figura 3) (NUNES, 2013).

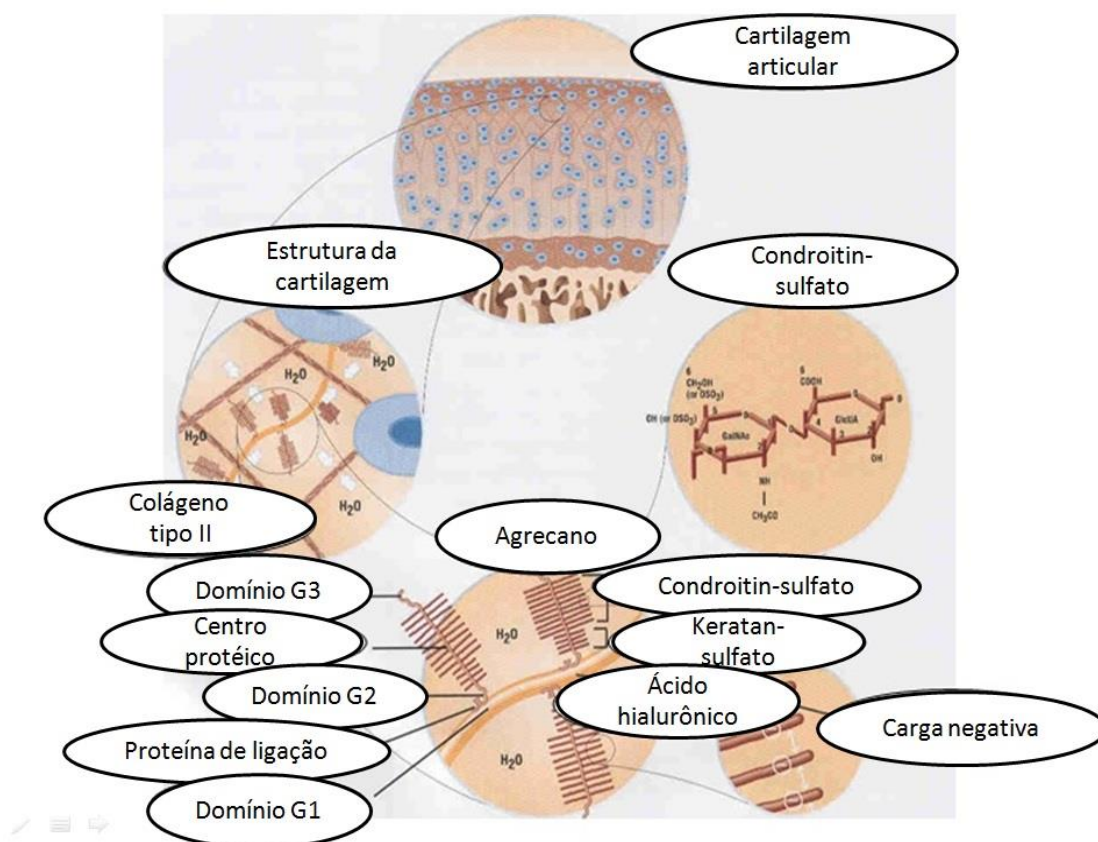
De fato, tem-se observada a alteração na síntese dos GAGs com a idade. Tal achado é evidente no encurtamento das cadeias de CS e do HA com o envelhecimento, bem como no alongamento da cadeia de sulfato de queratano, possibilitando a esse um predomínio entre os GAGs da cartilagem articular, nos estágios finais da vida. Essas alterações também são observadas nos proteoglicanos, com a redução do tamanho da cadeia da proteína central do agregano (ROUGHLEY et al., 2014).

Tabela 1: Características estruturais dos principais glicosaminoglicanos.

Glicosaminoglicano	Massa molar média (g/mol) ¹	Monossacarídeos ²	Posição	Ligação
				do sulfato
Sulfato de condroitina 4	2 – 5 x 10 ⁴	N-acetilgalactosamina	4	β (1→4)
		ácido glicurônico	-	β (1→3)
Sulfato de dermatano	2 – 5 x 10 ⁴	N-acetilgalactosamina	4	β (1→4)
		ácido glicurônico	-	β (1→3)
		ácido idurônico	-	β (1→3)
Sulfato de condroitina 4	2 – 7 x 10 ⁴	N-acetilgalactosamina	6	β (1→4)
		ácido glicurônico	-	β (1→3)
Ácido hialurônico	5 x 10 ⁵ – 5 x 10 ⁷	N-acetilglicosamina	-	β (1→4)
		ácido glicurônico	-	β (1→3)
Sulfato de queratano	1 – 3 x 10 ⁴	N-acetilglicosamina	6	β (1→3)
		Galactose	-/6	β (1→4)
Sulfato de heparano	1 – 6 x 10 ⁴	Glicosamina	2/6	α (1→4)
		N-acetilglicosamina	-/6	α (1→4)
		ácido glicurônico	-	β (1→4)
		ácido idurônico	-	α (1→4)
Heparina	5 x 10 ³ – 5 x 10 ⁴	Glicosamina	2/6	α (1→4)
		ácido glicurônico	-	β (1→4)
		ácido idurônico	2	α (1→4)

¹A massa molar média varia neste intervalo, segundo a fonte dos glicosaminoglicanos. ²Monossacarídeos em configuração D, exceto ácido idurônico (configuração L). Fonte: Nunes, 2013.

Acredita-se que esses fenômenos aconteçam pela manutenção da síntese de sulfato de queratano em ambiente escasso de oxigênio, o que não ocorre com o CS (EISENBERG, & MCPHERSON, 2009). Para o HA, a redução de seu tamanho decorra da ação de hialuronidase ou de radicais livres que provocariam a despolimerização da cadeia desse açúcar (STERN et al., 2007, MAUDENS et al., 2018). Exemplificando essa atuação, a hialuronidase 1 cliva de forma eficiente as cadeias de HA.



Fonte:Nunes 2013.

Figura 3 - Visão macroscópica e microscópica da matriz cartilaginosa.

1.2. Osteoartrite (OA)

Atualmente, a OA não é exclusivamente uma doença da cartilagem, mas da articulação como um todo, incluindo osso subcondral, ligamentos, músculos, sinóvia,

meniscos e cápsula articular (APPLETON, 2018). A OA é uma desordem crônica degenerativa que envolve articulações móveis. Esse distúrbio caracteriza-se pela presença de estresse celular e degradação da matriz extracelular, iniciados pela ocorrência de micro e macro-lesões, ativando vias pró-inflamatórias.

A doença se manifesta inicialmente como um distúrbio molecular (metabolismo anormal do tecido articular), seguido de alterações anatômicas e / ou fisiológicas (caracterizadas pela degradação da cartilagem, remodelação óssea, formação de osteófitos e inflamação das articulações, com perda da função) (Osteoarthritis Research Society International-OARSI; European League Against Rheumatism-EULAR).

1.2.1. Epidemiologia

De acordo com a Sociedade Brasileira de Reumatologia, “a osteoartrite é uma das doenças mais frequentes do conjunto de doenças agrupadas sob designação de reumatismo, representando cerca de 30 a 40% das consultas ambulatoriais de Reumatologia”

Segundo Jonhson & Hunter (2014), a OA afeta aproximadamente 15% da população mundial. Entre os homens, o risco é de 40% e, entre as mulheres, há um aumento desse quantitativo (47%). Esse risco pode aumentar ainda por fatores, como a obesidade e a sobrecarga articular crônica (trabalho). No Brasil, sua incidência é maior em mulheres, aumentando com a idade, sendo menos comum antes dos 40 anos e mais frequente após os 60 anos (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2017).

Sua importância pode ser demonstrada pelos dados observados pela previdência social brasileira, conforme a seguir: - ela é a doença responsável por 7,5% de todos os afastamentos do trabalho; - ela representa a segunda enfermidade entre as que justificam

o auxílio-inicial; - ela é tida como a segunda doença responsável pela prorrogação do auxílio-doença; - ela é considerada como a quarta enfermidade responsável pela determinação da aposentadoria (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2017).

1.2.2. Fatores de risco

A OA é muito comum em pessoas idosas, decorrente do uso e desgaste da articulação, embora possa acometer jovens após lesões articulares (STIEBEL et al., 2014). Acreditava-se tratar de uma doença progressiva de evolução lenta, sem perspectiva de tratamento, tida por muitos como um processo natural do envelhecimento. Entretanto, atualmente, sabe-se que fatores, como idade, sexo, genética, raça, etnia e dieta, podem influenciar o seu desencadeamento ou agravá-la, (JOHNSON & HUNTER, 2014, PALAZZO et al., 2016). Dessa forma, a OA passou a ser vista como uma enfermidade passível de modificação, tanto em relação ao tratamento quanto ao prognóstico (MCALINDON et al., 2014).

1.2.3. Envelhecimento

O envelhecimento é outro importante fator de risco para o desenvolvimento da OA, haja vista que o envelhecimento envolve: instabilidade genômica, desgaste de telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, desregulação na detecção de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão das células-tronco, alteração da comunicação intercelular, fenótipos secretores relacionados à senescência, baixa reatividade dos condrócitos aos fatores de crescimento, estresse oxidativo, e acumulação de produtos finais de glicação avançada (AGEs)(GREENE & LOESER, 2015).

Nesse contexto, estudos revelaram um novo estado associado ao envelhecimento, denominado de “inflamm-aging”. A criação desse termo descreve o estado pró-inflamatório que ocorre com o aumento da idade (XIA et al., 2016).

“Inflamm-aging” foi originalmente proposto como forma de representar o acúmulo, ao longo do tempo, da "carga antigênica" e dos efeitos combinados de vários estressores sobre o sistema imunológico, resultando em imunossenescência (GREENE & LOESER, 2015, XIA et al., 2016). Nesse novo conceito, o macrófago passou a desempenhar um papel central como mediador pró-inflamatório.

Estudo subsequente vinculou a inflamação às alterações endócrinas, metabólicas e nutricionais providas com o processo de envelhecimento. De acordo com os autores, tais alterações incluíam o aumento no acúmulo de gordura, considerada fonte de mediadores pró-inflamatórios, e níveis crescentes de espécies reativas de oxigênio, responsáveis por mudanças metabólicas, bem como aumento da atividade de mediadores inflamatórios e mudanças nos níveis de micro-RNA específicos, envolvidos na regulação de NF-kB (GREENE & LOESER, 2015).

1.2.4. Obesidade

Estudos mostram que pessoas com maior sobrepeso apresentam maior incidência de OA, especialmente edema nas mãos e de joelhos, não interferindo no quadril (LOHMANDER et al., 2009; JOHNSON & HUNTER, 2014). Além desse achado, a obesidade também tem sido associada à progressão mais rápida da lesão, com diminuição dos sintomas da OA pela perda de peso (JOHNSON & HUNTER, 2014, KULKARNI et al., 2016).

1.2.5. Exercício repetitivo e de alto impacto

A prática de exercícios só se relaciona ao desenvolvimento dessa patologia quando associada a eventos traumáticos. Esse fato é importante para desmistificar a ideia de associação entre exercício repetitivo e o desenvolvimento de OA. Nesse contexto, sabe-se que a prática de exercício associada à terapia medicamentosa é fundamental para a melhoria da qualidade de vida do paciente com OA, haja vista que os exercícios promovem fortalecimento da musculatura e dos elementos articulares. Ainda, essa prática, além de retardar o aparecimento de comorbidades, é capaz de reduzir os sintomas da OA (FRANSEN et al., 2015, FRANSEN et al., 2014, OSTERAS et al., 2017, CALLAHAN & AMBROSE, 2015). Entretanto, existem várias divergências quanto ao tempo e o tipo de exercício adotado no curso do tratamento da OA.

1.2.6. Sexo

Homens e mulheres apresentam respostas imunes adaptativas e inatas distintas. Nesse contexto, algumas diferenças são estabelecidas ao longo da vida, enquanto outras só são evidentes após a puberdade e antes da senescência reprodutiva, sugerindo que diferenças hormonais e genéticas estão envolvidas (KLEIN & FLANAGAN, 2016). Além dos fatores intrínsecos, os fatores extrínsecos, também estão envolvidos nessa diferenciação. Por exemplo: as primeiras exposições ambientais influenciam no desenvolvimento da microbiota e já é sabido que depende do sexo, uma vez que os meninos estão mais expostos ao ambiente do que as meninas. Finalmente, essas diferenças repercutem no desencadeamento das doenças autoimunes, infecciosas e malignas (KLEIN & FLANAGAN, 2016).

No âmbito das doenças auto-imunes, mais especificamente da OA, estudo revelou que as mulheres são mais susceptíveis à OA de mão, pé e joelho do que os

homens. Porém, eles são mais propensos a OA cervical (NELSON et al., 2013). Corroborando com esse estudo, um segundo estudo feito com usuários do serviço de saúde dos Estados Unidos revelou que as taxas de OA de ombro e coluna cervical eram maior entre os homens do que entre as mulheres (WILLIAMS et al., 2016). Outro encontrou que os níveis mais baixos de hormônios sexuais estavam associados ao aumento de OA de joelho nas mulheres (JIN et al., 2017).

1.2.7. Lesão

Lesões de ligamento, cartilagem ou menisco também são fatores de risco para o desenvolvimento de OA em adultos jovens (STIEBEL et al., 2016, ENGLUND, 2010). A idade do paciente, histórico de lesão articular na juventude e o tempo de lesão podem contribuir para o desenvolvimento de OA. Ainda, os pacientes com lesão articular podem desenvolver OA dez anos mais cedo do que os pacientes que não apresentam sinais de lesão articular (PUNZI et al., 2016).

Nesse contexto, após a lesão traumática, ocorre a necrose de condrócitos, ruptura da rede de colágeno, edema na cartilagem, liberação de GAGs e hemartose (acúmulo de sangue no espaço articular). Em seguida, pode ainda ser observada a apoptose, infiltração celular, liberação dos mediadores inflamatórios, ativação de enzimas que degradam a cartilagem e a deficiência de moléculas envolvidas na manutenção das características viscoelástica articulares. Esse processo pode ser auto-resolutivo, mas poderá evoluir para um processo crônico com a destruição da superfície articular e o desenvolvimento dos sintomas característicos da OA, tais como: estreitamento do espaço articular, derrame, dor, redução da espessura da cartilagem, edema e disfunção articular (GOLDRING & OTERO, 2011; PUNZI et al., 2016).

1.2.8. Inflamação

O processo inflamatório ocorre como resposta do tecido à injúria celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, envolvendo componentes vasculares e celulares, bem como uma variedade de substâncias solúveis. Esse processo se manifesta pelo rubor, calor, edema, dor e incapacidade funcional frente a agentes nocivos, como: - físico (queimadura, radiação e trauma); - biológico (microrganismo e reações imunológicas); - químico (substância cáustica). Esse processo envolve uma complexa cascata de eventos, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento do influxo celular, produção de mediadores inflamatórios, alterações nos parâmetros hemodinâmicos e permeabilidade vascular (UGUCCIONI et al., 2017).

Nesse contexto, por muito tempo, a OA não foi considerada uma doença inflamatória. Entretanto, Ehrlich, em seu estudo de coorte com mulheres em menopausa que apresentavam OA deformante e inflamatória, observou que algumas desenvolveram sinais característicos de artrite reumatóide (KLOPPENBURG & KWOK, 2011). Esse achado não foi considerado pela comunidade científica, haja vista que o componente inflamatório não foi tão pronunciado como nas outras artrites consideradas inflamatórias, como artrite reumatóide e artrite idiopática juvenil.

Mas nas últimas décadas, vários estudos experimentais e clínicos têm investigado a associação entre a fisiopatologia da OA e o processo inflamatório. Além desse avanço, foi atribuída à doença um comprometimento holístico da articulação.

De fato, sabe-se atualmente que a inflamação sinovial é um componente importante da OA, visto que os fibroblastos sinoviais são fonte importante de citocinas

pró-inflamatórias, espécies reativas e ativação de enzimas envolvidas na degradação da cartilagem e cronificação da doença (RAHMATI et al., 2016).

Além da participação de fibroblastos, estudos mostram o envolvimento de condrócitos (RAHMATI et al., 2016) e de células ósseas e meniscais na fisiopatologia da OA (FUNCK-BRENTANO et al., 2015; ENGLUND 2012). Ainda exames histológicos da sinóvia têm sugerido a participação de macrófagos e linfócitos T e B na OA, por meio da infiltração do tecido sinovial e do espaço articular, como macrófagos, linfócitos T e B (RAHMATI et al., 2016).

Essa diversidade de células tem subsidiado diversos estudos investigando a participação de diferentes mediadores químicos, incluindo citocinas e enzimas na OA (IL-1 β , 4, 6, 8, 10, 11, 13, 15 e 17, NF- κ B, TNF- α , antagonista do receptor IL-1(IL-1Ra), metaloproteinases de matrix (MMP) 1, 3, 8 e 13, proteases, óxido nítrico (NO), eicosanoides e prostanoides) (WOJDASIEWICZ et al., 2014; KAPOOR et al., 2011, MABEY & HONSAWEK, 2015).

Apesar da grande diversidade de mediadores, apenas alguns são relevantes em modelos experimentais de OA, assim como um número ainda menor apresenta importância e pode ser observado na prática clínica, como IL-1 β e 6 e TNF – α (MABEY & HONSAWEK, 2015). Dessa forma, a grande maioria não resiste aos estudos translacionais.

Com base nessa participação, estudos sugerem a atuação de citocinas, como IL-1 β e IL-6 e TNF – α , na destruição da cartilagem acometida pela OA (WOJDASIEWICZ et al., 2014; KAPOOR et al., 2011, MABEY & HONSAWEK, 2015).

IL-1 β é uma citocina central no mecanismo da OA, haja vista que ela é capaz de induzir a inflamação e o catabolismo no ambiente articular. Ela é sintetizada na forma de pró-IL-1 β e, após clivagem por enzimas, como caspase-1, a citocina produzida é transportada para o espaço extracelular. Sua produção e liberação são realizadas por condrócitos, osteoblastos, fibroblastos, células mononucleares e células do menisco (KAPOOR et al., 2011).

Quanto a sua função, a presença de IL-1 β causa a inibição da expressão de colágeno tipo II e agrecano, duas moléculas fundamentais na constituição da matriz extracelular (SHAKIBAEI et al., 2005; MABEY & HONSAWEK, 2015). Além disso, ela estimula a liberação de colagenase (via MMP-1), estromelina (via MMP-3) e colagenase-3 (via MMP-13). Por fim, IL-1 β induz a liberação de IL-6 e 8, MCP-1 e CCL5 (KAPOOR et al., 2011).

Em relação à IL-6, já foi demonstrada a sua liberação *per se* no líquido sinovial e no sangue de pacientes com OA (TSUCHIDA et al., 2016, SHIMURA et al., 2015) e sua ação combinada com IL-1 β na "upregulação" de MMP-1 e MMP-13 (WOJDASIEWICZ et al., 2014). Quanto à relevância da indução de IL-8 por IL-1 β , as informações disponíveis são escassas.

Similar à IL-1 β , o TNF- α é uma citocina central no processo inflamatório, uma vez que ela age em sinergismo com IL-1 β na inflamação e no catabolismo que ocorrem na OA (MABEY & HONSAWEK, 2015). Sua produção é mediada pelos mesmos tipos celulares que produzem IL-1 β (WOJDASIEWICZ et al., 2014; KAPOOR et al., 2011). Entre os efeitos atribuídos ao TNF- α , a literatura revela que ela provoca supressão da síntese de proteoglicanos, promove a "upregulação" de MMP-1, 3 e 13, e induz a

liberação de IL-6 e 8, MCP-1 e CCL5 (WOJDASIEWICZ et al., 2014; KAPOOR et al., 2011).

Estudos com citocinas consideradas como anti-inflamatórias, IL-4, IL-10 e IL-13, e seus respectivos papéis na OA ainda são escassos (MABEY & HONSAWEK, 2015, WANG et al., 2015). Entretanto, diante do que a literatura apresenta, é possível destacar o papel da IL-10. Essa citocina revela um efeito condroprotetor na OA como consequência da sua capacidade de estimular a síntese de agrecano e colágeno (WOJDASIEWICZ et al., 2014). Além desses efeitos, IL-10 é capaz de reduzir a liberação de TNF- α , IL-1 β e metaloproteinase de matriz e inibir a apoptose.

1.2.9. Dor

Em termos epidemiológicos, 20% da dor crônica mundial está relacionada à OA, quantitativo que aumenta com a idade e a obesidade (International Association for the Study of Pain - IASP).

Durante muitos anos, o mecanismo e o tratamento da dor foram negligenciados. Entretanto, ocorreram avanços no desenvolvimento de analgésicos efetivos e seguros (especialmente em pacientes idosos), na elaboração de questionários de avaliação específicos para dor de OA, no conhecimento dos mecanismos envolvidos e na instituição de terapia de reposição e prevenção de dor pós-operatória. Tal evolução foi particularmente importante se considerado que a dor é a principal manifestação clínica da OA e o principal motivo pelo qual os pacientes procuram assistência médica.

Nesse contexto, vale ressaltar que há uma dificuldade na interpretação do fenômeno doloroso na OA em decorrência da falta de correlação observada entre lesão estrutural e sintomas. Sabe-se que pessoas com alterações radiográficas compatíveis

com OA apresentam maior chance de desenvolver dor do que indivíduos sem esse tipo de alteração. Contudo, nem todos aqueles com alterações radiográficas desenvolvem dor (DAVIS et al., 2002; KIDD, 2006).

A dor pode ser definida como percepção desagradável de uma sensação nociceptiva, envolvendo dois componentes – nocicepção e percepção. A dor perceptiva é uma função modulada por motivos emocionais e condições psicológicas e históricas, enquanto a nocicepção resulta da ativação de determinados neurônios sensitivos primários, que transmitem a informação nociceptiva à medula espinhal e, em seguida, aos níveis supra-espinhais (JULIOS & BASBAUM, 2001).

Em seres humanos, a sensibilização dos nociceptores pode ser definida em duas categorias: hiperalgesia e alodínia. A hiperalgesia é definida como uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo doloroso, enquanto a alodínia é uma dor provocada por um estímulo geralmente não doloroso. Essas características de alterações patológicas das vias de sensação dolorosa não podem ser observadas em modelos experimentais de nocicepção animal. Por esse motivo, o termo hipernocicepção é usado mais adequadamente quando estudos em animais se referem à sensibilização neuronal presente em modelos inflamatórios (VERRI et al., 2006).

Na OA, vários estudos analisaram o limiar de dor e a sensibilidade à dor diante de diferentes estímulos, confirmando a sensibilização central. Assim, a dor na OA é um fenômeno misto em que os mecanismos nociceptivos e neuropáticos estão envolvidos nos níveis local e central (IASP). Ainda, a dor na OA geralmente é vista como uma dor nociceptiva periféricamente mediada, que causa percepções emocionais desagradáveis.

No âmbito dos mecanismos que envolvem a dor na OA, o osso subcondral, membrana sinovial, ligamentos e cápsula articular se destacam por serem ricamente inervados e conterem fibras nervosas que podem ser fonte de estímulos nociceptivos (KIDD et al., 2004).

No entanto, descartar a cartilagem totalmente do mecanismo nociceptivo é errôneo, posto que foi demonstrado que, quando são liberados mediadores inflamatórios intra-articulares, a partir de tecido danificado, esses estimulam a produção de proteases e outras citocinas que degradam a própria cartilagem. Ainda, eles sensibilizam fibras nociceptivas, modulando tanto nociceptores periféricos quanto centrais (HOCHMAN et al., 2011; IYENGAR et al., 2004).

O mecanismo pelo qual esses mediadores desencadeiam o mecanismo de dor ainda não está esclarecido. Entretanto, a literatura tem proposto que, durante a inflamação, produtos químicos como, prostanoides, leucotrienos, NO, bradicinina e citocinas (particularmente TNF- α , IL-1, 6, 8 e 17, histamina e serotonina) são liberados na articulação e aumentam a sensibilidade dos nociceptores, presentes nos tecidos adjacentes à articulação, aos estímulos mecânicos e químicos, aumentando a dor (MILLER et al., 2014). Diante da identificação desses mediadores envolvidos na patofisiologia da dor inflamatória e dor na OA, eles se tornaram os principais alvos da terapia atual.

1.2.10. Tratamentos da OA

O tratamento clínico para OA envolve o uso de medicamentos, terapia não medicamentosa e submissão a procedimento cirúrgico (NEWBERRY et al., 2017). A terapia não medicamentosa é muito ampla, envolvendo a prática da acupuntura, do

ultrassom e de exercícios. Entretanto, seus benefícios se restringem à melhoria na qualidade de vida, não interferindo na evolução da doença (MCALINDON et al., 2014).

Outra importante alternativa é a intervenção cirúrgica, haja vista que nenhuma terapêutica produz os benefícios da prótese articular. Contudo, a cirurgia é um procedimento caro e somente realizado em casos mais graves. Quanto à terapêutica medicamentosa, as drogas Modificadoras da Osteoartrite (DMOA) são capazes de modificar a evolução da doença, sendo alvo da comunidade acadêmica e da indústria farmacêutica, visando à compreensão das vias etiopatogênicas envolvidas na iniciação e progressão da OA.

Vale ressaltar que, para ser reconhecida como uma DMOA, o fármaco deve modular a perda do espaço articular e demonstrar benefícios em desfechos clínicos relevantes, como a dor e o dano estrutural da cartilagem (ABADIE et al., 2004)

Na ausência de fármacos modificadores da doença, o tratamento de pacientes com OA é muitas vezes dirigido a aliviar a dor e restaurar a função, por meio da utilização de outras terapias farmacológicas (MCALINDON et al., 2014). Essas incluem o paracetamol, antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e analgésicos opioides. Entretanto, elas são associadas a efeitos adversos no trato gastrointestinal e cardíaco.

Os AINEs agem especificamente na inflamação associada à OA, por meio da inibição da cicloxigenase (COX). Essas drogas apresentam efeitos secundários indesejáveis potenciais e eficácia variável. Dessa forma, surge a necessidade de novas abordagens farmacológicas para o tratamento da dor na OA ou a co-administração de drogas existentes.

Uma opção alternativa de tratamento aos AINEs inclui a utilização de HA e corticosteroides (MCALINDON et al., 2014). O HA fornece propriedades viscoelásticas e lubrificação adequada para manter a homeostase da articulação. Injeções intra-articulares do HA inibem a degradação da cartilagem, induzem a síntese da matriz e reduzem os sintomas da dor (MACHADO et al., 2017). A administração de corticosteroides, por um curto período de tempo, possibilita a redução da dor (MCALINDON et al., 2014)

Os CSs e glicosamina também são utilizados para alívio da dor. Porém, a analgesia produzida por eles é atribuída particularmente a possíveis propriedades modificadoras da doença e não ao efeito analgésico direto desses compostos (PROVENZA et al., 2015; MCALINDON et al., 2014). Corroborando com essa afirmação, estudo recente com CS e glicosamina mostrou uma redução da dor por essas drogas similar ao placebo (ROMAN-BLAS et al., 2017). Entretanto, estudo em modelo experimental de OA revelou uma redução da hipernocicepção e dano estrutural pela combinação de sulfato de glicosamina e CS em animais (SILVA et al., 2009). Sendo assim, os benefícios obtidos com esses GAGs têm sido questionado devido à grande variabilidade dos resultados.

Em 2010, a “Food and Drug Administration” (FDA) aprovou o uso de duloxetina para dor músculo esquelética crônica, incluindo a dor na OA. Estudo posterior demonstrou que a administração de duloxetina por até 13 semanas reduziu a dor e melhorou a função articular, com baixo índice de eventos adversos (WANG et al., 2015).

A identificação da participação de citocinas na OA e os benefícios obtidos com o uso de imunobiológicos no tratamento das doenças reumáticas contribuíram para os

estudos clínicos com imunobiológicos na terapia da OA. As principais citocinas alvo são IL-1 e TNF- α . Entretanto, ao contrário do que aconteceu com as outras doenças reumáticas, os benefícios advindos do uso do anti-TNF- α (Adalimumabe, infliximabe e etanercepte) e do anti-IL-1 (anakinra) foram pequenos ou quase insignificantes na modulação da OA (DIMITROULAS et al., 2017). Ainda, o risco de infecção e o aparecimento de eventos adversos não compensam os baixos benefícios provenientes dessa terapia.

1.3. Modelos experimentais de OA

Devido à grande dificuldade no tratamento e compreensão da fisiopatologia da OA em seres humanos, muitos modelos têm sido utilizados para o estudo dessa patologia. Esses podem ser classificados em espontâneos, geneticamente modificados e induzidos químico, enzimático ou cirurgicamente (FANG & BEIER, 2014, KUYINU et al., 2016).

Apesar da diversidade, não existe um modelo ideal capaz de mimetizar fidedignamente os fenômenos que ocorrem na OA, justificando o fato de muitos estudos experimentais não terem tão bons resultados quando reproduzidos em humanos (McCOY, 2015). Entretanto, esses modelos têm desempenhado papel fundamental na compreensão dos eventos iniciais na OA.

Especificamente, os modelos animais de OA induzidos de forma química, enzimática ou cirúrgica incluem: - ovariectomia - modelo descrito recentemente em que a indução ocorre pela deficiência de estrógeno. Caracteriza-se pela presença de erosões leves na cartilagem articular do joelho, após 9 semanas do ato cirúrgico. Destaca-se por ser um importante instrumento no esclarecimento do papel do tecido ósseo no

desenvolvimento da OA; - injeção de iodoacetato - modelo utilizado para validação da dor; - ranhura articular - modelo em que a OA é induzida por defeitos da cartilagem; - indução de colagenase - modelo em que há formação de osteófitos por macrófagos sinoviais; - impacto transarticular - modelo de trauma em que a OA é induzida por um defeito ósseo (AMEYE & YOUNG, 2006; ANDERST et al., 2005, KUYINU et al., 2016).

Quanto aos modelos animais que desenvolvem OA espontaneamente, eles são provavelmente os que melhor expressam a evolução lenta da doença. Contudo, há uma exigência de um tempo maior de observação, além de apresentar uma progressão variável, dificultando o uso para comparação de tratamentos. Em relação aos geneticamente modificados, eles são muito utilizados, já que alguns permitem avaliar o papel de genes e moléculas específicas na fisiopatologia da doença (VERONESI et al., 2016, KUYINI et al., 2016).

Em modelos de OA induzidos quimicamente, o dano articular se desenvolve de forma mais rápida, previsível e com menor custo. Esses modelos desempenham um papel fundamental na compreensão dos eventos iniciais da OA, porém são mais compatíveis com a OA secundária, além de não apresentarem nenhuma ou uma reduzida relevância clínica (FANG & BEIER, 2014).

Atualmente, inúmeros modelos murinos cirúrgicos de OA são estudados, incluindo a desestabilização do menisco medial (DMM), transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) e remoção (meniscectomia) do menisco medial com ou sem transecção de ligamentos (KUYINI et al., 2016). Quanto a esses modelos, sabe-se que a instabilidade mecânica induzida cirurgicamente fazem-nos os mais utilizados por reproduzirem experimentalmente a OA pós-traumática em seres humanos e serem

altamente reprodutivos. Por outro lado, eles possuem progressão rápida da lesão e exigem grande habilidade cirúrgica do pesquisador.

Nesse contexto, vale ressaltar que os modelos cirúrgicos se concentram em dois alvos específicos para gerarem a instabilidade articular, a saber: ligamentos e/ou meniscos. Essa instabilidade leva ao desenvolvimento das lesões na cartilagem, remodelação óssea e dor. Dentre os modelos, a TLCA e a lesão ou remoção do menisco são os mais utilizados (KUYINI et al., 2016, FANG & BEIER, 2014).

Em relação ao modelo de TLCA, esse apresenta alterações compatíveis com OA humana, como edema, perda de condrócitos e fibrilação da cartilagem. Além das alterações da cartilagem, esse modelo apresenta remodelação óssea caracterizada pela perda inicial do osso subcondral, após 2 semanas da cirurgia, e posterior aumento do volume (HAYAMI et al., 2004; HAYAMI et al., 2006). Dor e alterações bioquímicas da cartilagem são também observadas (CASTRO et al., 2006; SILVA et al., 2009).

No que diz respeito à meniscectomia do menisco medial, ela produz uma doença degenerativa articular associada a lesões consistentes em camundongos. Nesse modelo, pequenas alterações degenerativas são observadas 4 semanas após a cirurgia, assim como modificações estruturais progressivas são visualizadas, após 8 e 12 semanas (KNIGHTS et al., 2012). A dor nesse modelo se inicia logo após a indução e se mantém por 49 dias. Entretanto, ela é menos intensa se comparada a dor presente na transecção do menisco. Entretanto, a associação entre meniscectomia e transecção do ligamento cruzado anterior acelera e potencializa o dano à cartilagem (HAYAMI et al., 2006, de LEITE et al., 2014)

No que se refere à DMM, sua indução não se restringe a uma espécie, mas compreende várias espécies, como ratos, camundongos e coelhos. Histologicamente, o início da lesão em ratos é definido pela fibrilação e perda de proteoglicanos e, em estágios mais avançados, ocorre exposição do osso subcondral e formação de osteófitos. Alterações no osso subcondral podem ser observadas cerca de 7 dias após a cirurgia, prosseguindo até o final do estudo.

As semelhanças histológicas entre o modelo de DMM e a condição humana sugerem que ele pode ser utilizado na identificação de novas abordagens destinadas a diminuir os sinais e sintomas associados à OA, bem como identificar possíveis alvos que alterem os eventos associados à degradação da cartilagem e osso subcondral (BOVE, 2006, CULLEY et al., 2015).

Nesse modelo, também é possível observar dor, que se inicia logo após a indução e se mantém por 49 dias. Essa dor é mediada pela participação de óxido nítrico, opioides e prostanoídes (de LEITE et al., 2014). Além da participação desses mediadores, estudos ainda não publicados do nosso grupo revelaram o envolvimento de bradicinina e de TNF- α no mecanismo nociceptivo.

Assim, essa pletera de dados obtidos com os modelos cirúrgicos tem contribuído para a sua adoção na grande maioria dos estudos em OA.

2. JUSTIFICATIVA

Em humanos, a inexistência de métodos objetivos e confiáveis para avaliar a evolução da OA limita o seu estudo clínico. As dificuldades incluem indisponibilidade do tecido para análise histopatológica, em particular nas fases iniciais da doença, ausência de marcadores biológicos confiáveis e padronização inconclusa em métodos de imagem. Assim, modelos animais são amplamente utilizados na tentativa de se compreender os aspectos fisiopatológicos da doença e avaliar novos fármacos e terapias de forma pré-clínica.

Diante da ausência de biomarcadores para avaliarmos a lesão na cartilagem em OA, o nosso grupo adaptou e correlacionou o método de quantificação de GAGs com a lesão na cartilagem, de maneira que o aumento da quantidade de GAG e da massa molar estão associados com o maior dano na cartilagem, logo um biomarcador para o estudo da lesão da cartilagem em modelos animais. Seguindo nas pesquisas, demonstramos que tal comportamento também ocorria em pacientes com OA, ou seja, os pacientes com OA tinham maior quantidade de GAG e também aumento na massa molar, quando comparado aos pacientes sem diagnóstico da doença, portanto confirmando os dados obtidos em modelo animal (NUNES, 2013). Entretanto, embora os dados obtidos em pacientes reproduzissem aqueles obtidos nos animais, a técnica utilizada foi susceptível à crítica, uma vez que a avaliação da massa molar por SDS-page é limitada. Portanto, exigiu-se a adoção de técnicas mais fidedigna que pudessem refletir a realidade das massas molares dos GAGs. Para tal finalidade, nas análises das modificações na estrutura foram utilizados cromatografia líquida por exclusão de tamanho (Determinação da massa molar), análise elementar (Quantificação dos átomos que compõem a molécula) e potencial zeta (Determinação das cargas elétricas).

Com o conhecimento prévio de que as alterações moleculares repercutiriam com modificações no papel biológico dos GAGs, uma vez que estudos demonstraram que alterações na estrutura dos GAGs podem torná-los pró-inflamatório (RAYAHIN et al., 2015), o estudo investigou o potencial inflamatório dos GAGs alterados quando administrados na junta, avaliando os seguintes aspectos da inflamação: migração celular aguda e crônica, dor, citocinas e sinovite in vivo e citocinas in vitro.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar a estrutura dos GAGs presentes na cartilagem articular de pacientes com e sem OA, bem como estudar o seu potencial inflamatório em animais.

3.2. Objetivos específicos

-Determinar a massa molecular, elementar e o potencial zeta de GAGs obtidos de cartilagem humana com e sem OA.

-Avaliar o efeito da administração intra-articular desses GAGs em camundongos naive sobre a migração celular aguda, a dor e a liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , 6 e 17, CXCL-1 e IFN- γ) e anti-inflamatórios (IL-5 e 10) locais;

-Avaliar o efeito dos GAGs sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1 β , 6 e 17, CXCL-1 e IFN- γ) a partir de fibroblastos.;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta, extração e análise química de GAGs da cartilagem articular humana

4.1.1. Coleta do material biológico humano

Foram estudados 30 pacientes com indicação de artroplastia total de quadril ou ombro, recrutados no ambulatório do serviço de ortopedia e traumatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e Hospital Geral de Fortaleza (HGF), no período de março de 2009 a março de 2013.

Com relação aos aspectos demográficos e clínicos dos pacientes envolvidos no estudo. Vinte e cinco pacientes foram incluídos. Sendo 14 do sexo feminino e 13 do sexo masculino. A média de idade foi semelhante entre os grupos, respectivamente de 67.06 (± 5.113) para pacientes com fratura e 67.00 (± 4.603) anos com OA. Também houve um predomínio das amostras de quadril em ambos os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Dados demográficos e clínicos

Dados	Categoria	Fratura	OA
		Média	Média
Idade		67.06 \pm 5.113	67.00 \pm 4.603
Gênero	Feminino	8	6
	Masculino	7	4
Articulação	Quadril	8	7
	Ombro	7	3

Os critérios de inclusão foram:

1. Indicação de artroplastia do quadril ou ombro por osteoartrite primária ou fratura;
2. Idade entre 20 e 80 anos;
3. IMC menor que 35 kg/m²;

4. Ter assinado o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Formulado obedecendo às recomendações da resolução nº196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde

Os critérios de exclusão foram:

1. Desistência do paciente em qualquer momento do estudo.
2. Presença de qualquer doença sistêmica descompensada ou que a impedisse da indicação cirúrgica.
3. Óbito do pacientes.

Foram observados os princípios éticos da pesquisa científica, que expressa preocupação com a dimensão ética, assegurando o caráter confidencial e ausência de prejuízo, físico, financeiro ou emocional para o pesquisado e todas as garantias ao participante, preconizadas pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP) (BRASIL, 2013).

Essa pesquisa minimizou os danos aos participantes e evitou os riscos previsíveis, no âmbito físico, moral, intelectual, social, psíquico, cultural ou espiritual, a curto e longo prazo, cumprindo a Resolução 510/16 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Todos os participantes receberam o TCLE, no qual todas as informações foram asseguradas a eles. Foram esclarecidos os seus direitos e dúvidas, e, após terem aceitado participar da pesquisa, assinaram o referido documento, em duas vias. Uma delas foi entregue ao participante. Esse teve a liberdade de desistir do estudo a qualquer momento.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC, com número do parecer 090.12.08. Foram garantidas autonomia dos sujeitos e não

maleficência e beneficência da pesquisa, preconizadas na Resolução 510/16 do Conselho Nacional de Saúde.

4.1.2. Extração de GAGs da cartilagem articular humana

A cartilagem foi removida cirurgicamente das articulações, devidamente pesada (massa inicial - m1), após secagem *overnight* a 80°C, e homogeneizada em acetona (Figura 4). Essa última teve como finalidade retirar os lipídios presentes na matriz. Em seguida, uma suspensão da enzima PROLAV 750R, em tampão Tris-HCl/NaCl (4 mg enzima/mL tampão), foi adicionada ao pó cetônico e o material foi digerido em banho-maria (56°C), por 48 horas. A mistura reacional obtida foi retirada do banho e sua concentração de NaCl foi corrigida com NaCl 4M. Essa etapa teve como objetivo promover a sedimentação das substâncias que possuíam baixa solubilidade.

Logo após, o meio foi transferido para o banho-maria (37°C), permanecendo por 30 minutos. O sobrenadante (SB1) foi coletado e o precipitado (P1) foi submetido à lavagem com água destilada e colocado na estufa *overnight* a 80°C para evaporação da água. Após a evaporação, o material foi pesado para a obtenção da massa final (m2). Ácido tricloroacético (10% w/v), usado para a precipitação de macromoléculas, como proteína, DNA e RNA, foi adicionado ao sobrenadante (SB1), agitado a 4°C, por 15 minutos, e centrifugado (10.000 g, 15 min, 25°C). O sobrenadante (SB2) foi coletado e descartado o precipitado (P2).

Em seguida, foi adicionado etanol para precipitar os GAGs do SB2 e a solução foi mantida *overnight* a 4°C, sendo posteriormente centrifugada (10.000 g, 15 min, 15°C). O sobrenadante (SB3) foi descartado. O precipitado (P3), contendo os GAGs, foi colocado em fluxo para total evaporação do etanol. Após esse processo, o P3 foi dissolvido em água destilada (NUNES 2013)

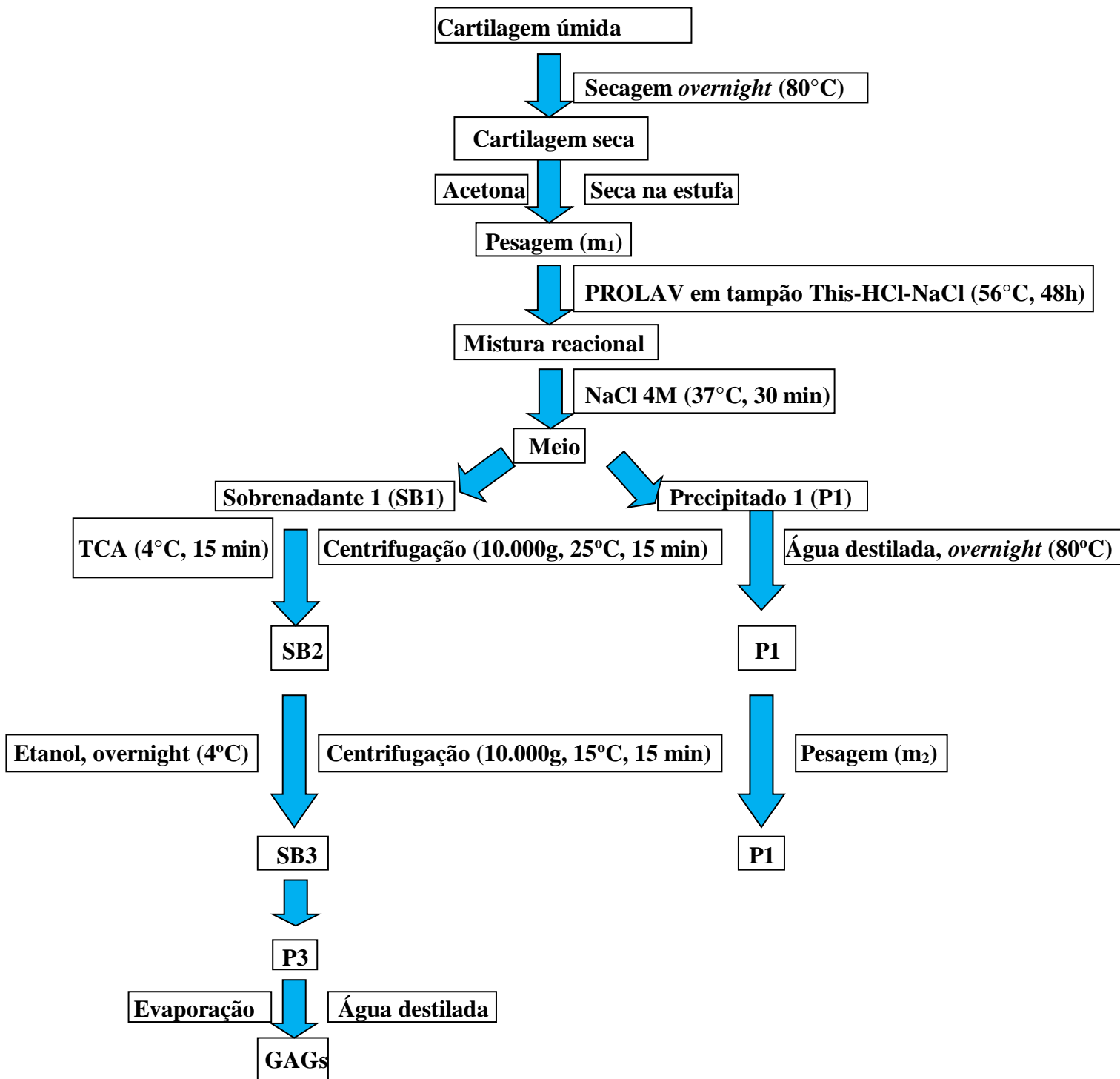


Figura 4- Esquema do protocolo de extração de glicosaminoglicanos da cartilagem articular.

4.1.3. Identificação de GAGs da cartilagem articular humana por eletroforese em gel de agarose

Um volume de 5 μL de padrões de CS e sulfato de heparan (HS), na concentração de 2 μg GAG/ μL de cresol 0,5% diluído em sacarose 50%, e de amostras de GAGs dos pacientes foram aplicadas no gel de agarose (0,6%), após o que foi iniciada a eletroforese (100V, 1h) em tampão de diamino-propano (pH = 9).

Em seguida, o gel foi submergido em solução de brometo de cetil-trimetilamônio (CTV) (0,1%), por 24h. Após fixação, o gel foi devidamente secado e corado com azul de toluidina (0,1%), por 15min. Ao final do processo, o excesso de corante foi removido pela sua submersão em solução descorante. Logo após, as bandas eletroforéticas das amostras foram comparadas visualmente às dos padrões (NUNES 2013).

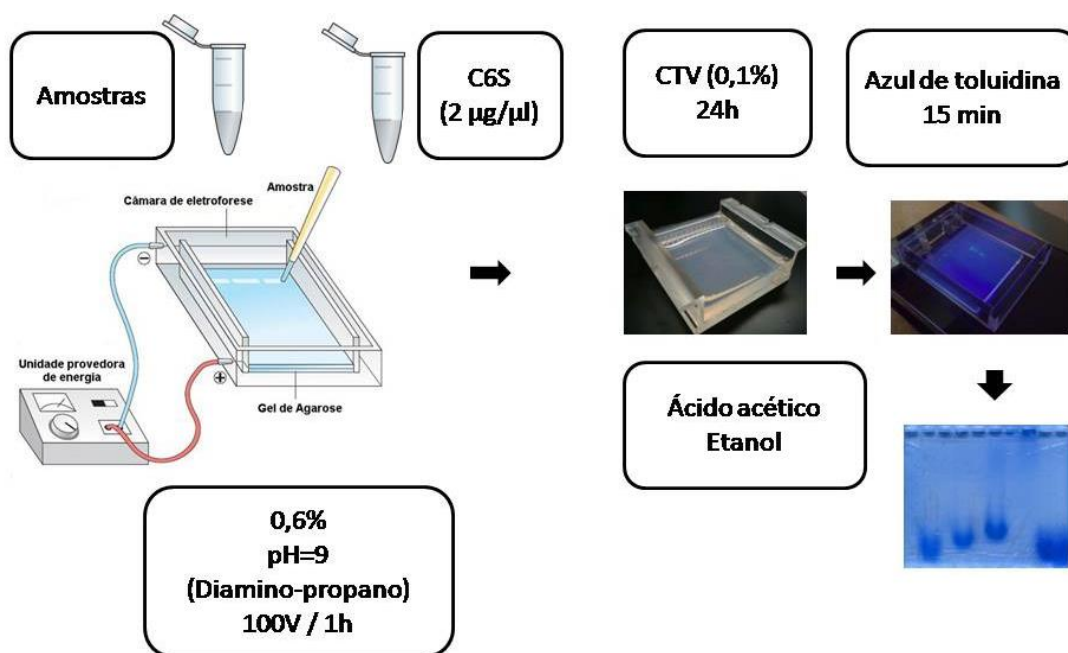
4.1.4. Quantificação de GAGs da cartilagem articular humana em gel de agarose

O CS6, nas respectivas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 μg em 5 μL , foi utilizado para a obtenção da equação da reta e, conseqüente, quantificação dos GAGs. As amostras de GAGs dos pacientes foram obtidas de uma solução contendo 8 μL da amostra e 2 μL cresol 0,5% (diluído em sacarose 50%). Dessa solução, 5 μL foram aplicados em gel de agarose (0,6%) e, em seguida, foi iniciada a eletroforese (100V, 1h) em tampão de diamino-propano (pH = 9).

Em seguida, o gel foi submergido em solução de CTV (0,1%), por 24h. Após fixação, o gel foi devidamente secado e corado com azul de toluidina (0,1%), por 15min. Ao final do processo, o excesso de corante foi removido pela sua submersão em solução descorante de ácido acético (1% v/v) e etanol (50% v/v). Logo após, o gel foi escaneado e as bandas eletroforéticas do padrão e das amostras foram analisadas, por

meio, do software Image J (versão 1.37), disponibilizado gratuitamente pelo U.S. National Institutes of Health (RASBAND, 2006), para a determinação da intensidade luminosa e cálculo da densidade ótica (D.O) relativa (Figura 5).

Para as amostras diluídas, a concentração obtida pela D.O. foi multiplicada pelo fator de diluição correspondente. Os dados obtidos foram expressos em μg de GAG/mg de cartilagem seca (NUNES 2013).



Fonte:Próprio autor.

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose.

4.1.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida de GAGs da cartilagem articular humana

Procedeu-se à eletroforese em gel de poliacrilamida para avaliação indireta da massa molar dos GAGs extraídos da cartilagem articular femoral. Para tanto, 10 μg de GAGs foram aplicados em gel de poliacrilamida (6% w/v) e submetidos à eletroforese vertical (100 V), em tampão barbital, por 1 h. Os GAGs no gel foram corados por azul

de toluidina, durante 15 min. O excesso de corante foi removido por imersão em ácido acético (1% v/v), por 3 horas. Para proceder à secagem, o gel foi imerso em solução de glicerol (5% v/v), por 30 min, e colocado entre duas folhas úmidas de celofane, sob tensão, por 48 h (Figura 6).

Os filmes obtidos a partir dos géis foram digitalizados e analisados pelo software Image J. Para cada banda do gel de agarose, determinou-se a D.O relativa. Para avaliação da migração dos GAGs em gel de poliacrilamida, determinou-se a mobilidade eletroforética relativa ao condroitin-4-sulfato (C4S), o padrão de menor massa molar ponderal utilizado ($4,55 \times 10^4$ g/mol) (NUNES 2013), conforme representado abaixo:

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

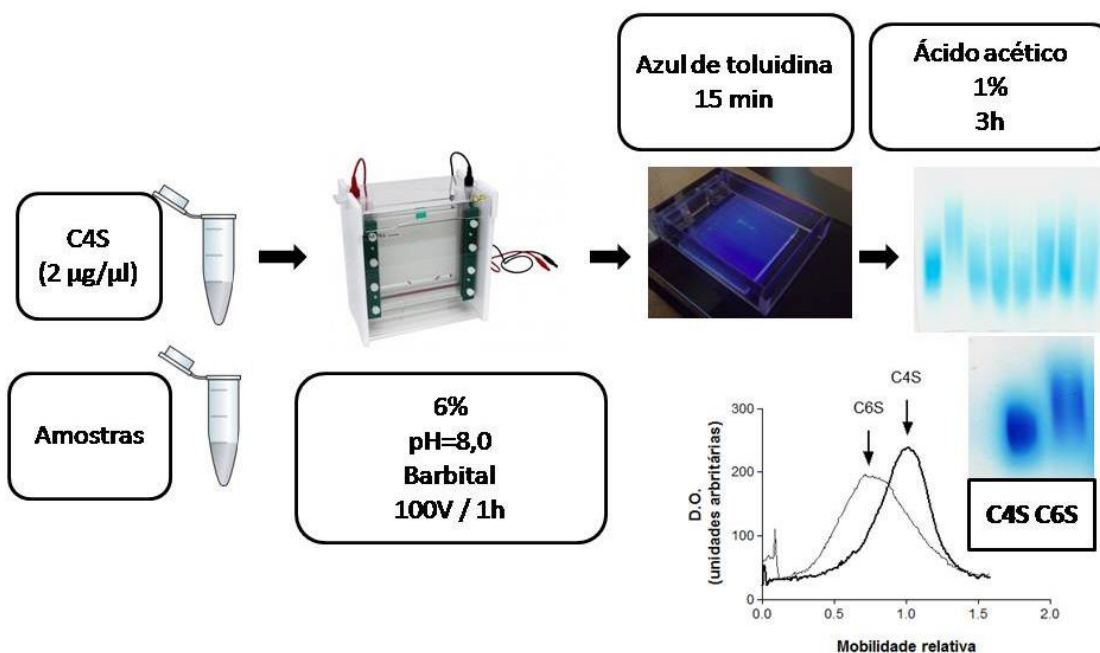


Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida. Fonte:Próprio autor.

4.1.6. Cromatografia de alta eficiência por exclusão de tamanho (HPSEC) de GAGs da cartilagem articular humana

A massa molar dos GAGs da cartilagem articular femoral foi avaliada indiretamente por HPSEC, conhecida como cromatografia de permeação em gel (GPC). A massa molecular e a polidispersão de CS foram determinadas usando frações CS de massa molecular conhecida. Para o processo, 10 µg de GAGs por amostra foram dissolvidos em 50µL de uma solução de NaNO₃ 0,1M e injetados em cromatógrafo Shimadzu LC-14AD, munido de detector para índice de refração RID-6^a (Figura 7).

A amostra foi eluída em solução aquosa de NaNO₃ 0,1M, que percolou, durante 30 min, numa coluna Ultrahydrogel Linear (WatersR), de dimensões 7,5 x 300 mm, sob um fluxo de 0,5 mL/min, em pressão aproximada de 9-10 kgf/cm². A curva padrão para a determinação da massa molar foi construída utilizando-se padrões de poliestireno, com massas molares variando de 10³ a 10⁷g/mol.

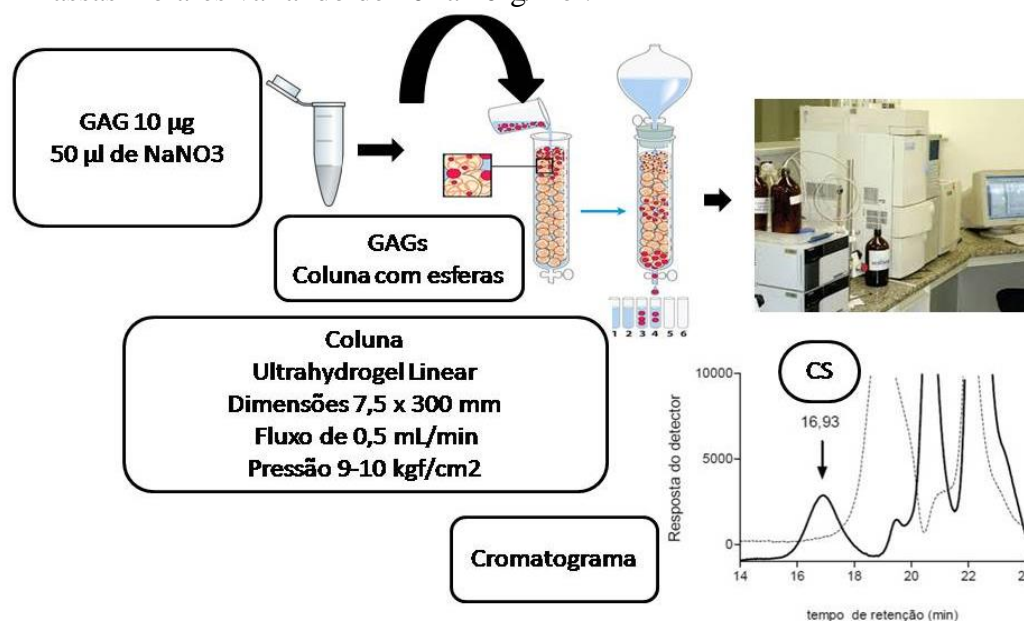


Figura 7– Cromatografia de alta eficiência por exclusão de tamanho (HPSEC) com GAGs.

4.1.7. Análise Elementar de GAGs da cartilagem articular humana

O teor de nitrogênio, carbono, hidrogênio e enxofre nas amostras de GAGs foram avaliadas por análise elementar em um microanalisador CARLO ERBA

EA1108. Nessa técnica, as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector TCD (detector de condutividade térmica).

4.1.8. Potencial zeta ($P\zeta$)

As medidas de potencial zeta foram realizadas em cubeta capilar com 1 mL da dispersão, em equipamento Zeta Sizer Nano ZS Malvern, com laser de $\lambda = 633$ nm e ângulo de detecção de 17° , a 25°C . Todas as amostras tinham a mesma concentração de GAG, $50\ \mu\text{g/ml}$.

4.2. Avaliação do potencial inflamatório de GAGs da cartilagem articular humana

4.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (25-30g) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará - UFC. Os animais foram submetidos à temperatura adequada ($22\text{-}25^\circ\text{C}$), com 12h de ciclo claro/escuro e livre acesso à água e à ração. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com todos os esforços feitos para minimizar o sofrimento dos animais. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEPA da UFC, sob o número 113/07.

4.2.2. Padronização da dose de GAGs administrada de forma intra-articular em camundongos naive

Segundo Bensouyadet al. (1990), a concentração de GAGs no fluido sinovial de seres humanos saudáveis é $56\ \mu\text{g/mL}$. Entretanto, em pacientes com OA, o valor médio é de $96\ \mu\text{g/mL}$. Diante desses achados, resolveu-se nesse estudo adotar a injeção intra-

articular de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GAGs, concentração normalmente observada em pacientes saudáveis (Figura 8).

Dessa forma, foram preparadas soluções mães na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GAGs, oriundos de pacientes submetidos à artroplastia por OA grave ou fratura, sendo injetados 25 μL dessa solução na articulação do camundongo naíve (animal não submetido a qualquer tipo de procedimento invasivo ou não), volume máximo permitido no espaço articular desse animal.

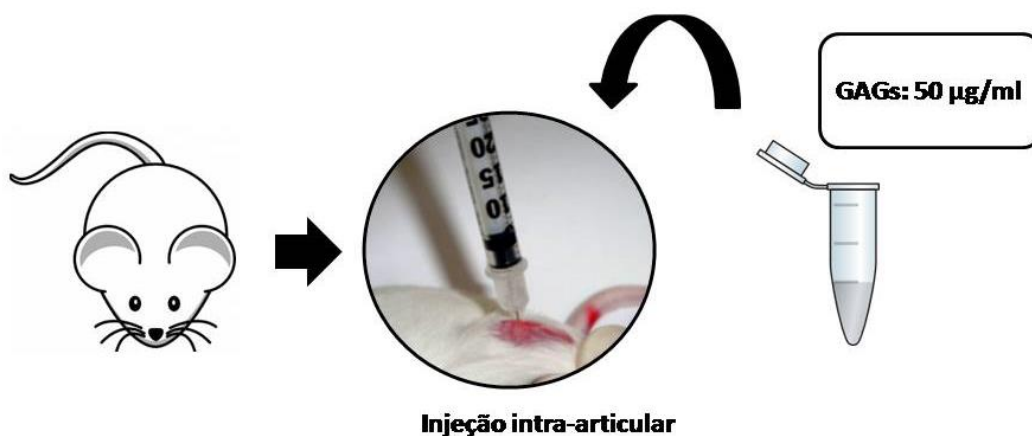


Figura 8 – Injeção intra-articular de GAGs em camundongos naíve. Fonte: Próprio autor.

4.2.3. Análise do influxo celular

Após 6 horas e 7 dias da administração de GAGs no joelho direito, os camundongos ($n = 6$) foram anestesiados, exsanguinados e sacrificados por deslocamento cervical. As cavidades articulares foram lavadas por meio de duas injeções intra-articulares, seguidas de aspiração, de 0,05 mL de salina estéril apirogênica, contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM. A contagem

de células totais no lavado articular foi realizada em câmara de Neubauer. Em seguida, o lavado foi centrifugado (500 g/10 min) e o sobrenadante aliquoteado e conservado a -80°C para análise posterior (PINTO et al., 2013).

4.2.4. Análise da hipernocicepção

A hipernocicepção apresentada pelos camundongos submetidos à injeção intra-articular de GAGs foi avaliada por meio do teste de pressão crescente na pata (vonFrey eletrônico).

Os animais foram colocados em caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura), sobre uma tela de arame, por 30 minutos, para adaptação ambiental. A estimulação foi feita quando os animais estavam adaptados, sem movimentos exploratórios ou defecação e não estando descansando sobre as patas.

A quantificação foi realizada por um transdutor manual, em cuja sonda foi adaptada uma ponta de polipropileno (Electronic Von Frey anesthesiometer, Insight Equipamentos Científicos Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil). Uma força perpendicular e crescente foi aplicada na área central da superfície da pata direita para provocar a flexão da articulação do joelho e retirada da pata. Um espelho abaixo da grade permitia a visão clara desse fenômeno. O aparato eletrônico registrava automaticamente a intensidade da força aplicada quando isso ocorria. O teste foi feito até a obtenção de três medidas consistentes (quando a diferença entre elas fosse menor do que 1g).

O resultado foi expresso como média das três medidas do limiar mecânico, em gramas (g). A análise da hipernocicepção foi realizada na 3^a e 5^a horas após a administração intra-articular de GAGs (PINTO et al., 2013).

4.2.5. Avaliação histopatológica

Após a lavagem da cavidade articular para avaliação da migração celular e citocinas, a membrana sinovial foi removida cirurgicamente e fixada em formol 10% tamponado. Após 24h, a membrana sinovial foi transferida para álcool 70%, permanecendo até sua inclusão em parafina.

Lâminas, contendo cortes histológicos de 5 µm de membrana sinovial, foram desparafinizadas e coradas por hematoxilina - eosina (H&E). Um patologista realizou a avaliação cega das lâminas, por microscopia óptica, seguindo parâmetros semiquantitativos. Esses compreenderam: proliferação sinovial, infiltração de células, fibrose e estágio da doença. Cada critério foi quantificado por meio de escores, os quais variaram de 0 a 3 (0 - ausente; 1 - suave; 2 moderado; 3 - grave) . A pontuação máxima obtida em cada parâmetro foi de 12 (PINTO et al., 2013). Os resultados foram expressos como mediana dos escores obtidos em cada critério avaliado para cada grupo estudado.

4.2.6. Determinação dos níveis de CXCL-1, IFN- γ e IL-1 β , 5, 6, 10 e 17 e TNF- α

Para avaliar os mecanismos envolvidos na participação dos GAGs no processo inflamatório agudo, 6 h, o nível de citocinas foi mensurado na cavidade articular. A determinação dos níveis de CXCL-1, IFN- γ e IL-1 β , 5, 6 e 10 foi realizada nos sobrenadantes articulares, usando um kit de ELISA comercialmente disponível (R&D Systems, São Paulo, SP, Brasil).

Resumidamente, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos policlonais anti-CXCL-1, anti-IFN- γ , anti-IL-1 β , anti-IL-5, anti-IL-6, anti-IL-10 ou anti-IL-17 e incubadas *overnight*, a 4 °C. Após bloqueio das placas com albumina 1%, por 1h, os padrões de citocinas e as amostras foram adicionados, em duplicata, por 2h,

25 °C. Um anticorpo secundário biotilado foi adicionado, seguido por uma incubação, por 1 h, 25 °C. Por último, 100µL de avidinaperoxidase (diluída a 1:5000; DAKO A/S, Dinamarca) foi adicionada a cada poço.

Após 30 min, as placas foram lavadas e o reagente O-fenilenodiamina (OPD - 40 µg / poço) e H₂O₂ foram adicionados. A reação foi interrompida com H₂SO₄ (1M), após o que foi feita a leitura da D.O., a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/ml).

4.2.7. Imunohistoquímica

Lâminas, contendo cortes histológicos de membrana sinovial, foram avaliadas, por imunohistoquímica, quanto à expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Baseada no método de estreptavidina-biotina-peroxidase, as membranas sinoviais foram cortadas em espessura de 3µm, em micrótomo apropriado, e colocadas em lâminas de L-polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em xilol e álcool e imersas em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0). Logo após, foram aquecidas em forno de microondas, por 15 minutos, para a recuperação antigênica.

Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente, durante 20 minutos, foram feitas lavagens com tampão fosfato salino (PBS), intercaladas com o bloqueio pela peroxidase endógena em solução de H₂O₂ a 3%, por 15 minutos. Os cortes foram incubados *overnight*, 4 °C, com o anticorpo primário, diluído a 1:200, em albumina sérica bovina 5% dissolvida em PBS (PBS-BSA).

Após o período de incubação, foi feita nova lavagem, seguida de incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado, diluído a 1:200, em PBS-BSA, por 30

minutos. Depois de nova lavagem, os cortes foram incubados com o complexo Envision™ System-HRP (AEC) (DAKO, Carpinteria, CA, EUA), e a coloração da reação foi obtida por meio do diamino-benzidina tetrahidroclorato (DAKO, Carpinteria, CA, EUA). Essa última foi seguida por contra coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas.

Controles negativos e positivos foram processados simultaneamente, como descritos acima. O anticorpo primário, no entanto, foi substituído por PBS-BSA 5%. A intensidade da coloração foi analisada por microscopia óptica, por meio da contagem do número de células positivas/10 campos tomados aleatoriamente e calculada a média de células por campo. Os resultados foram expressos como média de células positivas por campo (PINTO et al., 2013).

4.3. Estudo *in vitro*

4.3.1. Cultura das células

Foram cultivados fibroblastos isolados por *explantation* da membrana sinovial de camundongos Swiss saudáveis, utilizando o Meio Essencial Mínimo (MEM), contendo antifúngico e antibiótico, enriquecido de 5% de Soro Fetal Bovino (SFB). A membrana sinovial foi incubada a 37°C, em atmosfera úmida (5% CO₂).

A adesão e o crescimento celular foram acompanhados pela observação em microscópio invertido. Não ocorrendo o aparecimento de qualquer efeito citopático ou indícios de contaminação, foi realizada tripsinização

Após quatro passagens subsequentes, foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer para a obtenção da quantidade de células necessárias para a execução do teste.

4.3.2. Ensaio do potencial inflamatório *in vitro*

Resumidamente, alíquotas de 0,1mL de fibroblastos, na concentração de 2×10^5 células/mL de MEM, foram depositadas em microplacas de 96 poços e incubadas por 24h. Logo após, o meio foi substituído por um contendo GAGs, oriundos de pacientes submetidos à artroplastia por OA grave ou fratura, em diluições de 50 µg/mL, em triplicata. Fibroblastos do grupo controle receberam apenas o meio com solução salina. Após 1h de incubação, o meio foi coletado para dosagem das seguintes citocinas: CXCL-1, IFN- γ e IL-1 β , 5, 6, 10 e 17.

Para a quantificação das citocinas, foi utilizada a técnica descrita no item 4.2.6.

4.4.. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão da média (E.P.M.) Para comparações múltiplas entre as médias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste Tukey. Para a análise histopatológica, os resultados foram expressos em mediana, com inclusão do valor mínimo e máximo e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Para os testes aplicados, foi considerado $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Avaliação da massa molar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes por SDS-PAGE e HPSEC

A tabela 3 mostra que a mobilidade relativa do CS de seres humanos com osteoartrite não difere, quando comparada com o grupo fratura ($p=0.4232$). Por ser uma técnica semiquantitativa, nós usamos o GPC, por ser qualitativo e quantitativo. Além disso, é capaz de detectar pequenas diferenças de massa que estão abaixo do limite de detecção do gel de poliacrilamida. O GPC, assim como o gel de poliacrilamida, não revelou diferença na massa molar entre os grupos fratura e OA ($p=0.2774$). A figura 9 representa o perfil cromatográfico de ambas às amostras com e sem OA.

Tabela 3. Mobilidade relativa e massa molar de pico dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.

Dados	Amostra	Média	e.p.m	p
Mobilidade relativa	Fratura	1.06	0.04	
	OA	1.05	0.02	0.4232
Massa molar de pico (10^4 g/mol)	Fratura	6.91	0.80	
	OA	6.17	0.91	0.2774

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m); p (OA vs Fratura).

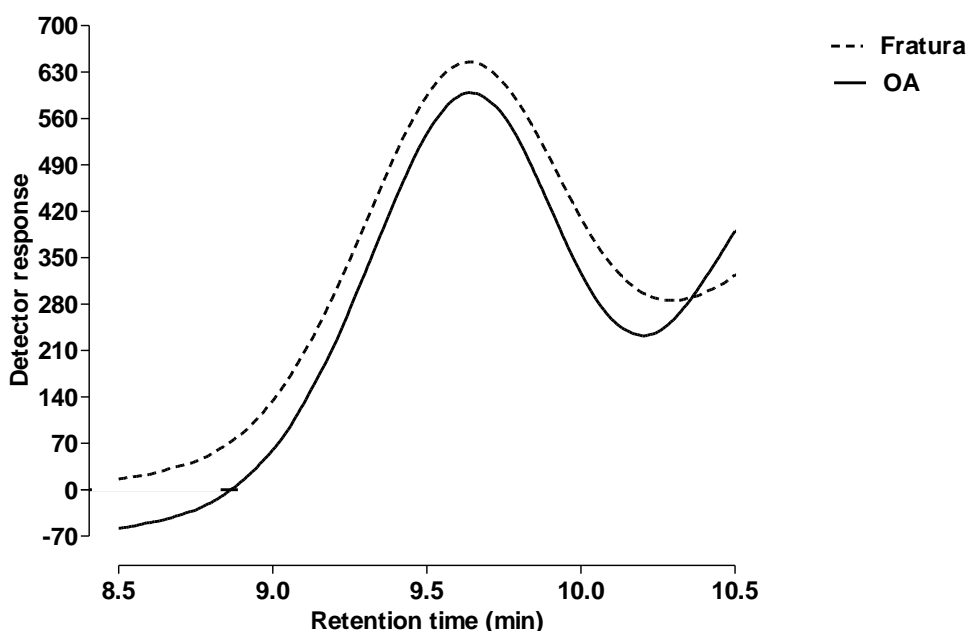


Figura 9. Perfil cromatográfico (HPSEC) de amostras de paciente com e sem OA, respectivamente linha contínua e descontinua. 10 μ g de cada GAG foram injetados no sistema. As linhas contínua e descontinua ilustram as respostas para índice de refração e absorvância, respectivamente.

5.2. Avaliação da mobilidade e da massa molar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa de acordo com o gênero.

A tabela 4 mostra que a mobilidade relativa do CS de seres humanos não é alterada pelo gênero, respectivamente $p=0.4584$ no grupo sem OA e $p=0.3228$ no grupo com OA. Já no GPC, a massa molar dos GAGs é alterada pelo gênero no grupo fratura ($p=0.0273$), haja vista que os pacientes do sexo masculino revelam um aumento na massa molar, quando comparado com o sexo feminino. Entretanto, esse mesmo comportamento não ocorreu no grupo com OA ($p=0.4357$).

Tabela 4. Avaliação da mobilidade e da massa molar dos GAGs de acordo com o gênero.

Dados	Amostra	Gênero	Média	e.p.m	p
Mobilidade relativa	Fratura	Feminino	1.06	0.06	0.4584
		Masculino	1.07	0.06	
	OA	Feminino	1.06	0.02	0.3228
		Masculino	1.08	0.01	
Massa molar (10^4g/mol)	Fratura	Feminino	5.83	1.01	0.0273*
		Masculino	9.06	0.33	
	OA	Feminino	6.79	0.91	0.4357
		Masculino	6.47	2.11	

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m); p (Feminino vs Masculino). * $p<0.05$.

5.3. Análise elementar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes sem ou com OA.

A tabela 5 mostra que a porcentagem de enxofre reduz na OA, quando comparado com o grupo fratura ($p= 0.0023$).

Tabela 5. Análise elementar dos GAGs dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.

Elemento	Amostra	Mediana (%)	Máximo	Mínimo	p
S	Fratura	2.360	2.540	2.070	0.0023*
	OA	1.810	2.120	1.380	

S=enxofre. p (OA vs Fratura). * $p<0.05$.

5.4. Análise elementar dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa de acordo com o gênero.

A tabela 6 mostra que as porcentagens de enxofre não são alteradas pelo gênero no seguinte caso, (S, fratura, (feminino vs masculino) $p=0.8857$). Entretanto, as porcentagens de enxofre são alteradas pelo gênero, nos seguintes casos, (S, OA, (feminino vs masculino) $p=0.0286$)

Tabela 6. Análise elementar dos GAGs de acordo com o gênero.

Elemento	Amostra	Gênero	Mediana (%)	Máximo	Mínimo	p
S	Fratura	Feminino	2.125	2.540	2.070	0.8857
		Masculino	2.410	2.480	1.450	
	OA	Feminino	2.070	2.900	1.870	0.0286*
		Masculino	1.670	1.810	1.380	

S=enxofre. p (Feminino vs Masculino). * $p<0.05$.

5.5. Análise do potencial zeta dos GAGs extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes sem ou com OA.

A tabela 7 mostra uma diferença significativa no potencial zeta dos GAGs na OA, quando comparado com o grupo fratura ($p=0.0417$). Além disso, o valor encontrado no grupo OA está mais próximo da carga O.

Tabela 7. Análise do potencial zeta dos GAGs dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.

	Potential Zeta (mV)	e.p.m	p
Fratura	-27.02	± 1.907	
OA	-20.75	± 2.346	0.0417*

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m); p (OA vs Fratura).

5.6. Avaliação do influxo celular agudo induzido pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em animais naives

A tabela 8 mostra que a migração celular aguda induzida pela administração intra-articular de GAGs provenientes de pacientes com ou sem diagnóstico de OA, induzem aumento significativo do influxo celular, quando comparado ao grupo naive (somente salina administrada), respectivamente $p=0.0044$ e $p=0.0022$. Entretanto, administração intra-articular de GAGs provenientes de pacientes com ou sem diagnóstico não difere entre si com relação ao influxo celular ($p=0.1874$).

Tabela 8. Influxo celular induzido pela administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.

Células	Amostra	Média (Células/mm³)	e.p.m	p
	Naive	78,13	15,78	
	Fratura	584,3	84,37	0.0002*
	OA	468,9	96,53	0.0044*
			OA vs Fratura	0.1874

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m); $p < 0.05^*$ comparado com grupo naive, OA vs fratura, $p=0.1874$.

5.7. Avaliação do influxo celular crônico induzido pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em animais naives

A tabela 9 mostra que não há migração celular crônica induzida pela administração intra-articular de GAGs provenientes de pacientes com ou sem OA (p=0.4871).

Tabela 9. Influxo celular crônico induzido pela administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.

Células	Amostra	Média (Células/mm³)	e.p.m	p
	Naive	37.53	0.033	
	Fratura	32.00	13.42	0.4153
	OA	31.50	7.305	0.3347
			OA vs Fratura	0.4871

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m); $p < 0.05^*$ comparado com grupo naive, OA vs fratura, $p = 0.4871$.

5.8. Avaliação do influxo celular agudo induzido pela administração intra-articular de GAGs de acordo com o gênero.

A tabela 10 mostra que a migração celular aguda induzida pela administração intra-articular de GAGs está aumentada pelo gênero feminino independente do grupo avaliado, respectivamente fratura (feminino vs masculino), $p=0.0456$ e OA, (feminino vs masculino), $p=0.0357$. Os GAG provenientes de mulheres tem um potencial inflamatório significativo, quando comparado com os homens.

Tabela 10. Influxo celular agudo induzido pelos GAGs de acordo com o gênero.

Células	Amostra	Gênero	Média (Células/mm ³)	E.P.M	p
	Fratura	Feminino	748.4	128.8	0.0456*
		Masculino	408.2	80.16	
	OA	Feminino	666.8	123.4	0.0357*
		Masculino	269.4	96.75	

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m). $p < 0.05$ *. Fratura (feminino vs masculino), $p=0.0456$ e OA, (feminino vs masculino), $p=0.0357$.

5.9. Avaliação da hipernociceção aguda induzida pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em animais naives

A tabela 11 mostra que a administração intra-articular de GAGs não induz hipernociceção aguda independente do grupo avaliado, com ou sem OA ($p=0.4783$).

Tabela 11. Influxo celular induzido pela administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.

Hipernociceção	Amostra	Média (g)	E.P.M	p
Limiar mecânico (g)	Naive	6.52	0.65	
	Fracture	7.26	0.78	0.3924
	OA	8.41	0.76	0.3937
			OA vs Fratura	0.4783

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m); $p < 0.05^*$ comparado com grupo naive, OA vs fratura, $p= 0.4783$.

5.10. Avaliação da sinovite aguda induzida pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em animais naives

A análise semiquantitativa, baseada em escores, da histopatologia, mostrou que os GAGs do grupo fratura induzem na fase aguda uma leve sinovite ou quase nenhum no caso de algumas amostras. Todavia, os GAGs dos pacientes do grupo OA são capazes de induzir uma sinovite leve, moderada e intensa. Além disso, os GAGs dos pacientes com OA aumentam significativamente os parâmetros inflamatórios como infiltrado celular e estágio da doença ($p < 0.05$), bem como existe uma tendência de aumento quando os escores totais são avaliados (Tabela 12).

Tabela 12. Avaliação histopatológica aguda da sinovia de animais naives após a administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.

	Proliferação da camada sinovial	Infiltrado	Fibrose	Estágio da doença	Escore totais
Naive	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)
Fratura	1 (0-2)	1 (0-2)	0 (0-1)	1 (0-1)	3 (0-6)
OA	1 (1-3)	2 (2-3)*	1 (0-1)	2 (1-2)*	6.5 (3-8)
p	0.2398	0.05	0.3002	0.05	0.0974

Resultados foram expressos como mediana (máximo – mínimo) dos escores histopatológicos; * $P < 0.05$, OA comparado com grupo fratura.

5.11. Avaliação da liberação de mediadores inflamatórios agudos induzido pela administração intra-articular de GAGs, extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA, em animais naive.

A tabela 13 mostra que a administração intra-articular de GAGs induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-17, TNF- α , INF- γ , CXCL-1, IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10) independente do grupo avaliado, com ou sem OA. A única exceção é IL-5. Além disso, a liberação de IL-17 e IL-1 β estavam elevados significativamente no grupo OA, quando comparados com os grupos fratura, respectivamente $p=0.0403$ e $p=0.0430$. Por outro lado, os níveis de INF- γ e IL-10 estavam reduzidos significativamente no grupo OA, quando comparados com os grupos fratura, respectivamente $p<0.0001$ e $p=0.0489$. Por fim, não houve diferença quando avaliamos IL-6 e CXCL-1, respectivamente $p=0.3266$ e 0.3667 .

Tabela 13 . Os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias após a administração de GAGs provenientes dos pacientes submetidos à artroplastia por fratura ou OA.

Citocinas	Amostra	Média (pg/ml)	E.P.M	D.P.M	p
IL-6 (pg/ml)	Naive	25.39	11.56	23.12	0.3266
	Fratura	818.6	189.2	780.0	
	OA	706.8	133.1	479.8	
IL-10 (pg/ml)	Naive	-	-	-	0.0489*
	Fratura	55.20	6.514	26,06	
	OA	37.41	8.258	29,78	
IL-17 (pg/ml)	Naive	7.740	0.2800	0.396	0.0403*
	Fratura	6.171	1.934	7.735	
	OA	14.24	3.934	16.22	
TNF- α (pg/ml)	Naive	-	-	-	0.2422
	Fratura	13.02	2.367	6.696	
	OA	15.92	2.821	10.17	
INF-Y (pg/ml)	Naive	50.37	1.667	6.875	<0.0001*
	Fratura	132.3	5.370	19.36	
	OA	86.13	5.838	21.05	
CXCL-1 (pg/ml)	Naive	-	-	-	0.3067
	Fratura	42.41	3.867	15.47	
	OA	39.39	4.500	16.84	
IL-5 (pg/ml)	Naive	-	-	-	-
	Fratura	-	-	-	
	OA	-	-	-	
IL-1 (pg/ml)	Naive	16.30	1.694	2.935	0.0430*
	Fratura	99.39	10.69	42.78	
	OA	130.0	13.80	49.75	

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m) e desvio padrão da média (d.p.m); *P < 0.05, OA comparado com grupo fratura. **Limite de detecção:** IL-6 (4-500 pg/ml), IL-10 (32-4000 pg/ml), IL-17 (4-500 pg/ml), TNF- α (8-1000 pg/ml), INF-Y (15-2000 pg/ml), CXCL-1 (15.6-1000 pg/ml), IL-5 (4-500 pg/ml), IL-1 β (8-1000 pg/ml), (-) abaixo do limite de detecção.

5.12. Avaliação aguda da imunexpressão de iNOS na sinóvia de camundongos naive após à administração intra-articular de GAGs extraídos da matriz cartilaginosa dos pacientes com ou sem OA.

Figura 10 representa os animais naive que receberam salina, ela revela a inexistência da expressão de iNOS na membrana sinovial. A figura B representa os animais naive que receberam GAG proveniente do grupo fratura, ela mostrou significativa expressão de iNOS em células sinoviais. A figura C representa os animais naive que receberam GAG proveniente do grupo OA, ela mostrou leve expressão de iNOS em células sinoviais. A figura D revela que a imunexpressão de iNOS na sinovia foi alterada significativamente no grupo fratura, quando comparado com os grupos OA ($p=0.0004$).

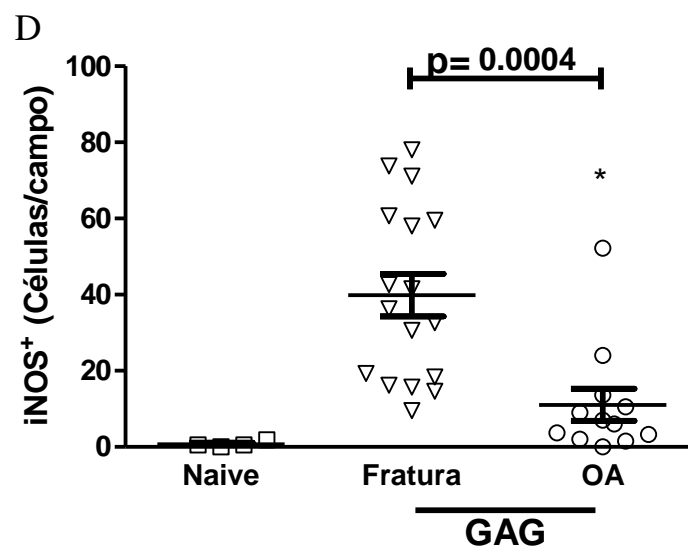
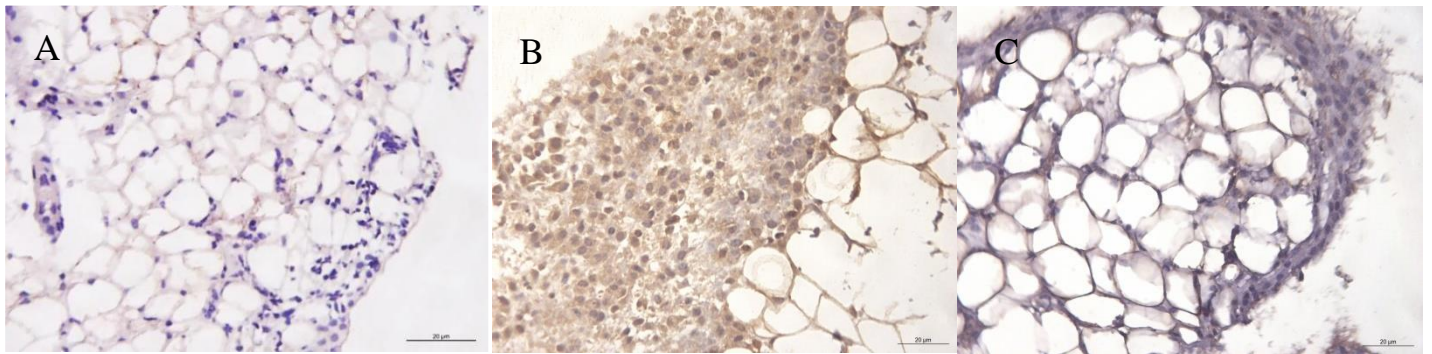


Figura 10. Imunoexpressão de iNOS na sinóvia de camundongos naive após administração de GAGs. Camundongos receberam 25µl de solução contendo GAGs (50 µg/mL) intra-articular proveniente de pacientes com (C) ou sem OA (B). Grupo naive recebeu salina (A). Todos os animais foram sacrificados após 6h (n=6 animais por grupo). Ampliação original 400x. Os resultados foram expressos como média ± EPM do número de células iNOS+. *P < 0.05, OA quando comparado com grupo fratura.

5.13. Avaliação da liberação de mediadores inflamatórios agudos induzido pela administração intra-articular de GAGs de acordo com o gênero.

A tabela 14 mostra que a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-17, INF- γ , IL-1 β) e anti-inflamatória (IL-10) induzida pela administração intra-articular de GAGs não é alterada pelo gênero independente do grupo avaliado, respectivamente IL-10; fratura (feminino vs masculino), $p=0.1009$ e OA, (feminino vs masculino), $p=0.1613$; IL-17; fratura (feminino vs masculino), $p=0.4083$ e OA, (feminino vs masculino), $p=0.1477$; INF- γ ; fratura (feminino vs masculino), $p=0.1440$ e OA, (feminino vs masculino), $p=0.1502$; IL-1 β ; fratura (feminino vs masculino), $p=0.3645$ e OA, (feminino vs masculino), $p=0.3626$.

Tabela 14. Liberação de citocinas agudas induzida pelos GAGs de acordo com o gênero.

Citocina	Amostra	Gênero	Média (pg/ml)	e.p.m	p
IL-10 (pg/ml)	Fratura	Feminino	43,36	13,12	
		Masculino	75,83	14,09	0.1009
	OA	Feminino	48,60	11,57	
		Masculino	26,69	13,61	0.1613
IL-17 (pg/ml)	Fratura	Feminino	11.97	4.840	
		Masculino	13.85	6.124	0.4083
	OA	Feminino	21.77	6.437	
		Masculino	9.027	1.548	0.1477
INF- γ (pg/ml)	Fratura	Feminino	112.7	3.245	
		Masculino	126.9	13.49	0.1440
	OA	Feminino	86.31	4.825	
		Masculino	77.19	2.832	0.1502
IL-1 (pg/ml)	Fratura	Feminino	93.00	15.94	
		Masculino	99.47	8.689	0.3645
	OA	Feminino	143.7	18.29	
		Masculino	128.3	34.95	0.3626

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m) e desvio padrão da média (d.p.m); * $p < 0.05$, Fratura (feminino vs masculino) e OA, (feminino vs masculino). **Limite de detecção:** IL-10 (32-4000 pg/ml), IL-17 (4-500 pg/ml), INF- γ (15-2000 pg/ml), IL-1 β (8-1000 pg/ml),

5.14. Avaliação da liberação de mediadores inflamatórios na cultura de sinoviócitos na presença de GAGs.

A tabela 15 revela que os GAGs independente do grupo avaliado não libera IL-10, IL-17, TNF- α , CXCL-1 ou IL-5. Entretanto, liberam IL-1 β e IL-6. Os níveis de IL-6 estavam aumentados no grupo fratura, quando comparados com o grupo OA, porém não revelou diferença estatística, $p=0.1763$. Mas, a liberação de IL-1 β foi alterada significativamente no grupo OA, quando comparados com o grupo fratura, $p=0.0001$.

Tabela 15. Liberação de citocinas in vitro.

Citocina “in vitro”	Amostra	Média	e.p.m	p
IL-6 (pg/ml)	Células	32.92	32.92	0.1763
	Fratura	365.5	26.04	
	OA	311.3	1.255	
IL-10 (pg/ml)	Células	-	-	
	Fratura	-	-	
	OA	-	-	
IL-17 (pg/ml)	Células	-	-	
	Fratura	-	-	
	OA	-	-	
TNF- α (pg/ml)	Células	-	-	
	Fratura	-	-	
	OA	-	-	
INF-Y (pg/ml)	Células	-	-	
	Fratura	-	-	
	OA	-	-	
CXCL-1 (pg/ml)	Células	-	-	
	Fratura	-	-	
	OA	-	-	
IL-5 (pg/ml)	Células	-	-	
	Fratura	-	-	
	OA	-	-	
IL-1 β (pg/ml)	Células	5.217	2.460	0.0001*
	Fratura	2.036	1.036	
	OA	30.58	2.119	

Resultados foram expressos como média, erro padrão da média (e.p.m) e desvio padrão da média (d.p.m); *P < 0.05, OA comparado com grupo fratura. **Limite de detecção:** IL-6 (4-500 pg/ml), IL-10 (32-4000 pg/ml), IL-17 (4-500 pg/ml), TNF- α (8-1000 pg/ml), INF-Y (15-2000 pg/ml), CXCL-1 (15.6-1000 pg/ml), IL-5 (4-500 pg/ml), IL-1 β (8-1000 pg/ml),

6. Discussão

Durante a iniciação científica e mestrado foram revelados que a cartilagem proveniente de pacientes com OA, ela possui GAGs em maior quantidade e de alto peso molecular (NUNES 2013). Entretanto, a técnica usada tinha baixa sensibilidade e especificidade, foram usados gel de agarose (técnica quantitativa) e SDS-page (técnica qualitativa). No intuito de identificarmos se a alteração no peso molecular verdadeiramente existia, o estudo usou cromatografia de permeação em gel (GPC), também conhecida como cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) ou cromatografia de gel de filtração (GFC), é uma técnica cromatográfica que separa moléculas dissolvidas, no caso, os GAGs dissolvidos em solvente aquoso como nitrato de sódio, com base no seu tamanho, bombeando-as através de colunas especializadas que contém no seu interior um material com microesferas. À medida que a amostra é separada e eluída da coluna, ela pode ser caracterizada por um único detector de concentração (calibração convencional) ou por uma série de detectores (espalhamento de luz, concentração e viscosímetro juntos (detecção tripla). Nesse estudo a técnica nos permitiu avaliar a distribuição do peso molecular absoluto e do tamanho molecular. Baseado nos dados obtidos com o GPC, o nosso estudo revelou que essas alterações na massa molar existiam, mas ao contrário do que foi observado na pesquisa durante o mestrado (NUNES, 2013), o estudo aqui desenvolvido mostrou que a massa molar dos GAGs era menor nos pacientes com OA. Todavia, a diferença estatística não existia quando avaliados em grupo, OA versus fratura.

Nós acreditamos que um dos motivos que tenha gerado essa discrepância de dados seja uma característica do SDS-page na análise de GAG. Essa técnica não é capaz de diferenciar GAGs de peso molecular próximos, ou seja, que estejam na mesma escala de grandeza, por exemplo: diferenciar 2×10^4 g/mol de 3×10^4 . Portanto, ela avalia os

GAGs de mesma grandeza como uma coisa só. Já o GPC é uma técnica mais fidedigna. Ela é capaz de detectar pequenas diferenças, mesmo em baixas quantidade de amostra.

Outra informação importante extraída aqui, é que os GAGs de pacientes com OA têm baixo peso molecular, embora não exista diferença entre os grupos. Esse baixo peso molecular corrobora com dados da literatura revelando que os GAGs provenientes de pacientes com OA têm baixo peso molecular, haja vista que ele é degradado durante a doença (BOLLET & NANCE, 1966, ISHIMARU et al., 2014). A literatura sugere que OA induz alterações significativas na matriz cartilaginosa através da ativação de enzimas que degradam a matriz extracelular, e conseqüentemente quebram o ácido hialurônico, o agrecano e os GAGs (ROUGHLEY et al., 2014). Além da ativação de enzimas, o próprio estresse oxidativo gerado durante a doença promove quebras na matriz extracelular (ROUGHLEY et al., 2014). Porém, vale ressaltar que essa redução na cadeia não é uma verdade absoluta. Por exemplo: os cavalos com lesões osteocondrais e ratos submetidos à OA experimental desenvolveram aumento no comprimento da cadeia de CS (BROWN et al., 2007; SILVA et al., 2009). No entanto, na OA secundária à displasia do quadril em cães, o comprimento da cadeia de CS foi semelhante aos controles (INEROT et al., 1978), similar aos nossos resultados. Outro estudo também não encontrou alteração no comprimento de CS na cartilagem articular do quadril em pacientes com OA (RIZKALLA et al., 1992).

Seguindo na análise das alterações estruturais, o estudo revelou que alterações existiam. Entretanto, essas diferenças somem quando os dados eram agrupados levando em consideração a presença da doença ou não, sexo e idade. A idade foi retirada desse trabalho, uma vez que estaríamos adicionando mais uma variável para avaliar e discutir.

Isso tornaria o trabalho longo e cansativo. Além disso, aumentaria ainda mais a complexidade do trabalho. Diante disso, o trabalho adotou ter ou não a doença e o sexo. Seguindo com o estudo, ele tentou investigar quais alterações ocorriam nos GAGs dos pacientes com OA que justificassem o baixo peso molecular observado dentro do grupo. Usando análise elementar, é uma técnica para determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra. No nosso caso também usamos para detectar enxofre. O funcionamento da técnica é baseado no método de Pregl-Dumas, em que as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector TCD (detector de condutividade térmica). Por isso, não podemos avaliar oxigênio nas amostras, embora ele esteja presente na constituição dos GAGs. Utilizando esse método, o estudo mostrou que os pacientes com OA têm uma redução na quantidade de enxofre. Portanto, é uma redução da sulfatação da molécula de GAGs que a OA produz.

As alterações na sulfatação e a associação com patologia são bem conhecidas na literatura (MUTHANA et al., 2012). Estudos têm revelado que os distúrbios genéticos das sulfotransferases, enzimas responsáveis pela sulfatação dos GAGs, podem gerar alterações esqueléticas, surdez, defeito cardíaco congênito, bem como distrofia corneana macular (MUTHANA et al., 2012). No sistema nervoso, por exemplo, durante o dano dos nervos, os astrócitos aumentam a expressão de proteoglicanos ricos em sulfato de condroitina, eles quando produzidos repelem os axônios crescentes ao tentar atravessar o local da lesão. Então a remoção de sulfatos usando a condroitinase ABC estimula a regeneração do axônio (MOON et al., 2001). Na cartilagem, os grupos sulfatos conferem cargas negativas, o que dá aos GAGs uma alta densidade de cargas negativas. Sendo negativas, atraem cátions como o Na⁺. Por outro lado, a redução da sulfatação promove a perda gradual da resistência as forças de compressão que incidem

sobre a cartilagem. Nós, neste estudo, não investigamos o mecanismo que leva a redução da sulfatação, mas baseado no exposto acima é possível que a OA, assim como outras doenças promova a inibição de vias importantes envolvidas na sulfatação. Nós acreditamos que isso ocorre por um mecanismo direto, no qual, espécies reativas danificam os componentes da matriz ou através de mecanismo indiretos, no qual enzimas proteolíticas (metaloproteinase de matriz) e glicolíticas (condroitinases e hialuronidases) são ativadas. Também existe a possibilidade da inibição de sulfotransferases. Estudos têm revelado que nos pacientes com OA as sulfotransferases estão menos expressa no foco da lesão, quando comparados a regiões integras da mesma cartilagem (ISHIMARU et al., 2014). Além disso, um estudo recente demonstrou que a imunomarcagem para sulfotransferases nos pacientes com OA era bem menor, quando comparado aos pacientes sem OA (HAN et al., 2017). Evidentemente que esses mecanismos precisam ser investigados em nosso estudo também.

Estudo similar ao nosso também tem mostrado esse tipo de comportamento, ou seja, as cadeias de sulfato de condroitina das cartilagens artríticas foram de tamanho essencialmente normal e sulfatação interna também, mas tinha sulfatação significativamente alterada dos resíduos terminais. Considerando que, na cartilagem normal, 60% do terminal GalNAc4S era 4,6-dissulfatado, foi reduzido para: 30% na cartilagem osteoartrítica. O estudo sugeriu que a atividade da GalNAc-4,6S-disulfotransferase estava reduzida. Portanto, alterações importante no metabolismo estariam afetando os condrócitos na OA (PLAAS et al., 1998).

Para nos certificarmos da redução na sulfatação, foi nos proposto que analisássemos o potencial zeta. Essa técnica avalia a carga geral da molécula, posto que os valores acima de zero das moléculas apresentam carga positiva, já abaixo refletem

carga negativa. Além disso, quanto mais distante o valor obtido estiver do valor zero mais positiva ou negativa é a molécula. Por exemplo: a molécula com potencial zeta -2 mV e uma molécula com potencial -40 mV, a molécula -40 mV possui uma densidade maior de carga negativa na molécula. Como os GAGs são carregados negativamente e essa carga é definida pela sulfatação, nós avaliamos as cargas elétricas negativas. Como observado, os GAGs dos pacientes com OA possuem carga negativa, assim como os pacientes sem o diagnóstico de OA. Entretanto, nos pacientes com OA a carga geral está mais próxima de zero, ou seja, essa molécula sofreu uma redução das cargas elétricas negativas. Portanto, perdeu grupos sulfatos.

Analisando o possível sítio da molécula que está alterada com a redução da sulfatação e do potencial zeta, nós sugerimos que alterações na n-acetil-galactosamina estejam ocorrendo nos pacientes com OA, haja vista da impossibilidade de tal fenômeno ocorrer na porção do ácido glucurônico, pois ele não é sulfatado. Quando analisamos a influência do gênero, posto que as mulheres são mais acometidas que os homens na OA, isso talvez repercutisse com menor sulfatação nas mulheres (CROSS et al., 2014). Contudo, o trabalho revelou que os pacientes do sexo feminino com OA possuem a molécula mais sulfatada do que os pacientes do sexo masculino com OA. Sendo assim, homens com OA revelam quantidade de S ainda mais reduzida. Nós não sabemos como explicar isso no momento, posto que nós esperássemos esse comportamento nas mulheres

Os GAGs sulfatados e não sulfatados são amplamente estudados na medicina. Isso ocorre por causa da grande diversidade de aplicação deles. Eles podem ser usados no desenvolvimento de biomateriais, mas a sua importância reside na sua aplicação como medicamento e, no seu estudo, no intuito de compreender como algumas patologias

acontecem, haja vista que eles estão presentes na grande maioria dos tecidos e são alterados pelas doenças, ou seja, um nicho para o estudo de biomarcadores.

Os GAGs sulfatados e não sulfatados são amplamente conhecidos por sua atividade anti-inflamatória. Estudo com o heparano sugere que ele pode se ligar a L- e P-selectina, bem como a quimiocinas dificultando a adesão, ativação e transmigração de leucócitos para os sítios inflamatórios (POMIN, 2012). O sulfato de condroitina usado no tratamento da OA exerceria seu papel anti-inflamatório através da inibição da ativação de NF- κ B em condrócitos, sinoviócitos e macrófagos após o dano articular (IOVU et al., 2008). Ainda o ácido hialurônico exerceria o seu efeito anti-inflamatório através de sua ligação com receptores CD44 e consequente inibição da ativação de NF- κ B (KÖWITSCH et al., 2017, MACHADO et al., 2017). Entretanto, estudos têm revelado que modificações na estrutura desses GAGs são capazes de alterar profundamente a sua função, por exemplo: o ácido hialurônico, na presença de espécies reativas e a hialuronidas durante a OA, sofre modificações em sua estrutura, entre elas nós destacamos a redução da massa molar. Essa modificação é suficiente para torná-lo pró-inflamatório, sendo assim o ácido hialurônico não se liga ao receptor CD44, mas sim aos receptores do tipo Toll- like 2 e 4, dois receptores tipicamente pró-inflamatórios (RUPPERT et al., 2014, KÖWITSCH et al., 2017). Como mostrado acima, os GAGs extraídos da cartilagem osteoartrítica estão alterados, ou seja, aconteceram reduções importantes na sua estrutura como redução de enxofre e carga elétrica negativa. Isso nós levou a sugerir que tais modificações pudessem repercutir com alterações no papel biológico. Diante disso, nós pesquisamos qual era o nível de GAGs encontrados no líquido sinovial de pacientes saudáveis, e nós encontramos 50 μ l/ml (BENSOUYAD et al., 1990). Nós administramos essa mesma concentração de GAGs em animais naive, haja vista que a concentração de GAGs no líquido sinovial dos

pacientes com OA era bastante variável. Como observado, tanto um quanto o outro desencadearam uma resposta inflamatória quando administrado intra-articular, não havendo diferença entre eles. Esse dado é muito importante, uma vez que os CSs são conhecidas como moléculas inertes ou com potencial anti-inflamatório. Entretanto, os dados demonstram que esses polímeros possuem sim um potencial inflamatório.

Evidentemente que nós esperávamos que os GAGs provenientes de pacientes com OA tivessem um maior influxo celular, mas isso não aconteceu. Esse nosso dado não foi diferente daquilo que a literatura já tem revelado, que não há diferença de células no líquido sinovial de pacientes com e sem OA, fato que é exuberante na artrite reumatóide. Em modelos experimentais de OA, também já tinham revelado a inexistência dessa diferença (de LEITE et al., 2014; CASTRO et al., 2006).

A OA é uma doença inflamatória que repercute com leve influxo celular crônico. Como os GAGs provocam influxo celular agudo, era possível que esse influxo se mantivesse cronicamente, neste caso sete dias após administração. Contudo, nós observamos que os GAGs não induzem migração celular crônica. Sendo assim, a manutenção da inflamação exige mais de uma administração. Essa necessidade de várias administrações para manter o influxo celular não invalida os nossos dados. Basta levarmos em consideração que na OA produtos da degradação da cartilagem são liberados continuamente e sensibilizam a membrana sinovial, gerando a sinovite, perpetuando a doença (MATHIESSEN & CONAGHAN, 2017).

Quando analisamos a influência do gênero sobre a análise elementar, posto que as mulheres são mais acometidas que os homens na OA, nosso trabalho revelou que os pacientes do sexo feminino com OA possuem a molécula mais sulfatada do que os pacientes do sexo masculino com OA. Sendo assim, nós decidimos avaliar se a

separação baseada no sexo influencia no influxo celular. Como observado os GAGs de pacientes do sexo feminino induzem migração mais intensa do que o grupo masculino independente do grupo avaliado. Portanto, os GAGs provenientes das mulheres tem um potencial inflamatório maior independente de ter a doença ou não.

Essa relação entre o sexo feminino e o desenvolvimento de doenças inflamatórias tem sido extensamente investigada (KLEIN & FLANAGAN, 2016). Nos EUA, por exemplo: 80% de todos os casos de doenças autoimune incidem nas mulheres. Doenças como: Síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico, doenças da tireóide (como tireoidite de Hashimoto e doença de graves), esclerodermia e miastenia gravis, acometem mais mulheres (KLEIN & FLANAGAN, 2016). Em modelos experimentais de doenças autoimune, tais como: encefalomielite, diabetes e esclerose, os danos gerados pelo modelos são mais graves no sexo feminino. Além disso, a castração de machos aumenta, enquanto a ovariectomia diminui nas fêmeas, a gravidade das doenças autoimunes induzidas por modelos experimentais (VOSKUHL et al., 2011). Na OA, vários estudos já demonstraram que as mulheres têm maior risco de ter OA do que os homens (O'CONNOR et al., 2007, SRIKANTH et al., 2005, PRIETO-ALHAMBRA et al., 2014). Além disso, esse risco é ainda maior após a menopausa. Contudo, nenhum estudo tinha revelado até o presente momento a possível relação entre sexo e aumento do influxo celular induzido por GAGs.

Outra característica importante da OA é a dor, neste contexto nós resolvemos investigar se administração dos GAGs era capaz de induzir dor, uma vez que eles são capazes de provocar influxo celular independente da amostra. Além disso, caso existisse dor, se existia diferença na dor entre os grupos, OA versus fratura. Entretanto, ao contrário do influxo celular, os GAGs não são capazes de induzir dor. Dessa forma, os

GAGs estão mais envolvidos com a migração celular do que fenômeno nociceptivo. Evidentemente nós poderíamos aumentar a concentração de GAGs no grupo OA, posto que os níveis de GAGs nesse grupo são bem variados. Entretanto, teríamos que fazer a mesma coisa com o grupo fratura, o que infelizmente não iria refletir a realidade caso nós encontrássemos algum comportamento nociceptivo nesse grupo.

A migração celular para o sítio inflamatório é uma das principais características das doenças autoimunes. Esse processo de migração é norteado por citocinas e mediadores inflamatórios que promovem a quimiotaxia de células inflamatórias para os sítios de inflamação (TURNER et al., 2013; NAVEGANTES et al., 2017). Levando em consideração que a OA é uma doença inflamatória. Além disso, vários mediadores e citocinas inflamatórias já foram identificados na OA (WOJDASIEWICZ et al. 2016). Então o estudo se propôs a analisar quais citocinas estavam envolvidas na migração celular induzida pelos GAGs, e se tinha diferença entre os grupos, OA versus fratura. O objetivo de tal proposta foi observamos a inexistência de diferença no influxo celular entre os grupos, porém o estudo da membrana sinovial detectou a existência de aumento no infiltrado celular. Também revelou maior gravidade no estágio da doença. Esse dado é importante pelo razão da inexistência de diferença de influxo celular no líquido sinovial quando estudos clínicos são realizados. Entretanto, alterações na membrana sinovial são bem característicos nos pacientes com OA, quando comparados com os pacientes saudáveis (SCANZELLO & GOLDRING, 2014; MATHIESSEN & CONAGHAN, 2017). A literatura tem sugerido que fragmentos da cartilagem ou até mesmo do menisco ou do osso subcondral, após um trauma, promovem a sensibilização de células da membrana sinovial, por exemplo: macrófagos similares, eles quando ativados liberam citocinas e mediadores pró-inflamatórios (MATHIESSEN & CONAGHAN, 2017). Esses mediadores quando liberados induzem quimiotaxia de

células inflamatórias, a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos diferentes tecidos que compõem a articulação e dano. Além disso, na membrana sinovial, induzem edema, angiogenesis, fibrose, hiperplasia da membrana sinovial e liberação de citocinas, tais como: IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-17, IL-18 e TNF- α (WOJDASIEWICZ et al. 2016).

TNF- α , IL-6, IL-1 β e NO estão classicamente associadas à migração celular, mas também já foram demonstrados em pacientes com OA. Os nossos dados revelaram que administração de GAGs independente do grupo, OA ou fratura, é capaz de induzir a liberação de IL-10, TNF- α , IL-17, IL-6, IL-1 β , NO e INF- γ . Curiosamente os GAGs de pacientes com OA induzem aumento dos níveis de IL-1 β e IL-17 in vivo, quando comparados ao grupo fratura. Além disso, in vitro, IL-1 β e IL-6 estão aumentados, porém somente o grupo OA induz a liberação de IL-1 β .

IL-1 β é uma das citocinas chaves na patogênese da OA. Ela é sintetizada na forma de pró-IL-1 β e após ação da caspase-1, torna-se IL-1 β (PICCIOLI & RUBARTELLI, 2013). Esse processo pode ser desencadeado fisiologicamente ou após trauma, infecção e doenças autoimunes. Na junta a síntese e liberação dessa citocina pode ocorrer nos fibroblastos, condrócitos, osteoblastos, células do menisco e células mononucleares que estavam presentes na articulação ou infiltraram após a resposta inflamatória (WOJDASIEWICZ et al. 2016, MATHIESSEN & CONAGHAN, 2017, KAPOOR et al., 2011). Na OA, estudos já demonstraram alterações significativas nos níveis de IL-1 β no líquido sinovial, na membrana sinovial, cartilagem e osso subcondral (WOJDASIEWICZ et al. 2016, MATHIESSEN & CONAGHAN, 2017, KAPOOR et al., 2011). Também a expressão do receptor para IL-1 β está aumentada nos pacientes com OA. A detecção da citocina e do seu receptor nas células articulares é de suma importância, uma vez que IL-1 β inibe a expressão de agregcano e colágeno tipo II. Além

disso, estimula a liberação de MMP-1, MMP-3 e MMP-13 e a produção de IL-6, IL-8, MCP-1 e CCL-5 (WOJDASIEWICZ et al. 2016, KAPOOR et al., 2011). IL-6, por si só, é capaz de reduzir a expressão de colágeno tipo II e quando combinada com IL-1 β , elas promovem o aumento da expressão de MMP-1 e MMP-13 (CAWSTON et al., 1998; ROWAN et al., 2001; PORÉE et al., 2008).

IL-17 é uma citocina pró-inflamatória também envolvida na patogênese da OA. A fonte de IL-17 é principalmente células T CD4 + de memória ativadas que infiltram a membrana sinovial e toda a articulação através dos vasos sanguíneos (KORN et al., 2009; SUURMOND et al., 2011). Isso justifica o motivo pelo qual não foi observada *in vitro*, em nosso estudo. IL-17 quando liberada se liga aos receptores de superfície para IL-17 presentes em quase todas as células, inclusive nos condrócitos e fibroblastos sinoviais (HONORATI et al., 2006). Na clínica, estudo com pacientes com OA tem revelado aumento dos níveis de IL-17 no soro e no líquido sinovial. Também revelou correlação positiva entre aumento dos níveis de IL-17 e gravidade das lesões (CHEN et al., 2014). *In vitro*, IL-17 inibiu a síntese de proteoglicanos por condrócitos e promove a produção de enzimas do grupo das MMPs (LUBBERTS et al., 2000; MARTEL-PELLETIER et al., 1999; BENDERDOUR et al., 2002). Além disso, ela influencia a secreção de outras citocinas e compostos, afetando negativamente a cartilagem, tal como: IL-1 β , TNF- α , IL-6, NO, PGE2 (WOJDASIEWICZ et al. 2016). Em fibroblastos sinoviais isolados de pacientes com OA, se sabe que IL-17 estimula a liberação do fator angiogênico VEGF. Ele quando liberado induz hipertrofia da membrana sinovial (HONORATI et al., 2006; HONORATI et al., 2007).

Células T e natural killer, bem como macrófagos, células dendríticas e células B estão envolvidas na OA (KRAUS et al., 2016; LI et al., 2017). Além disso, elas são

fontes importantes de IFN- γ . Quando essa citocina é liberada, ela age em diferentes células através de receptores específicos, mas ela também pode atuar pleotropicamente. Diante da sua ligação com sítios específicos e inespecíficos, ela participa da ativação de vários genes envolvidos na síntese de mediadores inflamatórios, moléculas de sinalização, ativadores transcricionais, mediadores de apoptose e moduladores imunológicos (POLLARD et al., 2013). Também IFN- γ é uma das principais citocinas que distingue Th1 de outros subconjuntos de CD4 +, incluindo Th2, Th17, células folicular F Toll (Tfh) e T reguladoras (Treg) (ZHU et al., 2010). Como Th1 é um perfil pró-inflamatório, o bloqueio de IFN- γ tem sido estudado como uma importante via para o tratamento das doenças autoimunes, inclusive arthropatias. Entretanto, estudos têm revelado que o IFN- γ é um importante supressor dos efeitos mediados por IL-1 β nos condrócitos, fibroblastos e modelos experimentais de artrites. Eles revelaram que IFN- γ inibe a expressão de MMP13 em condrócitos e de MMP1 e MMP3 em fibroblastos induzida por IL-1 β (AHMAD et al., 2007; PAGE et al., 2010). Em modelos com roedores, IFN- γ mostrou efeito anti-inflamatório, condroprotetor e antiosteoclastogênico através de um mecanismo que envolve a regulação da síntese de quimiocinas e o recrutamento de neutrófilos (WILLIAMS et al., 2007). Portanto, sugerindo um potencial terapêutico para o IFN- γ . Neste contexto, nós acreditamos que o aumento dos níveis de IFN- γ diante da administração de GAG provenientes do grupo fratura possa ser um sinal de cartilagem intacta, ou seja, um biomarcador. Além disso, o elevado nível de IFN- γ se contrasta com o baixo nível de IL-1 β . Com isso nós não estamos dizendo que IFN- γ esteja interferindo na liberação de IL-1 β , posto que tal mecanismo não foi avaliado. Todavia, poderá está bloqueando os efeitos de IL-1 β na junta, haja vista que estudos descritos acima têm mostrado esse possível efeito.

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e pertence ao perfil de células Th2 (WOJDASIEWICZ et al., 2014). Ela é conhecida por antagonizar os efeitos das citocinas Th1, entre elas, o próprio IFN- γ . Diferente do IFN- γ , a literatura sugere que IL-10 é condroprotetora nas artropatias. Tal efeito ocorre pela capacidade dos condrócitos sintetizarem IL-10, bem como disporem de receptores para IL-10 (IANNONE et al., 2001). Entre os efeitos descritos estão à estimulação da síntese de colágeno tipo II e proteoglicanos, por exemplo: agrecano. Ainda ela antagoniza o efeito de IL-1 β , estimula a expressão de proteínas morfogenética do osso, envolvidas na condrogênese, induz a ativação de inibidores teciduais de metaloproteinase de matriz e a liberação de fatores de crescimento, e inibe a apoptose e a expressão de IL-1 β e TNF- α (UMULIS et al., 2009; WANG & LOU, 2001; JOHN et al., 2007; IANNONE et al., 2001). Nos fibroblastos de pacientes com OA, ela reduz a secreção de PGE₂, a expressão de COX e PLA₂ induzida por TNF- α , assim como a expressão de receptores e a habilidade do TNF- α se ligar aos receptores (ALAAEDDINE et al., 1999). Portanto, a redução dos níveis de IL-10 na presença de GAG proveniente de pacientes com OA corrobora com o papel condroprotetor dessa citocina, uma vez que o GAG proveniente da cartilagem intacta induziu a liberação dessa citocina em maior quantidade.

NO é um mediador clássico envolvido na progressão da OA. Estudos têm revelado a participação desse mediador nos mais variados processos, tais como: mediar os efeitos de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo: IL-1 β e TNF- α , ativação de metaloproteinase de matriz e NF- κ B, induzir a apoptose de condrócitos e a formação de espécies reativas de nitrogênio, peroxinitrito (ABRAMSON et al., 2008). Além disso, aumento dos níveis séricos de NO e a demonstração da expressão de iNOS nos condrócitos e sinoviócitos de pacientes com OA também já foram descritos (ABRAMSON et al., 2008; RAHMATI et al., 2016).

Como a imunexpressão de iNOS na sinovia, por definição considerada didaticamente como enzima inflamatória, pode ser decorrente de um efeito específico de citocinas sobre as células sinoviais promovendo um aumento de sua imunexpressão. Também a rede de citocinas que controla a ativação do iNOS é muito complexa e inclui citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-1 β e IL-6, que induzem iNOS, bem como citocinas que inibem a atividade de iNOS, como TGF- β , IL-4, IL-10 e IL-13 (SAKURAI et al., 1995; MILJKOVIC et al., 2004). Diante disso, nós investigamos se os GAG provenientes de pacientes induziam a imunexpressão de iNOS, uma vez que citocinas indutoras e supressoras foram demonstradas após a administração dos GAGs. Curiosamente, os GAGs provenientes de pacientes com OA não induzem a imunexpressão de iNOS. Todavia, no grupo fratura, foi bem pronunciado. Como não é possível isolar uma citocina, uma vez que a liberação das citocinas foi comum a ambos os grupos, apenas diferiram quanto ao nível. Portanto, nesse momento, não se dispõe de proposições para especular sobre o mecanismo envolvido nesse achado.

A presença de IL-1 e IL-6 *in vitro* e a ausência das outras citocinas não invalidam a inexistência da presença delas, dado que o tempo de incubação foi reduzido, apenas 1h. É possível que a cinética com 3h, 6h, 12h e 24h levasse ao aparecimento das citocinas. Todavia, o nosso objetivo quando fizemos esse estudo era extrairmos o material genético das células cultivadas e, por conseguinte investigamos os mecanismos intracelulares de síntese e liberação das citocinas que apareceram *in vivo*. Como não foi possível estudarmos esse mecanismo, nós avaliamos as citocinas no sobrenadante da cultura, posto que já tínhamos usado o kit e a técnica para avaliarmos as citocinas nos lavados articulares.

Em resumo, os resultados aqui revelados mostram que os GAGs provenientes de pacientes com OA, eles apresentam reduções na quantidade de enxofre e no valor da carga negativa, quando comparado com o grupo fratura. Entretanto, essas reduções não repercutem com alterações significativas na massa molar. Paralelamente, mostramos que os GAGs provenientes de pacientes com OA também induzem aumento de IL-1 β e IL-17. Esses dados em conjunto sugerem que a OA produz modificações na estrutura de GAGs da matriz extracelular da cartilagem, portanto abrindo a perspectiva para o estudo de um biomarcador para a doença. Ainda essas modificações poderiam contribuir em parte para a liberação de citocinas, com destaque para IL-1 β e IL-17 no microambiente articular. Portanto, os componentes da cartilagem, de forma inédita os GAGs, podem estar envolvidos no desencadeamento e perpetuação da OA.

7. Conclusões

A partir dos resultados obtidos com o estudos dos GAGs, as seguintes conclusões podem ser obtidas:

- A mobilidade relativa e a massa molar do CS de seres humanos com OA não diferem, quando comparada com o grupo fratura, assim como elas não são alteradas pelo gênero e nem a massa molar do CS é alterado pela idade.

-A OA reduz as porcentagens de enxofre nos GAGs, quando comparado com o grupo fratura, bem como o gênero masculino.

-A OA reduz a carga negativa dos GAGs, quando comparado com o grupo fratura

-A administração intra-articular de GAGs de pacientes com ou sem OA induz influxo celular agudo. Entretanto, eles não induzem influxo celular crônico.

-O influxo celular agudo induzido pela administração intra-articular de GAGs de pacientes com OA não diferem, quando comparada com o grupo fratura, mas sim pelo gênero.

-A administração intra-articular de GAGs de pacientes com ou sem OA não é capaz de induzir nocicepção aguda.

-A administração intra-articular de GAGs de pacientes com OA desencadeia sinovite aguda com alterações significativas no infiltrado celular e estágio da doença.

-A administração intra-articular de GAGs de pacientes com ou sem OA induz a liberação de citocinas, tais como: IL-6, IL-17, TNF- α , INF- γ , CXCL-1, IL-1 β e IL-10. Entretanto, a OA aumenta significativamente os níveis de IL-1 β e IL-17, bem como o

grupo fratura aumenta significativamente os níveis de INF- γ e IL-10 no líquido sinovial, e a imunexpressão de iNOS na sinóvia.

-A liberação de citocinas induzida pelos GAGs não é alterado pelo gênero.

-Os GAGs de pacientes com ou sem OA induz a liberação IL-6 in vitro, cultura de sinoviócitos. Todavia, somente os GAGs de pacientes com OA aumentam significativamente os níveis de IL-1 β .

8.Referências

ABADIE, E. et al. Recommendations for the use of new methods to assess the efficacy of disease-modifying drugs in the treatment of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**.v.12, n.4, p.263-268, 2004.

ABRAMSON, S.B.Osteoarthritis and nitric oxide.**Osteoarthritis Cartilage**.v.16 Suppl 2:S15-20, 2008.

AHMAD, R.; QURESHI, H.Y.; EL MABROUK, M.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M.; ZAFARULLAH, M.Inhibition of interleukin 1-induced matrix metalloproteinase 13 expression in human chondrocytes by interferon gamma.**Ann Rheum Dis**. v.66, n.6, p.782-789, 2007.

AKKIRAJU, H.; NOHE, A.Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and Cartilage Regeneration. **J Dev Biol**. v.3, n.4, p.177-192.

ALAAEDDINE, N.; DI BATTISTA, J.A.; PELLETIER, J.P.; KIANSA, K.; CLOUTIER, J.M.; MARTEL-PELLETIER, J.Inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: distinct targeting in the signaling pathways. **Arthritis Rheum**.v.42, n.4, p.710-718, 1999.

ANDERST, W.J.; LES, C.; TASHMAN, S.In vivo serial joint space measurements during dynamic loading in a canine model of osteoarthritis.**Osteoarthritis cartilage**.v.13, n.9, p.808-816, 2005.

AMEYE, L.G.; YOUNG, M.F. Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seekingthe ‘Holy Grail’ **Current Opinion in Rheumatology**, v.18, v.5, p.537–547, 2008.

APPLETON, C.T. Osteoarthritis year in review 2017: biology. **Osteoarthritis Cartilage**. v.26, n.3, p.296-303, 2018.

ARMIENTO, A.R.; STODDART, M.J.; ALINI, M.; EGLIN, D. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. **Acta Biomater**, v.65, p.1-20, 2018.

BENDERDOUR, G. et al. “Interleukin 17 (IL-17) induces collagenase-3 production in human osteoarthritic chondrocytes via AP-1 dependent activation: differential activation of AP-1 members by IL-17 and IL-1 β ,” **Journal ofRheumatology**. v. 29, n. 6, p. 1262–1272, 2002.

BENSOUYAD, A.et al. Concentrations of glycosaminoglycans in synovial fluids and their relation with immunologicaland inflammatory mediators in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**. v.49, n.5, p.301-307, 1990.

BOLLET, A.J.; NANCE, J.L. Biochemical findings in normal and osteoarthritic articular cartilage. II. Chondroitin sulphate concentration and chain length, water, and ash content. **J Clin Invest.** v. 45, n.7, p.1170–1177, 1966.

BOVE, S.E. et al. Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 14, n.10, 1041–1048, 2006.

BROWN, M.P. et al. Exercise and injury increase chondroitin sulfate chain length and decrease hyaluronan chain length in synovial fluid. **Osteoarthritis Cartilage.**v.15, n. 11, p.1318–1325, 2007.

CALLAHAN, L.F. & AMBROSE, K.R. Physical activity and osteoarthritis - considerations at the population and clinical level. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 23, n. 1, p.31-33, 2015.

CASTRO, R.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA JR, F.S.; ROCHA, F.A.C. A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis—evidence of a role for nitric oxide. **Osteoarthritis and Cartilage.** n. 14, v.8, p. 769–776, 2006.

CAWSTON, T. E. et al. The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. **Arthritis Rheum.**v.41, n.10, p.1760–1771, 1998.

CHEN, B.; DENG, Y.; TAN, Y.; QIN, J.; CHEN, L.B. “Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations,” **Journal of International Medical Research,** v. 42, n. 1, p. 138–144, 2014.

CROSS, M. et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. **Ann Rheum Dis.**v.73, n.7, p.1323-1330, 2014.

CULLEY, K.L. et al. Mouse models of osteoarthritis: surgical model of posttraumatic osteoarthritis induced by destabilization of the medial meniscus. **Methods Mol Biol.** 2015;1226:143-73. doi: 10.1007/978-1-4939-1619-1_12.

DAVIS, M.; ETTINGER, W.; NEUHAUS, I.M.; BARCLAY, I.D.; DEGAL, M.R. Correlates of knee pain among US adults with and without radiographic knee osteoarthritis. **J Rheumatol.**v.19, n.12, p.1943-1949, 2002.

de LEITE, A.C.M. et al. Meniscal transection rather than excision increases pain behavior and structural damage in experimental osteoarthritis in mice. **Osteoarthritis Cartilage.**v.22, n.11.p.1878-1885, 2014.

DIMITROULAS, T.; LAMBE, T.; KLOCKE, R.; KITAS, G.D.; DUARTE, R.V. Biologic drugs as analgesics for the management of osteoarthritis. **Semin Arthritis Rheum.**v.46, n.6, p.687-691, 2017.

EISENBERG, D.; MCPHERSON, A. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, v. 78, 1 ed, **Academic Press,** 2009.

- ENGLUND, M.; ROEMER, F.W.; HAYASHI, D.; CREMA, M.D.; GUERMAZI, A. Meniscus pathology, osteoarthritis and the treatment controversy. **Nat Rev Rheum.** v.8, n.7, p.412-419, 2012.
- ESPANHA, M.M. Articular cartilage: structure and histochemical composition. **Acta Reumatol Port.** v.35, n.5, p.424-33, 2010.
- FANG, H.; BEIER, F. Mouse models of osteoarthritis: modeling risk factors and assessing outcomes. **Nat Rev Rheumatol.** v.10, n.7, p.413-21, 2014.
- FRANSEN, M. et al. Exercise for osteoarthritis of the knee. **Cochrane Database Syst Rev.** 2015. doi: 10.1002/14651858.
- FRANSEN, M.; MCCONNELL, S.; HERNANDEZ-MOLINA, G.; REICHENBACH, S. Exercise for osteoarthritis of the hip. **Cochrane Database Syst Rev.** 2014. doi: 10.1002/14651858.
- FUNCK-BRENTANO T, COHEN-SOLAL M. Subchondral bone and osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol.** v.27, n.4, p.420-426, 2015.
- GOLDRING, M.B.; OTERO, M: Inflammation in osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol.** v.23, n.5, p.471-478, 2011.
- GREENE, M.A.; LOESER, R.F. Aging-related inflammation in osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage.** v.23, n.11, p.1966-1971, 2015.
- HAN, J. et al. Altered expression of chondroitin sulfate structure modifying sulfotransferases in the articular cartilage from adult osteoarthritis and Kashin-Beck disease. **Osteoarthritis Cartilage.** v.25, n.8, p.1372-1375, 2017.
- HAYAMI T, et al. The Role of subchondral Bone Remodeling in Osteoarthritis: Reduction of cartilage Degeneration and Prevention of Osteophyte Formation by Aledronate in the Rat Anterior Cruciate Ligament Transaction Model. **Arthritis Rheum.** v.50, n.4, p.1193-1206, 2004.
- HAYAMI, t. et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone.** v.38, n.2, p.234-243, 2006.
- HOCHMAN, J.R.; GAGLIESE, L.; DAVIS, A.M.; HAWKER, G.A.. Neuropathic pain symptoms in a community knee OA cohort. **Osteoarthritis Cartilage.** v.19, n.6, p.647-654, 2011.
- HONORATI, M.C.; CATTINI, L.; FACCHINI A. "VEGF production by osteoarthritic chondrocytes cultured in micromass and stimulated by IL-17 and TNF- α ," **Connective Tissue Research.** v.48, n. 5, pp. 239-245, 2007.

HONORATI, M.C.; NERI, S.; CATTINI, L.; FACCHINI A. "Interleukin- 17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts," **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 4, pp. 345–352, 2006.

IANNONE, F. et al. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes. **Clin Exp Rheumatol**.v.19, n.2, p.139-45, 2001.

INEROT, S.; HEINEGARD, D.; AUDELL, L.; OLSSON, S.E. Articular-cartilage proteoglycans in aging and osteoarthritis. **Biochem J**, v. 169, n.1, p.143–156, 1978.

IOVU, M.; DUMAIS, G.; DU SOUICH, P. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. **Osteoarthritis Cartilage**. 2008. doi:10.1016/j.joca.2008.06.008.

IOZZO, R.V.; SCHAEFER, L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. **Matrix biol**. v.42, p.11-55, 2015.

ISHIMARU, D.; SUGIURA, N.; AKIYAMA, H.; WATANABE, H.; MATSUMOTO, K. Alterations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee. **Osteoarthritis Cartilage**.v.22, n.2, p.250-258, 2014.

IYENGAR, S.; WEBSTER, A. A.; HENRICK-LUCKE, S.K.; XU, J.Y.; SIMMONS, R.M.A. Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine inhibitor in persistent pain models in rats. **J Pharmacol Exp Ther**.v.311, n.2. p.576–584, 2004.

JIN, X. et al. Associations between endogenous sex hormones and MRI structural changes in patients with symptomatic knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**. v.25, n.7, p.1100-1106, 2017

JOHN, T. et al. Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF-alpha in human articular chondrocytes in vitro. **Cytokine**.v.40, n.3, p.226-34, 2007.

JOHNSON, V.L.; HUNTER, D.J. The epidemiology of osteoarthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol**.v.28, n.1, p.5-15, 2014.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**.v.413, n. 6852, p.203-210, 2001.

KAPOOR, M.; MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; PELLETIER, J.P.; FAHMI, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nat Rev Rheumatol**.v.7, n.1, p.33-42, 2011.

KIDD BL. Osteoarthritis and joint pain [review]. **Pain**.v.123 (1-2), p.6–9, 2006.

KLEIN, S.L.; FLANAGAN, K.L. Sex differences in immune responses. **Nat Rev Immunol**.v.16, n.10, p.626-638, 2016.

KNIGHTS, C.B.; GENTRY, C.; BEVAN, S. Partial medial meniscectomy produces osteoarthritis pain-related behavior in female C57BL/6 mice. **Pain**.v.153, n. 2, p.281–292, 2012.

KLOPPENBURG, M.; KWOK, W.Y. Hand osteoarthritis--a heterogeneous disorder. **Nat Rev Rheumatol.** v.8, n.1, p.22-31, 2011.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. "IL-17 and Th17 cells," **Annual Review of Immunology.** v. 27, p. 485–517, 2009.

KÖWITSCH, A.; ZHOU, G.; GROTH, T. Medical application of glycosaminoglycans: a review. **J Tissue Eng Regen Med.** 2017. doi: 10.1002/term.2398.

KRAUS, V.B. et al. Direct in vivo evidence of activated macrophages in human osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage.** v.24, n.9, p.1613-1621, 2016.

KULKARNI, K.; KARSSIENS, T.; KUMAR, V.; PANDIT, H. Obesity and osteoarthritis. **Maturitas.** v.89, p.22-28, 2016.

KUYINU, E.L.; NARAYANAN, G.; NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. **J Orthop Surg Res.** 2016. doi: 10.1186/s13018-016-0346-5.

LEE AS. et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. **Gene.** v.527, n.2, p.440-447, 2013.

LI, Y.S.; LUO, W.; ZHU, S.A.; LEI, G.H. T Cells in Osteoarthritis: Alterations and Beyond. **Front Immunol.** v.8, p.356, 2017.

LOHMANDER, L.S.; GERHARDSSON, V.; ROLLOF, J. Incidence of severe knee and hip osteoarthritis in relation to different measures of body mass: a population-based prospective cohort study. **Ann Rheum Dis.** v.68, n.4, p.490–496, 2009.

LUBBERTS, E. et al. Reduction of interleukin- 17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4," **Arthritis & Rheumatology,** v. 43, n. 6, p. 1300–1306, 2000.

LUO Y, et al. The minor collagens in articular cartilage. **Protein Cell.** v.8, n.8, p.560-572, 2017.

MABEY, T.; HONSAWEK, S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis **World J Orthop.** v.6, n.1, p.95-105, 2015.

MACHADO, R.C.; CAPELA, S.; ROCHA, F.A.C. Polysaccharides As Viscosupplementation Agents: Structural Molecular Characteristics but Not Rheology Appear Crucial to the Therapeutic Response. **Front Med (Lausanne).** 2017. doi: 10.3389/fmed.2017.00082.

MANSKE, Robert. Fundamental Orthopedic Management for the Physical Therapist Assistant, 4ed, **Mosby,** 2015.

MARTEL-PELLETIER, J.; MINEAU, F.; JOVANOVIĆ, D.; DI BATTISTA, J.A.; PELLETIER, J.P. "Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB together regulate interleukin-17-induced nitric oxide production in human osteoarthritic chondrocytes: possible role of transactivating factor mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase (MAPKAPK)," **Arthritis & Rheumatology**, v. 42, n. 11, p. 2399–2409, 1999.

MAUDENS, P.; MEYER, S.; SEEMAYER, C.A.; JORDAN, O.; ALLÉMANN, E. Self-assembled thermoresponsive nanostructures of hyaluronic acid conjugates for osteoarthritis therapy. **Nanoscale**. v.10, n.4, p.1845-1854, 2018.

MATHIESSEN A, CONAGHAN PG. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. **Arthritis Res Ther**. v.19, n.1, p.18, 2017.

MCALINDON, T.E, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**. v.22, n.3, p.363-388, 2014.

McCOY, A.M. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. **Vet Pathol**. v.52, n.5, p.803-818.

MILLER, R.E .; MILLER, R.J .; MALFAIT, A.M. Osteoarthritis joint pain: the cytokine connection. **Cytokine**. v.70, n.2, p.185-193, 2014.

MILJKOVIĆ, D.; TRAJKOVIĆ, V. Inducible nitric oxide synthase activation by interleukin-17. **Cytokine Growth Factor Rev**. v.15, n.1, p.21-32, 2004.

MOON, L.D.; ASHER, R.A.; RHODES, K.E.; FAWCETT, J.W. Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. **Nat Neurosci**. v. 4, n.5, p.465–466, 2001.

MUTHANA, S.M.; CAMPBELL, C.T.; GILDERSLEEVE, J.C. Modifications of glycans: biological significance and therapeutic opportunities. **ACS Chem Biol**. v.7, n.1, p.31-43, 2012.

NAVEGANTES, K.C. et al. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. **J Transl Med**. v.15, n.1, p.36, 2017.

NELSON, A.E. et al. Brief report: differences in multijoint symptomatic osteoarthritis phenotypes by race and sex: the Johnston County Osteoarthritis Project. **Arthritis Rheum**. v.65, n.2, p.373-377, 2013.

NEWBERRY, S.J. et al. Treatment of Osteoarthritis of the Knee: An Update Review [Internet]. Rockville (MD): **Agency for Healthcare Research and Quality (US)**; 2017 May.

NUNES RM, Avaliação qualitativa e quantitativa de glicosaminoglicanos em pacientes com osteoartrite. 2014, 119f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará.

Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, Ceará, 2013.

O'CONNOR MI. Sex differences in osteoarthritis of the hip and knee. **J Am Acad Orthop Surg**. v.15 Suppl 1:S22-5, 2007.

ØSTERÅS, N. et al. Exercise for hand osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**. 2017. doi: 10.1002/14651858.

PAGE, C.E. et al. Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. **Arthritis Res Ther**. v.12, n.2, R49, 2010.

PALAZZO, C.1.; NGUYEN, C.; LEFEVRE-COLAU, M.M.; RANNOU, F.; POIRAUDEAU, S. Risk factors and burden of osteoarthritis. **Ann Phys Rehabil Med**. v.5, n.3, p.134-138, 2016.

PALUKURU, U.P.; MCGOVERIN, C.M.; PLESHKO, N. Assessment of hyaline cartilage matrix composition using near infrared spectroscopy. **Matrix Biol**, v.38, p.3-11, 2014.

PICCIOLI P, RUBARTELLI A. "The secretion of IL-1 β and options for release," **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 425–429, 2013.

PINTO, A.C. et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effect of an extract of *Coccidioides posadasii* in experimental arthritis. **Mycopathologia**. v.175, n.3-4, p.193-206, 2013.

PLAAS, A.H.; WEST, L.A.; WONG-PALMS, S.; NELSON, F.R. Glycosaminoglycans sulfation in human osteoarthritis. Disease-related alterations at the non-reducing termini of chondroitin and dermatan sulfate. **J Biol Chem**. v.273, n.20, p.12642-12649, 1998.

PINTO et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effect of an extract of *Coccidioides posadasii* in experimental arthritis. **Mycopathologia**. v.175, n (3-4), p.193-206, 2013.

POLLARD, K.; CAUVI, D.M.; TOOMEY, C.B.; MORRIS, K.V.; KONO, D.H. Interferon- γ and systemic autoimmunity. **Discov Med**. v.16, n.87, p.123-131, 2013.

POMIN, V.H. Fucanomics and galactanomics: Current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1820, n.12, p. 1971-1979, 2012.

PORÉE, B. et al. Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the *COL2A1* promoter. **J. Biol. Chem**. v.283, n.8, p. 4850–4865, 2008.

PRIETO-ALHAMBRA, D. et al. Incidence and risk factors for clinically diagnosed knee, hip and hand osteoarthritis: influences of age, gender and osteoarthritis affecting other joints. **Ann Rheum Dis**. v.73, n.9, p.1659-1664, 2014.

PROVENZA, J.R.; SHINJO, S.K.; SILVA, J.M.; PERON, C.R.; ROCHA, F.A. Combined glucosamine and chondroitin sulfate, once or three times daily, provides clinically relevant analgesia in knee osteoarthritis. **Clin Rheumatol**. v.34, n.8, p.1455-1462, 2015.

PUNZI L. et al. Posttraumatic arthritis: overview on pathogenic mechanisms and role of inflammation. **RMD Open**. 2016. doi: 10.1136/rmdopen-2016-000279.

RAHMATI, M.; MOBASHERI, A.; MOZAFARI, M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. **Bone**. v.85, p.81-90, 2016.

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

RAYAHIN, J.E.; BUHRMAN, J.S.; ZHANG, Y.; KOH, T.J.; GEMEINHART, R.A. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. **ACS Biomater Sci Eng**. v.1, n.7, p.481-493, 2015.

RIZKALLA, G.; REINER, A.; BOGOCH, E.; POOLE, A.R. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. **J Clin Invest**. v. 90, n.6, p.2268-2277, 1992.

ROMAN-BLAS, J.A. et al. Combined Treatment With Chondroitin Sulfate And Glucosamine Sulfate Shows No Superiority Over Placebo for Reduction of Joint Pain and Functional Impairment in Patients With Knee Osteoarthritis: A Six-Month Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. **Arthritis Rheumatol**. v.69, n.1, p.77-85, 2017.

ROUGHLEY, P.J.; MORTON, J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. **J Exp Orthop**. 2014. doi: 10.1186/s40634-014-0008-7.

RUPPERT, S.M.; HAWN, T.R.; ARRIGONI, A.; WIGHT, T.N.; BOLLYKY, P.L. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. **Immunol Res**. v.58, n.(2-3):186-92, 2014.

SAKURAI H. et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. **J Clin Invest**. v.96, n.5, p.2357-2363, 1995.

SCANZELLO, C.R.; GOLDRING, S.R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**. v.51, n.2, p.249-257, 2012.

SCHAEFER, L.; SCHAEFER, R.M. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. **Cell Tissue Res.** v.339, n.1, p.237-246, 2010.

SHAKIBAEI, M.; SCHULZE-TANZI, L. G.; JOHN, T.; MOBASHERI, A. Curcumin protects human chondrocytes from IL1 β induced inhibition of collagen type II and β 1 integrin expression and activation of caspase 3: and immunomorphological study. **Ann Anat.** v.187, n.(5-6):487-97, 2005.

SHIMURA Y, et al. The factors associated with pain severity in patients with knee osteoarthritis vary according to the radiographic disease severity: a cross-sectional study. **Osteoarthritis Cartilage.** v.21, n.9, p.1179–1184, 2013.

SRIKANTH, V.K. et al. A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage.** v.13, n.9, p.769-781, 2005.

SILVA, F.S.JR. et al. Combined glucosamine and chondroitin sulfate provides functional and structural benefit in the anterior cruciate ligament transection model. **Clin Rheumatol.** v.28, n.(2), p.109-117, 2009.

SOARES DA COSTA, D.; REIS, R.L.; PASHKULEVA, I. Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. **Annu Rev Biomed Eng.** v.19, p.1-26, 2017.

STIEBEL, M.; MILLER, L.E.; BLOCK, J.E. Post-traumatic knee osteoarthritis in the young patient: therapeutic dilemmas and emerging technologies. **Open Access J Sports.** v.5, p.73-79, 2014.

STANTON, H.; MELROSE, J.; LITTLE, C.B.; FOSANG, A.J. Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. **Biochim Biophys Acta.** v.1812, n.12, p.1616–1629, 2011.

STERN, R.; KOGAN, G.; JEDRZEJAS, M.J.; SOLTES, L. The many ways to cleave hyaluronan. **Biotechnol Adv.** v. 25, n.5, p.537–557, 2007.

SUURMOND, J. et al. “Mast cells are the main interleukin-17-positive cells in anti-citrullinated protein antibody-positive and -negative rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium,” **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 5, article R150, 2011.

TURNER, M.D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochim Biophys Acta.** v.1843, n.11, p.2563-2582, 2014.

TSUCHIDA, A.I. et al. Interleukin-6 is elevated in synovial fluid of patients with focal cartilage defects and stimulates cartilage matrix production in an in vitro regeneration model. **Arthritis Res Ther.** v.14, n.6, R262, 2012.

UGUCCIONI, M.; TEIXEIRA, M.M.; LOCATI, M.; MANTOVANI, A. Editorial: Regulation of Inflammation, Its Resolution and Therapeutic Targeting. **Front Immunol.** v.8, p.415, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00415.

UMULIS, D.; O'CONNOR, M.B.; BLAIR, S.S. The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. **Development.** v.136, n.22, p.3715-3728, 2009.

VERONESI, F. et al. Novel therapeutic targets in osteoarthritis: Narrative review on knock-out genes involved in disease development in mouse animal models. **Cytotherapy.** v.18, n.5, p.593-612, 2016.

VERRI JR. W.W. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics.** v.112, n.1, p.116-138, 2006.

VOSKUHL, R. Sex differences in autoimmune diseases. **Biol. Sex Differ.** 2011. doi: 10.1186/2042-6410-2-1.

XIA, S. et al. An Update on Inflamm-Aging: Mechanisms, Prevention, and Treatment. **J Immunol Res.** 2016;2016:8426874. doi: 10.1155/2016/8426874. Epub 2016 Jul 14.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). **Annu Rev Immunol.** 28, p.445-89, 2010.

WANG, Z.Y. et al. Efficacy and Safety of Duloxetine on Osteoarthritis Knee Pain: A Meta-Analysis of Randomized Controlled **Trials.** **Pain Med.** v.16, n.7, p.1373-85, 2015.

WANG, Y.; LOU, S. Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in vitro. **Chin Med J (Engl).** 2001 Jul;114(7):723-5.

WILLIAMS, A.S. et al. Interferon-gamma protects against the development of structural damage in experimental arthritis by regulating polymorphonuclear neutrophil influx into diseased joints. **Arthritis Rheum.** v.56, n.7, p.2244-2254, 2007.

WILLIAMS, V.F.; CLARK, L.L.; OH, G.T. Update: Osteoarthritis and spondylosis, active component, U.S. Armed Forces, 2010-2015. **MSMR.** v.23, n.9, p.14-22, 2016.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, Ł.A.; SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators Inflamm.** 2014:561459.2014. doi: 10.1155/2014/561459. Epub 2014 Apr 3

Apêndice

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa intitulado “Efeitos *in vitro* de um polissacarídeo em cultura de condrócitos humanos e avaliação quantitativa e qualitativa de glicosaminoglicanos em pacientes com osteoartrite”, que tem por objetivo avaliar em laboratório um possível novo tratamento para pacientes portadores de osteoartrite, também conhecida como artrose, bem como caracterizar as alterações bioquímicas dos glicosaminoglicanos presentes na cartilagem articular de pacientes portadores de artrose.

Estudos já realizados em animais de laboratório com uma nova medicação, que chamamos de “polissacarídeo”, mostraram resultados muito promissores. Porém, antes de avançarmos para testes em humanos necessitamos de novos estudos em laboratório para melhor caracterizar a forma como essa nova medicação realmente atua. Esses estudos serão realizados com células de seres humanos chamadas de condrócitos, que são as células presentes na cartilagem que reveste as extremidades dos ossos nas articulações. A artrose é uma doença que afeta os condrócitos. Essas células podem ser retiradas da cartilagem e mantidas vivas em laboratório, e os efeitos de novas medicações sobre essas células podem ajudar a prever que tipo de efeitos essas medicações podem ter na cartilagem e nas articulações em seres humanos.

Você está sendo convidado a participar desse estudo por que o médico que o acompanha lhe indicou uma cirurgia para colocação de uma prótese no seu joelho ou no seu quadril. Durante essa cirurgia as extremidades de seus ossos que estão acometidas por artrose serão retiradas e trocadas por próteses artificiais, que substituirão a sua articulação. Essas extremidades dos seus ossos seriam normalmente descartadas nesse tipo de procedimento. Caso você concorde em participar do estudo, os ossos que seriam descartados serão guardados e processados no laboratório de cultura de células. A cartilagem será separada do osso e utilizada para retirada dos condrócitos, que serão cultivados em meios adequados. A cartilagem retirada poderá também ser utilizada para extração de um composto chamado de glicosaminoglicano. O glicosaminoglicano é um dos principais componentes produzidos pelos condrócitos e que está presente na cartilagem. Esse glicosaminoglicano está alterado em pacientes com artrose, porém a natureza dessa alteração ainda não está totalmente definida. Um segundo objetivo desse estudo é entender como esse glicosaminoglicano está alterado na cartilagem de pacientes com artrose.

Você não será submetido a nenhum tratamento experimental ou procedimento desconfortável, nem a coleta de nenhum exame adicional em decorrência de sua participação nesse estudo. A radiografia que você já fez para poder realizar a cirurgia será solicitada para que possa ser avaliada por um membro de nossa equipe e posteriormente devolvida. Pode acontecer, contudo, de esta radiografia não estar adequada para uma avaliação precisa da sua articulação. Caso isso ocorra você será solicitado a realizar uma nova radiografia. Não são esperados nenhum desconforto ou risco em sua participação nesse estudo. Os riscos inerentes a cirurgia a que você irá se submeter devem ser discutidos com seu cirurgião e sua equipe.

Não há benefícios diretos para os participantes desse estudo. Trata-se de um estudo experimental que pode resultar no desenvolvimento futuro de novas medicações bem como numa melhor compreensão da artrose. Você não é obrigado a participar desse estudo. Você tem toda a liberdade para decidir se quer ou não participar. Caso você não concorde em participar do estudo, você não perderá nenhum direito, receberá qualquer punição ou terá seu tratamento alterado. Caso você concorde em participar do estudo, você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar, sem qualquer prejuízo paraseu tratamento na Instituição. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

As informações obtidas serão analisadas pelos participantes da equipe responsável pelo estudo. Não será divulgada a identificação de nenhum paciente. A equipe responsável por esse estudo se compromete a usar as informações e o material coletado somente para esta pesquisa. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Francisco Airton Castro da Rocha, que pode ser encontrado no endereço Rua Capitão Francisco Pedro, 1290- Rodolfo Teófilo; telefone(s) (85) 3366-8590 – Email: arocha@ufc.br

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br

Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se você concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo.

 Assinatura do paciente / Data / /
 representante legal

 Assinatura da testemunha Data / /

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

 Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

