

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

RONDINELLE RIBEIRO CASTRO

EFEITOS DA GALACTOMANANA DE *Cyamopsis tetragonolobus* NA
OSTEOARTRITE INDUZIDA POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO
ANTERIOR EM RATOS

FORTALEZA

2008

RONDINELLE RIBEIRO CASTRO

**EFEITOS DA GALACTOMANANA DE *Cyamopsis tetragonolobus* NA
OSTEOARTRITE INDUZIDA POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO
ANTERIOR EM RATOS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia

Área de concentração: osteoartropatias

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

FORTALEZA

2008

RONDINELLE RIBEIRO CASTRO

**EFEITOS DA GALACTOMANANA DE *Cyamopsis tetragonolobus* NA
OSTEOARTRITE INDUZIDA POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO
ANTERIOR EM RATOS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: osteoartropatias.

Aprovada em 15/04/2008

BANCA EXAMINADORA:

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

Profa. Dra. Judith Pessoa Andrade Feitosa
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Marcos Raimundo Vale
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. Paulo Antônio de Souza Mourão
Universidade Federal do Rio Janeiro - UFRJ

*«Vamos criar que é p'ra a
Glória de Deus brilhar»
(Zé Vicente)*

*Em memória de
Maria Helena,
nossa filha*

AGRADECIMENTOS

Toda a gratidão seja dada a Deus que, fazendo-se homem, nascido da Virgem, quis-nos ser solidário em todos os momentos;

A meus pais, Hilda e Valdique, presentes apesar da distância;

A Nubélia, esposa dedicada. Esta conquista também é dela;

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

À Profa. Judith Feitosa (Laboratório de Polímeros - UFC), que tanto tem colaborado conosco desde a época do mestrado. Mais ainda, fez nosso seu laboratório;

À Profa. Margarida Pompeu (Depto. de Patologia e Medicina Legal), pela análise histopatológica das cartilagens;

À Pablyana Cunha (Laboratório de Polímeros - UFC) pela frutuosa cooperação e amizade;

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, nas pessoas das professoras Elisabete Moraes e Helena Serra Azul. Agradeço com bastante alegria pela anuência concedida para o exercício do magistério superior;

Aos professores do Depto. de Fisiologia e Farmacologia (UFC), com destaque para: Eduardo Torres, Geanne Matos, Gisela Camarão, Marcus Valle e Vietla S. Rao;

Aos funcionários do Depto. de Fisiologia e Farmacologia, em especial Aura, Fernando, Haroldo e Joana;

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

Aos alunos de iniciação científica, André, Isabele, Marcos Paulo, Patrícia e Tomás, e à Natália;

Aos colegas de Pós-Graduação;

À Profa. Selma Jerônimo (UFRN), pela oportunidade de expor nossos resultados na VIII Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (Natal, RN, 2006);

Aos professores do Depto. de Química Orgânica e Inorgânica. Com carinho agradeço particularmente à Profa. Eliana Teixeira, pela generosidade em compartilhar suas experiências docentes;

À empresa Prozyn (SP), pela doação da enzima PROLAV 750 ®;

A Margareth, Nair e Suzana, pela elaboração das lâminas histológicas;

Ao Biotério Central (Pici) e Biotério Setorial (Depto. de Fisiologia e Farmacologia), pelo fornecimento dos animais;

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

EFEITOS DA GALACTOMANANA DE *Cyamopsis tetragonolobus* NA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR EM RATOS. Rondinelle Ribeiro Castro. **Orientador:** Prof. Dr. Fco. Airton Castro da Rocha.

No modelo de osteoartrite (OA) induzida por transecção do ligamento cruzado anterior em ratos (TLCA), havíamos demonstrado que a goma guar (GG), uma galactomanana extraída das sementes de *Cyamopsis tetragonolobus* goma guar, apresenta atividade analgésica em magnitude semelhante à exibida pelo Hilano G-F 20, um derivado do ácido hialurônico utilizado em terapia intra-articular da OA humana. Utilizando o referido modelo, objetivamos desenvolver um método bioquímico paramétrico para avaliação da lesão articular no referido modelo, e investigar o mecanismo para a analgesia e a eficácia condroprotetora da GG. Ratos Wistar submetidos à TLCA (grupo OA) foram sacrificados em diferentes períodos. A dor articular foi avaliada diariamente pelo teste de incapacitação para ratos, por até 70 dias. O lavado articular foi usado para determinação da liberação de NO. A cartilagem foi avaliada pela determinação do teor de condrotin-sulfato (CS) na matriz, além da avaliação da massa molar do mesmo. A lesão articular foi avaliada também por análise histopatológica, segundo os escores OARSI. Grupos falso-operados (sham) foram utilizados para comparação. Para estudos sobre a dor articular, animais do grupo OA receberam terapêuticamente indometacina (2mg/kg/d s.c.), meloxicam (6mg/kg/d i.p.), ou tadalafila (0,5mg/kg/d p.o.), do quarto ao sétimo dias. Morfina (200µg i. art.) foi administrada apenas no quarto dia, 30 min antes da avaliação da dor. Naloxona (500µg i. art.) foi administrada 15 min antes de morfina. Alendronato sódico (30 ou 240µg/kg s.c.) foi administrado profilaticamente três dias antes da indução, e repetido a cada três dias, até o sexto dia. GG original ou quimicamente modificada foi administrada em dose única no quarto dia (100µg/50µl i. art.). Galactose ou manose (500µg/50µl i. art.) foram co-administrados à GG original. Para avaliação sobre a lesão da cartilagem, GG (100µg/50µl i. art) foi administrada como dose única semanal, do 14º ao 63º dias. Animais não tratados (NT) receberam veículo (salina) nas respectivas vias. O grupo OA apresentou dor articular máxima durante a primeira semana, período no qual houve a maior liberação de NO. 70 dias após TLCA, o teor e a massa molar do CS da matriz da cartilagem mostraram-se ambos aumentados ($p < 0,05$). Importantes alterações histopatológicas foram encontradas no grupo OA nesse período. Indometacina, meloxicam, tadalafila e morfina reduziram significativamente a dor ($p < 0,05$), sendo o efeito desta última revertido por naloxona. Alendronato sódico preveniu a ocorrência da dor. As estruturas modificadas de GG não exibiram eficácia analgésica. Galactose, mas não manose, reverteu significativamente o efeito analgésico da GG não-modificada ($p < 0,01$). GG preveniu as alterações do CS da cartilagem, e reduziu significativamente a lesão histopatológica ($p < 0,05$). As alterações sofridas pelo CS parecem refletir o dano tecidual, validando tal metodologia para avaliação da lesão estrutural. A eficácia analgésica da GG decorre de um efeito farmacológico dependente de galactose. Mais ainda, demonstramos a eficácia condroprotetora *in vivo* para a GG, indispensável para sua validação como droga anti-arrtrósica.

Palavras-chave: osteoartrite, polissacarídeos, dor, cartilagem, gomas vegetais.

ABSTRACT

EFFECTS OF *Cyamopsis tetragonolobus* GALACTOMANNAN ON THE OSTEOARTHRITIS INDUCED BY ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT TRANSECTON IN RATS. Rondinelle Ribeiro Castro. **Orienter:** Prof. Dr. Fco. Airton Castro da Rocha.

Using the osteoarthritis (OA) model induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT) in rats, we have demonstrated that guar gum (GG), a galactomannan extracted from *Cyamopsis tetragonolobus* seeds, displays analgesic activity similar to Hylan G-F 20, a hyaluronate derivative used as local therapy in human OA. In the same model, we objective to develop a parametric biochemical method for joint lesion evaluation, and to investigate the mechanism for analgesia and the chondroprotective effect of GG. Wistar rats subjected to ACLT (OA group) were sacrificed at different endpoints. Joint pain was daily measured using the test for articular incapacitation in rats, until 70 days. Joint lavage was used for NO determination. Articular cartilage was evaluated by the chondroitin-sulfate (CS) content and determination of its molar weight. Histopathologic analysis using the OARSI score system was also performed. Sham-operated groups were used for comparison. In the studies of joint pain, OA groups received indomethacin (2mg/kg/d s.c.), meloxicam (6mg/kg/d i.p.), tadalafil (0.5mg/kg/d p.o.) between days 4 and 7. Morphine (200µg i.art.) was given at day 4 only, 30 min before the pain evaluation. Naloxone (500µg i. art.) was given 15 min prior morphine. Sodium alendronate (30 or 240µg i. art.) was given prophylactically, starting 3 days prior ACLT, and repeated at each 3 days, until day 6. Original or chemically modified GG (100µg/50µl i. art.) was given as a single dose at day 4. Galactose or mannose was co-administered (500µg/50µl i. art.) with original GG. In the study of chondroprotection, GG (100µg/50µl i. art.) was given once weekly, starting at day 14, during 8 weeks. Non-treated animals (NT) received vehicle (saline). OA animals presented maximal joint pain and NO release in the first week. Both CS content and molar weight were higher at day 70 ($p < 0.05$). At this endpoint, important histopathologic changes were found in the OA group. Indomethacin, meloxicam, tadalafil and morphine significantly reduced joint pain ($p < 0.05$). Naloxone reverted the effect of morphine. Alendronate prevented the joint pain development. Modified GG structures were unable to promote analgesia. The analgesic effect of unmodified GG could be reverted by galactose ($p < 0.01$), but not by mannose. GG treatment prevented the CS changes, and it reduced the histopathologic lesion ($p < 0.05$). CS changes seem to reflect the tecidual damage, and may be used as an index for the joint lesion. The analgesic efficacy of GG is due to galactose residues. In addition, the chondroprotective effect by GG was demonstrated. This is an important contribution to propose GG as an antiarthrosic drug.

Key words: osteoarthritis, polysaccharides, pain, cartilage, plant gums.

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Características estruturais dos principais glicosaminoglicanos	22
Tabela II: Sistema OARSI para avaliação da cartilagem OA - grau	48
Tabela III: Sistema OARSI para avaliação da cartilagem OA - estágio.....	48
Tabela IV: Características físico-químicas da goma guar após modificação estrutural	63
Tabela V: Avaliação indireta da massa molar do CS extraído da cartilagem femoral de grupos experimentais crônicos	71
Tabela VI: Análise histopatológica da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Transecção do Ligamento Cruzado Anterior.....	47
Figura 2: Animais deambulando no sistema para avaliação da incapacitação articular	47
Figura 3: Curva-padrão de condroitin-6-sulfato (C6S).....	53
Figura 4: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (6% w/v) de condroitin-4-sulfato (C4S) e condroitin-6-sulfato (C6S)	54
Figura 5: Perfil cromatográfico (HPSEC) de amostras comerciais (SIGMA) de condroitin-4-sulfato e condroitin-6-sulfato	55
Figura 6: Cinética da dor articular na osteoartrite por TLCA em ratos	59
Figura 7: Efeito terapêutico sistêmico de inibidores de ciclooxigenases sobre o pico de dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos.....	60
Figura 8: Efeito terapêutico local de agentes opióides sobre a dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos	60
Figura 9: Efeito terapêutico de tadalafila sobre o pico de dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos	61
Figura 10: Efeito profilático sistêmico de alendronato sódico sobre a dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos	61
Figura 11: Liberação articular de óxido nítrico na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos	62
Figura 12: Estruturas modificadas da goma guar.....	64
Figura 13: Efeito terapêutico local de preparações quimicamente modificadas de goma guar sobre a dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos.....	65
Figura 14: Reversão por galactose do efeito analgésico terapêutico da goma guar na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos	69
Figura 15: Proteólise enzimática da cartilagem femoral.....	70
Figura 16: Conteúdo de condroitin-sulfato presente na matriz da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos	71
Figura 17: Análises de correlação	72
Figura 18: Fotomicrografias da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos.....	74
Figura 19: Tratamento terapêutico intra-articular com goma guar previne alterações do condroitin-sulfato da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos.	75

Figura 20: Efeito terapêutico intra-articular da goma guar sobre as alterações histopatológicas na osteoartrite induzida por TLCA em ratos 76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAM	Adamalisinas
ADAMTS	Adamalisinas com domínio trombospondina
ANOVA	Análise de variância
Ca ²⁺	Íons cálcio
CD	<i>Cluster determinant</i>
CD44	<i>Cluster determinant 44</i> , receptor para o ácido hialurônico
cGMP	Guanosina-monofosfato cíclico
COX	Ciclooxigenase
CS	Condroitin-sulfato
C4S	Condroitin-4-sulfato
C6S	Condroitin-6-sulfato
DMOA	Drogas modificadoras da osteoartrite
EDTA	Sal sódico do ácido etilendiamino-tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
e. p. m.	Erro padrão da média
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
g	Aceleração da Gravidade
GAG	Glicosaminoglicanos
GG	Goma guar
cGMP	Guanosina-monofosfato cíclica
H&E	Hematoxilina & eosina
HPSEC	Cromatografia por exclusão de tamanho, de alta eficiência (<i>High-performance size-exclusion chromatography</i>)
i. art.	Via intra-articular
i. p.	via intra-peritoneal
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-13	Interleucina-13
IL-1ra	Antagonista fisiológico do receptor para IL-1
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida

LTB ₄	Leucotrieno B ₄
L-Arg	L-arginina
L-NMMA	N ^o -monometil-L-arginina
MLX	Meloxicam
MMP	Metaloproteases de matriz
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzido
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Ânion nitrato
NO ₃ ⁻	Ânion nitrato
NT	Não tratado
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OA	Osteoartrite
OARSI	Sociedade Internacional para Pesquisa em Osteoartrite (<i>Osteoarthritis Research Society International</i>)
ONOO ⁻	Ânion peroxinitrito
p	Nível de significância estatística
p. o.	Via oral (<i>gavage</i>)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide-gel electrophoresis</i>)
PBS	Salina tamponada em fosfato (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RMN	Ressonância magnética nuclear
s. c.	Via subcutânea
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamina
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento-beta
TIMP	Inibidores tissulares de metaloproteases de matriz
TLCA	Transecção do Ligamento Cruzado Anterior
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TSP _{pk}	Tempo de suspensão da pata de pico
w/v	massa por volume (<i>weight/volume</i>)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1. A OSTEOARTRITE	18
2. ESTRUTURAS ARTICULARES E OA	19
2.1. Cartilagem	19
2.2. Membrana sinovial	23
2.3. Alterações nas estruturas articulares pela OA	24
3. CITOCINAS E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA OA	26
4. DOR NA OA	30
5. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DA OA	32
6. TRATAMENTOS PARA A OA	34
7. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	37
MATERIAIS E MÉTODOS	39
1. ANIMAIS	40
2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS	40
3. DROGAS E REAGENTES	41
4. SOLUÇÕES	42
5. MODIFICAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICAS DO POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR	43
6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	44
6.1. Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA) (modificado de Stoop et al., 2001)	44
6.2. Registro da dor articular (modificado de Tonussi & Ferreira, 1992)	45
6.3. Manipulação farmacológica	45
A. Intervenções na fase inicial do modelo	45
B. Intervenções na fase crônica do modelo	46
6.4. Coleta do lavado e estruturas articulares	46
6.5. Extração e avaliação dos GAG da matriz da cartilagem femoral	49
A. Extração	49
B. Eletroforese em gel de agarose	49

	15
C. Eletroforese em gel de poliacrilamida	50
D. Análise de imagens	50
E. Cromatografia de alta eficiência por exclusão de tamanho (<i>HIGH PERFORMANCE SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY</i> , HPSEC).....	51
6.6. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	51
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
RESULTADOS	56
1. DOR ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (TLCA)	57
2. MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA POR INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE E ALENDRONATO SÓDICO NA DOR ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (TLCA)	57
3. LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA OSTEORRITE INDUZIDA POR TLCA EM RATOS	58
4. EFEITO DE ESTRUTURAS DE GOMA GUAR QUIMICAMENTE MODIFICADAS NA DOR ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TLCA: REVERSÃO DA ANALGESIA DA GOMA GUAR POR MONOSSACARÍDEOS	58
5. PROTEÓLISE DA CARTILAGEM FEMORAL	66
6. CARACTERIZAÇÃO DA LESÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR NA FASE CRÔNICA DA OSTEORRITE INDUZIDA POR TLCA	66
7. EFEITO CONDROPROTETOR DA GOMA GUAR EM TRATAMENTO TERAPÊUTICO INTRA-ARTICULAR NA FASE CRÔNICA DA OSTEORRITE INDUZIDA POR TLCA EM RATOS	67
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE	107
1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA (2004-2008).....	108

1.1. Artigos científicos em revistas internacionais indexadas	108
1.2. Propriedade Intelectual (Patente)	108
1.3. Trabalho completo em congresso internacional	108
1.4. Resumo em congressos	109
A. Congressos internacionais	109
B. Congressos nacionais	109
2. PRÊMIO	110
3. CONFERÊNCIA	111
ANEXOS	112
1. DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO PELO CEPA-UFC	113
2. ARTIGOS CIENTÍFICOS EM REVISTAS INTERNACIONAIS INDEXADAS ...	114

Introdução

1. A OSTEOARTRITE

O Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology*) define a osteoartrite (OA), conhecida também por artrose, como “um grupo heterogêneo de condições que produzem sinais e sintomas associados à integridade defectiva da cartilagem articular e a alterações nas margens do osso subcondral” (ALTMAN *et al.*, 1986). Pode-se acrescentar a essa definição a afetação da junta inteira, incluindo ligamentos, membrana sinovial e músculos periarticulares (KUETTNER & GOLDBERG, 1995).

Por sua elevada prevalência, a OA é conhecida como a mais comum osteoartropatia humana, e constitui uma das principais causas de morbidade na população idosa, fato que se associa a um aumento nos custos sociais. Estima a Organização Mundial de Saúde que 40% dos adultos acima de 70 anos sejam portadores de OA de joelhos, sendo que 80% desses apresentam limitação de movimentos e 25% encontram-se incapacitados para o desempenho das principais atividades quotidianas (BROOKS, 2002). Nos Estados Unidos, a OA é a segunda maior causa de incapacidade ocupacional em homens acima de 50 anos, sendo superada apenas pela doença coronariana (LAWRENCE *et al.*, 1998) e responde por um número de internações hospitalares maior que aquelas decorrentes da artrite reumatóide (DENISSON & COOPER, 2003). No Brasil, entre janeiro e outubro de 2005, a OA responsável por 260.078 benefícios concedidos pelo Instituto Nacional do Seguro Social, cifra que abrange 18,6% do total de concessões do período (BOCATO, 2005). Em face de sua repercussão sobre a Saúde Pública, a OA tornou-se importante foco nos eventos da *Década do Osso e da Articulação* (2001).

Apesar de a OA ter sido classicamente qualificada como uma patologia degenerativa própria do envelhecimento, mediante uso e desgaste da articulação, as abordagens recentes consideram-na uma doença inflamatória e de intensa atividade metabólica (ATTUR *et al.*, 2002), resultante tanto de eventos mecânicos quanto biológicos, que desequilibram o acoplamento normal entre a degradação e a síntese dos componentes da matriz extracelular da cartilagem e do osso subcondral por suas células constituintes. A doença pode ser iniciada por múltiplos fatores, incluindo fatores genéticos, metabólicos e traumáticos, que culminam em alterações morfológicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas tanto nas células quanto na matriz extracelular (SHARMA, KAPPOR & ISSA, 2006). Embora possa afetar qualquer articulação, costuma acometer de forma mais freqüente joelhos, quadril, mãos e coluna, de modo poliarticular.

A degeneração da cartilagem articular constitui a alteração mais característica e importante da OA. O surgimento de fissuras verticais (fibrilação) da matriz, ulcerações e exposição do osso subcondral são os principais fenômenos ocorridos, acompanhados de hipertrofia óssea, com formação de osteófitos. Registros radiográficos incluem, além de osteofitose, estreitamento do espaço articular, esclerose e cistos subcondrais, e anormalidades no contorno ósseo (HOCHBERG *et al.*, 1989). Em estágios clínicos da doença, são observadas alterações na membrana sinovial, normalmente associadas a reações inflamatórias (PELLETIER, 2004).

A história natural da OA não está completamente definida, e sua evolução é variável. Estima-se que, na metade do número de portadores, ela seja assintomática (HOCHBERG *et al.*, 1989). Quando sintomático, o paciente geralmente queixa-se de dor recorrente ou constante e incapacidade funcional tendendo lentamente à piora, ao longo dos anos. Entretanto, tal comportamento está longe de constituir uma tendência universal: a sintomatologia em muitos pacientes permanece estável, ou pode até reduzir-se com o tempo (DIEPPE *et al.*, 2000; PERTERS *et al.*, 2005) e a progressão do dano estrutural nem sempre acompanha a piora clínica (LANE *et al.*, 2004). Quando esta ocorre, costumam estar associados fatores psicossociais, tais como: nível educacional, depressão, ansiedade, capacidade de lidar com a doença e co-morbidades (CREAMER, 2004).

2. ESTRUTURAS ARTICULARES E OA

2.1. Cartilagem

A cartilagem articular normal é um tecido de reduzida celularidade, no qual os condrócitos ocupam apenas de 1 a 2% do volume total. Sua abundante matriz extracelular apresenta grau de hidratação médio de 70%. Dos demais componentes, predominam fibras colágenas e um proteoglicano específico chamado agregano (GOLDRING & GOLDRING, 2005). Histologicamente, a cartilagem exhibe quatro regiões (zonas) distinguíveis quanto à orientação (polarização) dos condrócitos e composição da matriz: superficial ou tangencial, média ou de transição, profunda ou radial, e a cartilagem calcificada.

A rede de colágeno perfaz 50 a 60% do peso seco da cartilagem. O colágeno tipo II é o mais abundante (HEINEGARD & OLDBERG, 1989), além da ocorrência minoritária de fibras tipos VI, IX, X, XI, XII e XIV (GOLDRING & GOLDRING, 2005). O colágeno tipo II forma o arcabouço das fibrilas, enquanto que o colágeno tipo XI encontra-se no interior das mesmas, sendo fundamental para sua gênese. O colágeno tipo IX situa-se na superfície das fibrilas, unindo-as entre si, bem como participando de interações com os proteoglicanos e demais elementos da matriz (VELOSA, TEODORO & YOSHINARI, 2003). Na zona superficial, as fibras colágenas e os condrócitos se dispõem paralelamente à superfície. Em camadas mais profundas, tais fibras se dispõem de modo aleatório, e sustentam unidades verticais contendo condrócitos dispostos em colunas. Nas camadas basais, as fibras colágenas estão praticamente verticais, e se inserem na superfície do osso subcondral (SILVER, BRADICA & TRIA, 2001a). A ligação cruzada das fibras de colágeno tipo II restringe o movimento molecular e o número de sítios disponíveis para hidratação (BANK, 2000).

O agrecano é uma macromolécula complexa, formada por um esqueleto protéico (*core protein*), ao qual se inserem as cadeias laterais de glicosaminoglicanos (GAG), que perfazem de 80 a 90% de seu peso. O cerne protéico consiste em três domínios globulares (G1, G2 e G3) e três domínios inter-globulares: os domínios localizados entre G2 e G3, aos quais se ligam keratam-sulfato e condroitim-sulfato, na quantidade respectiva de cinquenta e cem cadeias, e um pequeno domínio interglobular entre G1 e G2. No domínio G1, ocorre a interação a uma proteína de ligação (*link protein*) (LUO *et al.*, 2000; BALI *et al.*, 2001). Duzentas ou mais moléculas de agrecano podem ligar-se lateralmente a uma longa cadeia de ácido hialurônico, montando um agregado cujo peso molecular pode ultrapassar cem milhões de daltons (WATANABE, YAMADA & KIMATA, 1998).

Os GAG são componentes polissacarídicos ubíquos das membranas celulares e da matriz extracelular, ocorrendo filogeneticamente desde os espongiários (DIETRICH *et al.*, 2004). Apresentam-se como moléculas de diferentes tamanhos, exibindo uma dispersão típica em eletroforese em gel de poliacrilamida (DIETRICH & DIETRICH, 1976). Entre as diversas funções que desempenham, constam: controle do equilíbrio hidro-eletrolítico, integridade estrutural celular, cicatrização, divisão celular, resistência a infecções, transporte de cálcio mitocondrial e atividade anti-trombogênica (OBRIND *et al.*, 1975; KANWAR, LINKER AND FARQUHAR, 1980). Fazem parte desse grupo de macromoléculas: heparina, heparam-sulfato, keratam-sulfato, condroitins sulfatados (CS), dermatam-sulfato e ácido hialurônico, cujas características estruturais encontram-se resumidas na tabela I. Na cartilagem humana, o padrão de sulfatação dos dissacarídeos dos condroitins varia segundo a idade do indivíduo, a

topografia da superfície articular e a zona da cartilagem examinada. Camadas profundas da cartilagem imatura possuem cerca de quatro vezes mais resíduos sulfatados que regiões mais superficiais do tecido. Os condroitins sulfatados são os GAG mais abundantes na cartilagem, predominando, no tecido maduro a sulfatação na posição 6, enquanto o tecido jovem, a sulfatação na posição 4 (BAYLISS *et al.*, 1999). As carboxilas dos ácidos glicurônico e idurônico estão ionizadas em pH fisiológico e, junto aos grupos sulfato, conferem às cadeias polissacarídicas uma forte carga negativa global (BALI *et al.*, 2001). O ácido hialurônico, além de constituir os agregados da matriz orgânica da cartilagem, é encontrado livre no líquido sinovial, contribuindo para sua viscoelasticidade característica: lubrificante em movimentos lentos e absorvedora de impactos em movimentos rápidos (SCOTT *et al.*, 2000).

A integridade da rede colágena e dos agreicanos é essencial para as propriedades biomecânicas da cartilagem. O excesso de cargas negativas no agreicano atrai um número igual de cátions móveis (em especial o íon sódio), a fim de manter a neutralidade elétrica. Esses, por sua vez, provocam uma pressão osmótica de hidratação, que é contrabalançada pela tensão na rede colágeno-proteoglicana e pela sobrecarga da articulação (SETTON *et al.*, 1999). Quando uma pressão é aplicada à cartilagem, as moléculas de água são forçadas a sair das regiões próximas dos grupos sulfato e carboxilato. As cargas negativas, ao se aproximarem, repelem-se mutuamente, aumentando a pressão de hidratação, atraindo novamente as moléculas de água ao ser minimizada a pressão externa (CAPLAN, 1984).

Na matriz extracelular encontram-se ainda outros proteoglicanos (decorina, biglican, perlecan e versican), uma proteína oligomérica (*cartilage oligomeric matrix protein*, COMP), além de tenascina, fibronectina, dentre outros componentes (GOLDRING & GOLDRING, 2005). A matriz não desempenha apenas um papel estrutural, mas seus constituintes interagem com receptores em condrócitos (integrinas, CD44 e anexinas), regulando sua função (WANG *et al.*, 2001).

A matriz imediatamente adjacente à das células, dita pericelular, é rica em agreicano, mas possui relativamente poucas fibras colágenas. Os agregados proteoglicanos se ligam à célula por meio do ácido hialurônico, e possivelmente também do condroitin-sulfato, via receptores CD44. Contígua à matriz pericelular está a territorial, formada por uma rede de fibras colágenas que envolvem a célula ou grupos de células. O colágeno tipo II nessa região interage com processos citoplasmáticos celulares via moléculas de membrana, como anexina V (ou ancorina CII) e integrina $\alpha 2\beta 1$. Esses dois compartimentos definem a matriz extracelular sob a qual os condrócitos exercem controle metabólico ativo, uma vez que a matriz inter-territorial, mais distante das células, é pouco reativa (WANG *et al.*, 2001).

Tabela I: Características estruturais dos principais glicosaminoglicanos.

Glicosaminoglicano	Massa molar média (g/mol)¹	Monossacarídeos²	Posição do sulfato	Ligação
condroitin-4-sulfato	2 – 5 x 10 ⁴	N-acetilgalactosamina	4	β (1→4)
		ácido glicurônico	-	β (1→3)
dermatan-sulfato	2 – 5 x 10 ⁴	N-acetilgalactosamina	4	β (1→4)
		ácido glicurônico	-	β (1→3)
		ácido idurônico	-	β (1→3)
condroitin-6-sulfato	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)
keratan-sulfato	1 – 3 x 10 ⁴	N-acetilglicosamina	6	β (1→3)
		Galactose	-/6	β (1→4)
heparan-sulfato	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)

Fonte: JERÔNIMO, 1994.

¹A massa molar média varia neste intervalo, segundo a fonte dos glicosaminoglicanos.

²Monossacarídeos em configuração D, exceto ácido idurônico (configuração L).

A homeostase da cartilagem é mantida pelo equilíbrio entre a neossíntese e lise enzimática de seus componentes. Os condrócitos são capazes de secretar enzimas líticas, tais como metaloproteases de matriz (MMP) e adamalinas (ADAM). As MMP são endopeptidases capazes de degradar, em pH neutro, uma variedade de componentes protéicos da matriz, incluindo colágeno, proteoglicanos, fibronectina e laminina (WOESSNER, 1991). As MMP são produzidas como pró-enzimas, tornando-se ativas no meio extracelular mediante clivagem enzimática do peptídeo localizado na porção N-terminal, por proteases dependentes de serina ou cisteína (NAGASE, 1997). Da família das MMP, as colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) e as estromelinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) desempenham papéis primordiais na degradação da matriz extracelular, clivando respectivamente colágeno e proteoglicanos (PELLETIER, 2004). Ao lado da secreção de MMP, os condrócitos produzem os inibidores tissulares de metaloproteases (TIMP), proteínas estáveis capazes de interagir não covalentemente ao sítio ativo das MMP, em uma relação estequiométrica de um para um. Quatro TIMP foram identificadas. TIMP-1 e TIMP-2 estão presentes na cartilagem articular. TIMP-3 foi originalmente encontrada em associação com a matriz extracelular. TIMP-4 foi encontrada apenas em células cancerosas (LECO *et al.*, 1994; BREW *et al.*, 2000).

As ADAM são enzimas intrínsecas da membrana constituídas por um domínio para desintegrina e outro típico das metaloproteases, fato que lhes conferem essa denominação (*A Desintegrin And Metalloproteinas*). Deste grupo, a ADAM-17, conhecida como TACE (*Tumour-necrosis Factor-alpha Converting Enzyme*) é de particular importância em artropatias, por ser responsável pela clivagem da pró-forma do Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) à sua forma ativa (MOSS *et al.*, 1997). Na família das ADAM, novos membros, com domínio adicional trombospondina e ausência de domínio transmembrana, foram caracterizados. Tais enzimas secretadas são conhecidas pela sigla ADAMTS. Duas delas, ADAMTS-4 e ADAMTS-5/ADAMTS-11 (sinônimos), foram identificadas respectivamente como as agrecanases 1 e 2 (TORTORELLA *et al.*, 2000).

2.2. Membrana sinovial

Denomina-se sinóvia a delicada estrutura que reveste internamente a articulação, em contato com o fluido sinovial. Ela compreende tanto a camada celular superficial (membrana sinovial) quanto o tecido sub-sinovial. A membrana sinovial, impropriamente

chamada assim, constitui-se de duas a cinco camadas celulares que repousam sobre uma matriz, sem o auxílio de lâmina basal. Seus tipos celulares componentes, os sinoviócitos, têm sido tradicionalmente classificados como células tipo A (macrófagos-símile) ou tipo B (fibroblastos-símile) (EDWARDS, 2003). O tecido sub-sinovial classifica-se em adiposo, fibroso ou areolar. Este último é o mais especializado dos três. Normalmente a sinóvia encontra-se enrugada, formando dobras que se desfazem por distensão leve. Capilares sanguíneos e mastócitos estão presentes entre ou sob as células sinoviais. Mais profundamente no tecido encontram-se vênulas e arteríolas (WILKINSON & EDWARDS, 1989).

O espaço articular encontra-se preenchido pelo fluido sinovial, obtido por ultra-filtração plasmática pelos capilares sinoviais e posterior adição de ácido hialurônico pelos sinoviócitos tipo B (EDWARDS, 2003). Dentre suas funções, destacam-se a lubrificação da cartilagem articular durante o movimento, bem como sua nutrição. Uma vez que a cartilagem articular é avascular, não podendo, portanto, conferir aporte nutricional aos condrócitos, postula-se que nutrientes presentes no fluido possam difundir-se pela matriz tipicamente hidratada da cartilagem, alcançando enfim as células (EDWARDS, 2003).

2.3. Alterações nas estruturas articulares pela OA

As alterações histopatológicas encontradas na articulação artrósica são inicialmente focais e localizadas principalmente em áreas de maior sobrecarga mecânica na superfície articular. Por exemplo, a desnaturação da rede de colágeno tipo II inicia-se na superfície, especialmente nas regiões pericelulares, e alcança as zonas mais profundas da cartilagem conforme a evolução da doença (HOLLANDER *et al.*, 1995). Progressivamente, as lesões histopatológicas se estendem horizontalmente, aumentando em gravidade até resultar em áreas de perda completa do tecido e exposição do osso subcondral.

A hiper-hidratação da cartilagem é um evento inicial na OA e proporcional ao dano sobre a rede de colágeno (BANK, 2000). As fibras colágenas apresentam tanto o comprimento quanto a constante elástica reduzidos, limitando a capacidade da cartilagem em absorver energia elástica durante a locomoção (SILVER, BRADICA & TRIA, 2001b). Os próprios condrócitos participam ativamente no dano da rede colágena: as células da zona superficial apresentam marcação imunohistoquímica para colagenases (TETLOW, ADLAM

& WOOLLEY, 2001). As MMP-1 e MMP-13 (colagenases 1 e 3, respectivamente) podem ser encontradas na própria matriz (WU *et al.*, 2002).

A lesão da cartilagem articular progride num ambiente de catabolismo e anabolismo reparador simultâneos. A síntese de proteoglicanos, colágeno, proteínas não colagenosas e DNA está significativamente aumentada na cartilagem artrósica até os estágios mais avançados, explicando a lenta progressão do dano da cartilagem. A destruição dos elementos da matriz envolve a liberação de colagenases, agrecanases, plasmina e catepsina B, dentre outras enzimas. Os fenômenos de degradação e síntese são modulados por citocinas, em particular Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-1 (IL-1), fatores de crescimento e TIMP (MORT & BILLINGTON, 2001; DICESARE & ABRAMSON, 2005). O desequilíbrio na síntese de TIMPs e MMPs, em prol dessas últimas, contribui para a suspensão da homeostasia. A concentração da MMP-3 (estromelisina) no fluido sinovial de pacientes pode superar aquela para seus inibidores tissulares (ISHIGURO *et al.*, 1999). Está demonstrado também que a expressão de MMP-3 se correlaciona à expressão de agrecano na cartilagem OA, sugerindo haver uma regulação comum compensatória entre metabolismo anabólico e catabólico (STOVE *et al.*, 2001).

A depleção de proteoglicanos da cartilagem (AIGNER & MCKENNA, 2002) é outro importante evento, sendo mais intensa nas áreas de células apoptóticas (HASHIMOTO, 1998), fazendo surgir concentrações elevadas de GAG no fluido sinovial (POOLE *et al.*, 1994), como produtos de degradação das moléculas de agrecano liberados de seus locais originais na matriz. Normalmente, a síntese de proteoglicanos encontra-se reduzida (MARTIN & BUCKWALTER, 2002), apesar de ser comum um aumento na sua síntese nos estágios iniciais da doença (PINALS, 1996; LOHMANDER *et al.*, 1999). Entretanto, a neossíntese de proteoglicanos produz moléculas qualitativamente distintas daquelas da cartilagem adulta normal, incluindo alterações tanto na composição e distribuição dos GAG, quanto no tamanho do cerne protéico e sua capacidade de ligar-se ao ácido hialurônico (MANKIN & LIPPIELLO, 1971; MALEMUD, 1991; AIGNER & MCKENNA, 2002). Existe na cartilagem artrósica um incremento nas concentrações de condroitin-4-sulfato (C4S), em detrimento àquelas de condroitin-6-sulfato (C6S) e keratan-sulfato (MANKIN & LIPPIELLO, 1971), sugerindo uma síntese compensatória de componentes típicos de uma cartilagem imatura. No fluido sinovial de pacientes, uma diminuição na razão C6S/C4S concorda com alterações da cartilagem (ISHIGURO *et al.*, 1999).

Evidências recentes apontam para a importância da inflamação da membrana sinovial na progressão das lesões da cartilagem. Fragmentos de matriz cartilaginosa liberados

por proteólise provocariam inflamação sinovial, refletindo em posterior degradação da cartilagem, à maneira de um ciclo vicioso (PELLETIER, 2004). De fato, a fagocitose de detritos de cartilagem por células sinoviais CD68+ (macrófagos-símile) já foi relatada (SAITO *et al.*, 2002). O tecido sinovial artrósico manifesta características inflamatórias típicas, tais como: espessamento da camada interna, formação de agregados linfóides e angiogênese (HAYWOOD *et al.*, 2003). A infiltração de Linfócitos T CD4+ (auxiliares) está presente, com prevalência de células Th1 (produtores de Interferon- γ) (ISHII *et al.*, 2002). Além disso, IL-1 α , IL-1 β e TNF- α são produzidos na sinóvia artrósica (SMITH *et al.*, 1997). Conforme será discutido adiante, citocinas pró-inflamatórias participam nos mecanismos de lesão da cartilagem na osteoartrite.

Citocinas pró-inflamatórias (discutidas em seguida), radicais livres e proteases podem adversamente afetar o metabolismo dos sinoviócitos B, provocando a síntese de ácido hialurônico com um peso molar alterado (BALAZS, BRILLER & DENLINGER, 1981; DAHL *et al.*, 1985). Mais ainda, o ácido hialurônico pode ser fragmentado por radicais livres derivados do oxigênio (GREENWARD, 1991) ou intracelularmente por hialuronidases ou demais glicosidases presentes tanto em sinoviócitos quanto em leucócitos na sinóvia (STEPHENS *et al.*, 1975; STAIR-NAWY, CSOKA & STERN, 1999). A diminuição no tamanho da molécula de ácido hialurônico e sua diluição, causada pelo aumento da permeabilidade vascular sinovial, alteram as propriedades viscoelásticas do fluido sinovial na OA (BALAZS & DEHLINGER, 1985), comprometendo possivelmente a cartilagem por atritos excessivos.

3. CITOCINAS E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA OA

No ambiente articular, células residentes e migrantes são capazes de iniciar e/ou perpetuar uma resposta inflamatória. Linfócitos e macrófagos constituem importante fonte de citocinas, além dos sinoviócitos e do próprio condrócito. De fato, citocinas pró-inflamatórias, tais como Interleucina-1 (IL-1) e Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α), participam na fisiopatologia da OA. IL-1 e o TNF- α são produzidos em sinóvias de pacientes com OA (SMITH *et al.*, 1997). Tanto a sinóvia quanto a cartilagem artrósicas expressam a protease ICE (Interleukin-1 β Converting Enzyme), que converte a pró-IL-1 β à sua forma ativa (SAHA *et al.*, 1999). O TNF- α pode ser ativado a partir de sua pró-forma por ação da TACE, presente

em tecidos artríticos (MOSS *et al.*, 1997). Em sinóvias OA, foi demonstrado um déficit na síntese do antagonista fisiológico do receptor para IL-1 (IL-1Ra) (FERNANDES, MARTEL-PELLETIER & PELLETIER, 2002). *In vitro*, a IL-1 aumenta de maneira dose-dependente a proporção de condrócitos apoptóticos em tecidos humanos normais ou artróticos (HERAUD, HERAUD AND HARMAND, 2000), inibe a síntese de proteoglicanos por condrócitos de cartilagem de camundongos (SCHARSTUHL *et al.*, 2002), potencializa a perda de proteoglicanos de cartilagem bovina por injúria mecânica, fenômeno também provocado pelo TNF- α (PATWARI *et al.*, 2003), promove a expressão de MMP-1, MMP-3, MMP-13 e ADAMTS-4 em condrócitos humanos (BAU *et al.*, 2002) e inibe a sulfatação de proteoglicanos, afetando preferencialmente o condroitin-6-sulfato (HICKERY & BAYLISS, 1998). O TNF- α suprime a síntese da proteína cerne do agrecano e a expressão de colágeno tipo II em condrócitos da cartilagem de ratos (SEGUIN & BERNIER, 2003), e induz a síntese de MMP-13 por condrócitos na OA humana (LIACINI *et al.*, 2003).

O Fator Transformador de Crescimento- β (TGF- β) e as interleucinas 4 e 13 (IL-4 e IL-13) parecem participar de mecanismos protetores na OA. TGF- β é capaz de inibir a redução da síntese de proteoglicanos induzida pela IL-1 em cultura de cartilagens de camundongos jovens (SCHARSTUHL *et al.*, 2002). A inibição *in vivo* do TGF- β exacerba a perda de proteoglicanos na osteoartrite experimental em camundongos (SCHARSTUHL *et al.*, 2003). A formação de osteófitos, que constitui um fenômeno anabólico característico na OA, parece ser mediada, ao menos em parte, pelo TGF- β . De fato, a inibição do TGF- β endógeno reduz a formação de osteófitos na osteoartrite experimental em camundongos (SCHARSTUHL *et al.*, 2003). A IL-4 foi testada *in vitro* em tecidos de pacientes de OA e mostrou suprimir a síntese de IL-1 β e TNF- α . Em membranas sinoviais artróticas estimuladas com lipopolissacarídeo, a IL-13 inibiu a síntese de IL-1 β e TNF- α , enquanto aumentou a produção de IL-1Ra (FERNANDES, MARTEL-PELLETIER & PELLETIER, 2002).

As prostaglandinas são produtos lipídicos derivados do ácido araquidônico, em uma via metabólica iniciada pelas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), enzimas semelhantes em homologia (60%) e peso molecular (71 kDa). A COX-1, constitutiva, participa em funções fisiológicas homeostáticas, como a manutenção da função renal normal e a integridade da mucosa gástrica. A COX-2 está expressa na resposta inflamatória após indução por citocinas e fatores de crescimento (revisto em VANE *et al.*, 2000). Existe ainda uma variante expressa no tecido cardíaco e no córtex cerebral humano, denominada ciclooxigenase-3 (COX-3), que foi identificada como um *splicing* alternativo produto do gene

da COX-1, por conservação do íntron 1 no RNA mensageiro (mRNA) (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

Concentrações elevadas de prostaglandina E₂ (PGE₂) estão presentes no líquido sinovial de pacientes com OA (EGG, 1984). O tecido sinovial parece ser a principal fonte de eicosanóides no líquido sinovial. Sabe-se que células sinoviais produzem PGE₂ quando estimuladas com IL-1 *in vitro* (GILMAN *et al.*, 1988). Nas inflamações sinoviais, ocorre um aumento da expressão da COX-2, predominantemente nas células do endotélio vascular, no infiltrado mononuclear e nos fibroblastos sub-sinoviais. Além disso, as células da membrana sinovial expressam constitutivamente a COX-1 (CROFFORD, 1999).

Existem controvérsias na literatura quanto ao papel das prostaglandinas no metabolismo ósseo e da cartilagem. A PGE₂ estimula o processo de diferenciação de condrócitos, observado pela expressão de mRNA para o colágeno tipo II (MIYAMOTO, 2003). As prostaglandinas, em especial a PGE₂, estimulam a reabsorção óssea via atividade de osteoclastos (RAISZ, 1999). As prostaglandinas também promovem replicação e diferenciação de osteoblastos (WOODIEL, FALL & RAISZ, 1996), de modo que a inibição da síntese de prostaglandinas suprime a resposta osteogênica a estímulos mecânicos (CHAMBERS *et al.*, 1999). Entretanto, foi demonstrado que a PGE₂ induz apoptose de condrócitos *in vitro* (MIWA *et al.*, 2000) e sensibiliza condrócitos artrósicos humanos à morte celular induzida por óxido nítrico, fenômeno que se dá via ativação do gene da COX-2 e subsequente produção endógena aumentada de PGE₂ (NOTOYA *et al.*, 2000), por um mecanismo ainda não claramente definido. Vale ressaltar que nem todas as PG são pró-inflamatórias. Alguns estudos demonstraram que a 15-desoxi-12,12-Prostaglandina J₂, um metabólito da prostaglandina D₂, apresenta propriedades antiinflamatórias, inibindo inclusive a produção de óxido nítrico (NO) e MMP-13 induzidos por IL-1 (revisto em FAHMI, PELLETIER & MARTEL-PELLETIER, 2002) e a expressão de COX-2 em condrócitos humanos (FAHMI *et al.*, 2002).

Além das prostaglandinas, os leucotrienos, derivados do ácido araquidônico pela via das lipooxigenases, têm sido associados à lesão articular em osteoartrose experimental (LAUFER, 2003). O leucotrieno B₄ (LTB₄), que ativa neutrófilos e macrófagos, produzindo espécies reativas de oxigênio, é capaz de estimular a produção de citocinas, tais como IL-1, IL-6 e IL-8 (LAUFER, 2003). *In vitro*, demonstrou-se o LTB₄ estimula a liberação de a liberação IL-1β e TNF-α pela sinóvia artrósica (HE *et al.*, 2002). Em recente revisão do assunto, admite-se que bloqueadores duais de ciclooxygenases e lipoxigenases podem ter mais eficácia em OA, quando comparados a inibidores apenas das primeiras (LAUFER, 2003). De

fato, o licofenolone, uma droga com essas características, reduziu a progressão da lesão estrutural em um modelo canino de OA (MOREAU *et al.*, 2006).

O NO é uma molécula ímpar em elétrons, meta-estável, produzida a partir da oxidação estereoespecífica da L-arginina pelo oxigênio molecular, por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), que utilizam NADPH e FAD como co-fatores (MONCADA & PALMER, 1990). Nos fluidos orgânicos, a oxidação seqüencial do NO forma os ânions nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (IGNARRO, 1990). Três isoformas da NOS foram descritas: NOS endotelial (eNOS ou NOS1) e neuronal (nNOS ou NOS3), ambas expressas constitutivamente; e a NOS induzida (iNOS ou NOS2), detectada em algumas células após estimulação por agentes inflamatórios (FUKUTO & CHAUDHURI, 1995). As isoformas constitutivas, que levam à produção efêmera de picomoles de NO, são dependentes do complexo cálcio-calmodulina, estando ativas sob elevadas concentrações de Ca^{2+} citossólico. As NOS constitutivas estão presentes no endotélio vascular, plaquetas e sistema nervoso, participando primariamente na modulação de processos fisiológicos homeostáticos, tais como o relaxamento vascular e regulação da pressão sanguínea, a agregação plaquetária e a neurotransmissão. Por outro lado, a iNOS pode ser induzida em uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, células endoteliais, hepatócitos e células da glia, produzindo NO em grandes quantidades (nanomols) por longos períodos de tempo. A iNOS possui um sítio com elevada afinidade pelo complexo cálcio-calmodulina, de modo que essa enzima já se encontra ativa mesmo em reduzidas concentrações intracelulares de Ca^{2+} . Citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2 e TNF- α) podem induzir a expressão de iNOS, ao passo que citocinas antiinflamatórias (IL-4 e IL-13) e glicocorticóides a inibem (OSWALD *et al.*, 1992; MCCALL *et al.*, 1991; KENGATHARAN, DE KIMPE & THIEMERMANN, 1996). A rigor, considera-se que o NO produzido após a indução da iNOS participa em processos fisiopatológicos.

Sinoviócitos e condrócitos são também capazes de sintetizar o NO. A produção por estes últimos contribui de forma significativa para a quantidade total de NO gerada na cavidade articular durante artropatias inflamatórias (STEFANOVIC-RACIC, STADLER & EVANS, 1993).

Muitas evidências apontam para a participação do NO na fisiopatologia da OA. Concentrações elevadas de nitrito foram determinadas no soro e no fluido sinovial de pacientes (FARRELL *et al.*, 1992). *In vivo*, nosso grupo observou concentrações elevadas de nitrito no lavado articular e expressão sinovial aumentada da iNOS em um modelo de OA em ratos (CASTRO *et al.*, 2006). Condrócitos artrósicos humanos respondem à pressão de

cisalhamento contínua liberando NO de modo tempo-dependente (LEE *et al.*, 2002), bem como espontaneamente o fazem por uma enzima semelhante à nNOS (AMIN *et al.*, 1995). O NO tem sido considerado um indutor de apoptose de condrócitos (BLANCO *et al.*, 1995), provavelmente por sua combinação com o ânion superóxido (O_2^-) e formação do ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) (DEL CARLO *et al.*, 2002). *In vitro*, cartilagens artrósicas exibem declínio no conteúdo de proteoglicanos de maneira tempo-dependente, evento que pode ser atenuado por inibidores da síntese de NO (COHEN *et al.*, 2000). As células de tais cartilagens são refratárias ao estímulo de síntese de proteoglicanos pelo Fator de Crescimento Insulina-símile I (IGF-I, *Insulin-like Growth Factor*), mas adquirem responsividade quando tratadas com L-NMMA, inibidor da NOS, ou com inibidores de proteínas quinases dependentes de guanosina-monofosfato cíclico (cGMP) (STUDER *et al.*, 2003). O NO ainda está implicado na inibição da síntese de agregano por condrócitos de coelhos em cultura induzida pela IL-1 (TASKIRAN *et al.*, 1994) e, como o peroxinitro, reduz a atividade mitocondrial e a formação de adenosina-trifosfato em células humanas, fato que pode justificar a inibição da síntese de colágenos e proteoglicanos (JOHNSON *et al.*, 2000). Observou-se que a inibição da iNOS reduz a progressão da OA experimental (PELLETIER *et al.*, 1998). O NO contribui para a lesão da cartilagem também por aumento da expressão de MMP. O L-NMMA inibe, por exemplo, a expressão da MMP-9 induzida pela IL-1 (SASAKI *et al.*, 1998) e deprime a atividade de estromelina e colagenase em explantes bovinos e humanos (MURRELL, JANG & WILLIAMS, 1995).

4. DOR NA OA

A dor articular é a manifestação clínica mais relevante da OA, constituindo o principal motivo para a assistência médica. Dada a inexistência atual de terapêuticas eficazes capazes de modificar sua evolução natural (ver adiante), o tratamento da OA é essencialmente o tratamento da dor.

Uma das dificuldades na interpretação do fenômeno doloroso na OA é a falta de correlação observada entre lesão estrutural e sintoma. Sabe-se que portadores de alterações radiográficas compatíveis com OA estão mais predispostos a apresentar dor. Contudo, nem todos se queixam de dor: no estudo NHANES-I (DAVIS *et al.*, 1992), realizado com indivíduos com idades entre 65 e 74 anos, 8,8% dos portadores de radiografia normal

relataram dor no joelho. Esse número sobe para 20,4% naqueles com alterações radiográficas grau 1 de Kellgren-Lawrence, 36,9% naqueles em grau 2 e 60,4% nos graus 3 e 4. Torna-se um desafio, então, entender por que muitos pacientes, mesmo com grave dano articular, permanecem assintomáticos (DIEPPE & LOHMANDER, 2005).

Os mecanismos envolvidos na gênese da dor articular na OA são pouco compreendidos. Carecendo de inervação, a cartilagem, a rigor, não pode ser fonte da dor. Fibras nervosas aferentes estão presentes na cápsula articular, sinóvia, periósteo e osso subcondral, ligamentos e tendões (ver GRUBB, 2004; FELSON, 2005). Cerca de 20% dessas fibras são mielinizadas, majoritariamente pertencentes ao grupo III (fibras A δ) de nociceptores finamente mielinizados, enquanto um número relativamente pequeno de fibras do tipo II (A β), com maior diâmetro e baixos limiares de ativação, também inerva a articulação. Os demais 80% são fibras não-mielinizadas, distribuídas equitativamente em fibras que pertencem ao grupo IV (tipo C) e eferentes simpáticos. Fibras dos grupos III e IV constituem os nociceptores primários de elevado limiar, não ativados por estímulos do cotidiano. As fibras de baixo limiar do tipo II estão associadas ao movimento e propriocepção e, sob inflamação, apresentam alterações agudas e transitórias em resposta à manipulação da articulação. Na Inflamação, as fibras dos grupos III e IV passam tanto a apresentar atividade espontânea, como tornam-se responsivas a estímulos mecânicos externos aos quais eram previamente insensíveis.

O sistema nervoso atua não somente como receptor passivo na nocicepção surgida em um tecido lesionado, mas participa na persistência da dor via alterações funcionais ou neuroplasticidade (WOOLF & SALTER, 2000), desencadeando mecanismos de sensibilização periférica e central persistentes cronicamente. Durante a inflamação aguda, prostaglandinas, bradicinina, e o fator de crescimento neural (*Nerve Growth Factor*, NGF) modificam a sensibilidade dos receptores e reduzem o limiar de ativação dos canais iônicos. Esses mediadores também podem levar a alterações transcricionais de longo prazo, que envolvem aumento na produção de receptores, canais iônicos, neurotransmissores e neuromoduladores (KIDD & URBAN, 2001). Anticorpos contra TNF- α e IL-1 β (KIDD, PHOTIOU & INGLIS, 2004) promovem antinocicepção em portadores de artrite reumatóide e em modelos de hiperalgesia em animais. Aos mecanismos dessas citocinas geralmente atribui-se uma ação indireta, envolvendo a produção de prostaglandinas e outros mediadores. Contudo, algumas evidências recentes sugerem um efeito direto do TNF- α nos nociceptores (KIDD, PHOTIOU & INGLIS, 2004).

Mecanismos de sensibilização e neuroplasticidade foram caracterizados em modelos experimentais de dor articular por inflamação intensa, e não têm ainda papel definido na OA, onde os fenômenos inflamatórios são menos pronunciados. Contudo, algumas observações em pacientes sugerem a participação de mecanismos de sensibilização do sistema nervoso, o que poderia explicar parcialmente a freqüente dissociação entre lesão estrutural e sintoma. Portadores de OA em membros inferiores (joelho ou quadril) exibem hiperalgesia prolongada e maiores áreas de dor referida após a injeção de salina hipertônica no músculo tibial anterior (BAJAJ *et al.*, 2001). Na OA de joelho, a sensação de dor desencadeada por pressão em áreas distantes da articulação afetada, como ombros e nos braços, parece aumentada (BRADLEY *et al.*, 2004). O mesmo acontece na OA de quadril, na qual se observa a redução do limiar de dor tanto sobre a junta acometida, quanto na contralateral. Mais interessante ainda é a reversão desse fenômeno por artroplastia (ORDERBERG, 2004). Dessa forma, a correção da lesão estrutural, com provável suspensão do estímulo nociceptivo na articulação, pode normalizar o controle inibitório central e os limiares de dor.

Imagens de ressonância nuclear magnética têm permitido uma avaliação mais detalhada das alterações estruturais na OA, e acrescentado novas informações sobre quais estruturas inervadas da articulação estão envolvidas na gênese da dor. Tem sido demonstrada uma associação de alterações do osso subcondral e dor, reacendendo o debate sobre a importância relativa desse tecido e da cartilagem nos fenômenos da articulação artrósica. Em pacientes com OA de joelhos, edema ósseo esteve presente em 78% dos pacientes sintomáticos, mas em apenas 30% do grupo sem dor (FELSON *et al.*, 2001). Lesões mais extensas estiveram presentes em 36% dos sintomáticos *versus* 2% dos assintomáticos (FELSON *et al.*, 2001). A presença de espessamento sinovial em imagens de ressonância, sugestivo de sinovite, bem como a presença de efusão articular, também guardam correlação com dor em pacientes com OA de joelhos (FELSON, 2005).

5. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DA OA

A inexistência de métodos objetivos e confiáveis para avaliar a evolução da progressão da doença é um fator limitante no estudo clínico da OA em humanos. As dificuldades incluem indisponibilidade de tecido para análise histopatológica, em particular nas fases iniciais da doença, a ausência de marcadores biológicos confiáveis, e a padronização

inconclusa em métodos de imagem. Por tais razões, modelos animais continuam amplamente utilizados para a compreensão de aspectos fisiopatológicos da doença e avaliação pré-clínica de novos fármacos e terapias.

Diversos modelos têm sido utilizados. De uma forma geral, classificam-se em espontâneos e induzidos (genética, cirúrgica ou quimicamente). Inexiste atualmente um modelo ideal que englobe de forma precisa todos os aspectos da doença humana (revisitos em AMEYE & YOUNG, 2006). Animais que desenvolvem OA espontaneamente provavelmente são os melhores para expressar a lenta evolução da doença humana. Contudo, exigem um tempo muito longo de observação, e apresentam progressão variável, dificultando sua utilização para eficácia de tratamentos. Modelos em camundongos geneticamente modificados, como aqueles “knock-out” para os genes *Col2a1* ou para ADAMTS-5, permitem avaliar o papel de moléculas específicas na fisiopatologia, mas também são pouco adequados para avaliação de tratamentos. Em modelos induzidos cirúrgica ou quimicamente, o dano articular se desenvolve de forma rápida e previsível. No entanto, esses modelos são mais compatíveis com OA secundária, e os animais podem desenvolver lesão agressiva, distanciando-se da evolução lenta vista em humanos.

A transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) tem sido realizada em diversas espécies, como coelhos e cães. Em ratos (STOOP *et al.*, 2000; 2001), a TLCA produz alterações compatíveis com a OA humana, surgindo edema de matriz e perda de condrócitos, em associação a fibrilação da cartilagem, já aos sete dias de indução. O dano da cartilagem ocorre de modo bifásico: lesões precoces concentradas em regiões periféricas, e uma segunda fase com lesões nas áreas centrais dos côndilos femorais e do platô tibial. As lesões iniciais começam na região superficial e se aprofundam na cartilagem, com redução de proteoglicanos e desnaturação do colágeno tipo II, porém sem aumento na expressão de neo-epítomos por degradação pela colagenase, sugerindo que esta enzima não participa efetivamente da degeneração da cartilagem nesse modelo. Além das alterações na cartilagem, esse modelo apresenta remodelação óssea, caracterizada inicialmente por perda do osso subcondral, detectada duas semanas após a cirurgia, com posterior aumento de volume do mesmo, com osteofitose evidente após dez semanas (HAYAMI *et al.*, 2004; 2006). Esse modelo foi utilizado para investigar a relevância da remodelação do osso subcondral na progressão do dano da cartilagem e avaliar a administração de um supressor da reabsorção óssea (alendronato sódico) com ação condroprotetora (HAYAMI *et al.*, 2004). Dessa forma, a TLCA em ratos configura um modelo adequado, exibindo alterações estruturais passíveis de intervenção farmacológica. A utilização de ratos, além de reduzir custos operacionais e

incidência de infecção associada a procedimentos cirúrgicos, possibilita modular a intensidade das alterações da cartilagem articular através de exercícios forçados facilmente aplicáveis a essa espécie. Por exemplo, as lesões foram mais frequentes sob exercício forçado, em relação a animais não submetidos a tal esforço (WILLIAMS *et al.*, 1982). Outro estudo apontou para os benefícios de exercício leve ou moderado sobre os danos da cartilagem (GALOIS *et al.*, 2004).

Apesar de dor e limitação de movimentos serem os principais sintomas na OA, tais aspectos não costumavam ser enfocados nos modelos animais. Com o objetivo de estudar uma lesão funcional da articulação, e usando a experiência acumulada no modelo de artrite por zymosan em ratos, nosso grupo aplicou o teste de incapacitação articular para avaliação de ratos submetidos à TLCA (CASTRO *et al.*, 2006). Nossos resultados mostraram de forma inédita a ocorrência de dor articular entre o primeiro e o décimo quarto dia, atingindo valores máximos durante a primeira semana. A administração terapêutica de inibidores de COX e morfina demonstrou a natureza hipernociceptiva do comportamento observado, e não apenas instabilidade articular. Verificou-se ainda a resposta do modelo à inibição profilática da síntese de NO, semelhantemente ao descrito por nosso grupo na artrite por zymosan (ROCHA *et al.*, 2002).

6. TRATAMENTOS PARA A OA

O tratamento clínico para OA ainda permanece paliativo e pouco eficaz (BRANDT, 2004; TOWHEED *et al.*, 2006; CEPEDA *et al.*, 2006). Nenhuma terapêutica produz benefício sintomático semelhante ao da prótese articular de joelho ou quadril (BRANDT, 2004); todavia ainda faltam critérios definitivamente estabelecidos para sua indicação, a qual permanece ainda sob decisão subjetiva, influenciada por fatores não relacionados à evolução da doença, tais como preferências individuais de médicos e pacientes ou co-morbidades associadas (ALTMAN *et al.*, 2005). Consideráveis esforços têm sido empreendidos pela comunidade acadêmica e pela indústria farmacêutica a fim de compreender as diversas vias etiopatogênicas envolvidas na iniciação e progressão da doença, e explorá-las para o desenvolvimento de drogas capazes de modificar sua evolução natural, ou seja, Drogas Modificadoras da Osteoartrite (DMOA). Para ser reconhecida como DMOA, uma droga deve tanto modular a perda do espaço articular quanto demonstrar benefício em

desfechos clínicos relevantes (ABADIE *et al.*, 2004). Implícito ao conceito de modificar a lesão estrutural estaria a idéia da melhora dos sintomas e da qualidade de vida do paciente.

Dentre os candidatos a DMOA, as substâncias sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina encontram-se sob intenso debate na literatura. Apesar de evidências de melhora radiológica em estudos clínicos bem desenhados para essas drogas (REGINSTER *et al.*, 2001; PAVELKA *et al.*, 2002; MICHEL *et al.*, 2005), críticas quanto à padronização utilizada para obtenção dos registros radiográficos, bem como o fracasso da melhora sintomática em estudos posteriores, têm posto em discussão o benefício desses compostos (HOCHBERG, 2006). Comportamento semelhante foi descrito para diacereína (DOUGADOS *et al.*, 2001) e doxiciclina (BRANDT *et al.*, 2005). Embora capazes de reduzir a perda de cartilagem articular, tal modificação estrutural não foi acompanhada de benefício sintomático.

O bloqueio de citocinas começa a ser proposto como terapia na OA. Resultados em cães submetidos à TLCA sugerem condroproteção, possivelmente via supressão de atividade de colagenase, mediante tratamento com antagonista do receptor para a IL-1 (IL-1ra) (CARON *et al.*, 1996). Essa estratégia vem sendo visualizada; de fato a segurança intra-articular de IL-1ra recombinante humano, primeira etapa para um estudo clínico, já foi investigada (CHEVALIER *et al.*, 2005). O bloqueio de TNF- α também tem sido aventado. O uso de inibidores de citocinas, semelhante ao que se vem realizando na terapia da artrite reumatóide, pode oferecer uma abordagem terapêutica alvo-específica em um futuro próximo.

Por viscosuplementação entende-se o restabelecimento das propriedades viscoelásticas do fluido sinovial após administração intra-articular de preparações de ácido hialurônico (hialuronanos e seus derivados reticulados, os hılanos) com elevada massa molar (BALAZS & DENLINGER, 1993). Segundo esses pesquisadores, o restabelecimento ou a suplementação da viscosidade do fluido sinovial poderia melhorar a funcionalidade articular e conseqüentemente reduzir os sintomas da OA. Grande parte dos estudos enfocando os benefícios da viscosuplementação carece de controles adequados. Usualmente, o restrito tamanho amostral e a falta de padronização no número de injeções, bem como a escassez de estudos comparativos entre os diferentes produtos já existentes no mercado, comprometem uma conclusão definitiva quanto à indicação da viscosuplementação para tratamento da OA. Todavia, uma recente revisão do grupo Cochrane pôs em evidencia o alívio sustentável da dor e melhora da qualidade de vida dos pacientes, quando comparado a injeções locais de corticosteróides. Adicionalmente, a ausência de efeitos colaterais sistêmicos e o número reduzido de reações locais garantem a segurança dessa terapia (BELLAMY *et al.*, 2005).

Os mecanismos responsáveis pela eficácia da viscosuplementação ainda estão por ser demonstrados. Existem controvérsias quanto à exigência de massas molares elevadas para a eficácia dos compostos. Apesar de se haver aventado melhor alívio sintomático pelo uso de preparações com massa molar mais elevada (WOBIG *et al.*, 1999), eficácias clínicas semelhantes foram descritas tanto para hialanos de alta massa molar (ordem de 10^6 g/mol), quanto para preparações mais leves ($5 - 7,5 \times 10^5$ g/mol) (PASQUALI RONCHETTI *et al.*, 2001). Ainda assim, persiste o apelo que associa a elevada massa molar e um estado coloidal de gel a melhores resultados (GOMIS *et al.*, 2004). Todavia, o alívio clínico sustentável por 8 a 12 meses (HUSKISSON & DONELLY, 1999; KIRWAN, 2001) é inconsistente com a presença desses agentes na junta, já que se postula total clareamento por volta do terceiro dia após a administração, tornando evidente que os efeitos benéficos obtidos por longo prazo não se explicam satisfatoriamente pelo conceito de viscosuplementação.

Fortalecendo a hipótese de um mecanismo de ação farmacológico para o ácido hialurônico (revisto em GHOSH & GUIDOLIN, 2002), relatou-se a existência de um receptor específico para essa substância (CD44), presente em células implicadas na fisiopatologia da OA, tais como macrófagos, linfócitos T, sinoviócitos e condrócitos. A ligação ao CD44 dispara uma variedade de eventos intracelulares, dentre os quais estão cascatas de fosforilação de proteínas, liberação de citocinas e síntese de proteínas do ciclo celular. Dentre alguns dos efeitos da administração de ácido hialurônico exógeno, destacam-se: estímulo à sua síntese endógena e à de proteoglicanos, inibição da liberação de enzimas líticas da matriz e inibição da fagocitose por células mononucleares e da migração leucocitária (revistos em DOUGADOS, 2000). Foi demonstrado também que o ácido hialurônico neutraliza radicais livres gerados nos tecidos articulares em atividade inflamatória (JAHN, BAYNES & SPITELLER, 1999). Em joelhos humanos acometidos pela OA, a administração de ácido hialurônico promoveu redução no número e na agregação de sinoviócitos, bem como no número e calibre dos vasos sinoviais (PASQUALI RONCHETTI *et al.*, 2001). É importante considerar que diversos estudos têm demonstrado benefício da viscosuplementação sobre a lesão estrutural em modelos animais (GHOSH & GUIDOLIN, 2002) e em humanos (GOLDBERG & BURCKWALTER, 2005), cogitando inclusive sua candidatura como DMOA.

Polissacarídeos sulfatados formam um complexo grupo de macromoléculas, que ocorrem em uma ampla variedade de organismos. Em algas marinhas, é comum encontrar galactanas e mananas sulfatadas, ao passo que nos tecidos de vertebrados, estão presentes os glicosaminoglicanos. Entretanto, a ocorrência de polissacarídeos sulfatados em vegetais

superiores vasculares é escassa, e o único relato disponível limita sua ocorrência àquelas espécies de angiospermas que crescem em ambiente marinho (AQUINO *et al.*, 2005).

Relatos na literatura sugerem efeitos benéficos na OA por polissacarídeos quimicamente distintos do ácido hialurônico. Hongbin *et al.* (2004) demonstraram a ação condroprotetora da carboximetil-quitina, associada à redução na expressão da MMP-1, no modelo por TLCA em coelhos. Utilizando células de condrossarcoma estimuladas por IL-1 *in vitro*, Torrent *et al.* (2007) demonstraram efeitos condroprotetores de um polissacarídeo polissulfatado semi-sintético derivado da inulina, por inibição da agreganólise, redução de liberação de MMP-3 e estimulação da síntese de agreganos. Em estudo recente, nosso grupo trabalhou com a hipótese de que polissacarídeos capazes de formar géis viscosos pudessem ser utilizados na OA. Efetuou-se a purificação de uma galactomanana comercialmente disponível (goma guar), extraída do endosperma da semente da leguminosa *Cyamopsis tetragonolobus*, e um agente de viscosuplementação foi desenvolvido (CUNHA *et al.*, 2005; Patente PI - 0502198-7 de 16/06/2005). Essa galactomanana eletricamente neutra reduziu a hipernocicepção articular em ratos submetidos à TLCA, com a mesma eficácia do Hilano G-F 20®, um dos derivados do ácido hialurônico comercialmente disponíveis. Interessante observar que a analgesia promovida ocorreu independentemente da viscosidade da preparação, sugerindo uma possível ação farmacológica para a goma guar (CASTRO *et al.*, 2007).

7. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Pelo exposto, a osteoartrite (OA) mostra-se uma artropatia multifatorial e complexa. Modelos experimentais de OA podem ser utilizados para compreensão de aspectos fisiopatológicos, bem como para avaliação da eficácia de novos tratamentos. Apesar de vários modelos apresentarem características histopatológicas compatíveis com a doença humana, um dos hiatos existente até recentemente na pesquisa em OA consistia na ausência de modelos animais capazes de avaliar a dor articular associada à OA. O modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) em ratos apresenta alterações na cartilagem compatíveis com a OA humana (STOOP *et al.*, 2001). Nosso grupo recentemente padronizou um método reprodutível, independente do observador, para avaliação de dor articular no modelo de TLCA em ratos (CASTRO *et al.*, 2006). Também iniciamos uma abordagem bioquímica para

a lesão estrutural da cartilagem, por observação das alterações do condroitin-sulfato da matriz extracelular (CASTRO, 2004). É nossa intenção comparar as alterações sofridas por esse glicosaminoglicano (GAG) aos critérios recentemente preconizados pela Sociedade Internacional para Pesquisa em Osteoartrite (*Osteoarthritis Research Society International, OARSI*) (PRITZKER *et al.*, 2006), propostos para substituição dos clássicos escores de Mankin, na mensuração do dano estrutural tanto na OA humana quanto em modelos experimentais. Durante o mestrado (CASTRO, 2004) estudamos o modelo até a quarta semana após a indução; entretanto faz-se necessário estender esse período de observação, já que as lesões estruturais vistas na histologia são mais pronunciadas após dez semanas (STOOP *et al.*, 2001; HAYAMI *et al.*, 2004).

De modo inédito, nesse mesmo modelo, demonstramos a eficácia analgésica, independente de viscosidade, da goma guar (CASTRO *et al.*, 2007). Para a validação dessa galactomanana como droga anti-arrtrósica, é imprescindível avaliar o possível papel condroprotetor que possa desempenhar. Modificações estruturais, por inserção de grupos funcionais, tais como carboxilato e sulfato, podem ser realizadas (CUNHA, 2006), a fim de tornar a estrutura da goma guar mais estruturalmente aparentada aos GAG constituintes das estruturas articulares, na tentativa de investigar uma relação entre estrutura química e atividade biológica.

Assim, objetivamos:

- Investigar a ocorrência da incapacitação articular, como reflexo de hipernocicepção, na fase crônica do modelo por TLCA em ratos;
- Padronizar a abordagem bioquímica da lesão estrutural da cartilagem na fase crônica do modelo, relacionando à avaliação histológica;
- Investigar efeitos ou mecanismos analgésico e/ou condroprotetor, de preparações de goma guar, modificadas ou não quimicamente, no referido modelo.

*Materiais e
Métodos*

1. ANIMAIS

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), com pesos entre 180 a 200g, foram fornecidos pelos Biotério Central/UFC ou setorial (Departamento de Fisiologia e Farmacologia). Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e o número dos animais utilizados.

O protocolo experimental foi aprovado (nº 113/07) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEPA-UFC), que segue as instruções do Colégio Brasileiro em Experimentação Animal (COBEA) (vide Anexo 1).

2. APARELHOS E INSTRUMENTOS LABORATORIAIS

Além dos equipamentos e instrumentos usuais, foram utilizados:

- Banho termostático thermomix BM – Frigomix B (B. Braun Biotech International);
- Microscópio biológico CH30 e sistema para fotomicrografia PM-10AK3 (Olympus);
- Sistema para avaliação da incapacitação articular, com software IA – incapacitação articular versão 1.0, desenvolvidos pelo Prof. Dr. Humberto Carmona (UECE - CE);
- Sistema para cromatografia de alta eficiência por exclusão de tamanho (HPSEC), constituído de cromatógrafo Shimadzu LC-14AD, munido de detectores para índice de refração RID-6A e UV-VIS SDP-10AV, e coluna Ultrahydrogel Linear 7,5 x 300 mm (Waters);
- Sistemas para eletroforese vertical Mini-V 8.10 (Life Technologies) e Hoefer miniVE (Amersham Biosciences Corp.);
- Fonte para eletroforese Model 250 (Life Technologies);
- Ultra-centrífuga refrigerada 2K15 (Sigma Laborzentrifugen);

3. DROGAS E REAGENTES

As drogas e reagentes utilizados apresentaram grau de pureza e propriedades analíticas adequados. Além dos reagentes habituais de laboratório, foram utilizados:

- Acrilamida (SIGMA);
- Agarose (SIGMA);
- Alendronato sódico (MERCK RESEARCH LABORATORIES);
- Azul de toluidina (SIGMA);
- Barbital e barbital sódico (REAGENZIEN MERCK);
- Condroitin-4-sulfato e condroitin-6-sulfato (SIGMA);
- Corante rápido HEMA3;
- Galactose (SIGMA);
- Goma guar (SIGMA);
- Heparan-sulfato (SIGMA);
- Indometacina (SIGMA);
- Kit colorimétrico para determinação de nitrito (Cayman Chemical Co.);
- Manose (SIGMA);
- Meloxicam (Movatec^R, ampola de 15mg/1,5mL, Boehringer Ingelheim);
- Morfina, sulfato (Dimorf^R, ampola de 10mg/1ml, Cristália)
- Naloxona (SIGMA);
- N, N'-metileno-bis-acrilamida (SIGMA);
- Persulfato de amônio (SIGMA);
- PROLAV 750^R (protease alcalina) (Prozyn, SP, Brasil);
- Tadalafila (Cialis^R, comprimido de 20mg, Lilly);
- N, N, N', N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED) (SIGMA);
- Trizma base (SIGMA);

4. SOLUÇÕES

Mistura acrilamida/bisacrilamida 30% w/v:

Acrilamida	14,5g
N, N'-metileno-bis-acrilamida	0,5g
Tampão barbital (q.s.p.)	50ml

Líquido de Turk:

Ácido acético glacial	20mL
Violeta de genciana	2,0mL
Água destilada (q.s.p.)	1,0L

Solução de azul de toluidina 0,1% w/v (para gel de agarose):

Azul de toluidina	100mg
Solução descorante para gel de agarose	100mL

Solução de azul de toluidina 0,1% w/v (para gel de poliacrilamida):

Azul de toluidina	100mg
Solução de ácido acético a 1% v/v	100mL

Solução descalcificante:

Ácido fórmico.....	50mL
Solução aquosa de formalina a 10% v/v (q.s.p.)	1,0L

Solução descorante para gel de agarose:

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

Solução-preparo de gel de agarose 0,6% w/v:

Agarose	60mg
Tampão diaminopropano-acetato (q.s.p.)	10mL

Solução-preparo de gel de poliacrilamida 6% w/v:

Mistura acrilamida/bisacrilamida 30% w/v	4mL
Persulfato de amônio	14mg
TEMED	25,0 μ L
Tampão barbital (q.s.p.)	20mL

Tampão barbital 60mM (pH 8,60)

Barbital	2,14g
Barbital sódico	10,02g
Água destilada (q.s.p.)	1,0L

Tampão diaminopropano-acetato 50mM (pH 9,0):

1,3-diaminopropano.....	4,2mL
Ácido acético glacial	3,8mL
Água destilada (q.s.p.)	1,0L

Tampão Tris-HCl/NaCl 50mM/150mM (pH 8,0):

Solução aquosa de Trizma base 0,2M	5,0mL
Solução aquosa de ácido clorídrico 0,2M.....	2,5mL
Solução aquosa de cloreto de Sódio 4,0M.....	0,744mL
Água destilada (q.s.p.)	20mL

5. MODIFICAÇÃO E ANÁLISE QUÍMICAS DO POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR

As modificações e análises químicas da goma guar foram realizadas pela Dra. Pablyana L. R. Cunha, sob a orientação da Profa. Dra. Judith P. A. Feitosa, no Laboratório de Polímeros do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (UFC). A goma guar, como adquirida do fabricante (Sigma), contém 3,64% de contaminação protéica, a qual foi removida por combinação de métodos de precipitação-centrifugação (físico) e precipitação em reagente de Fehling (ver CUNHA, 2006). A purificação reduz a massa molar viscosimétrica de 1,9 x

10^6 g/mol para $5,5 \times 10^5$ g/mol, determinada a partir de soluções de concentração inicial igual a 0,07% w/v.

Uma vez purificada, a goma guar foi utilizada para a manipulação farmacológica (vide a seguir) ou foi submetida à modificação estrutural por inserção de grupos carboxilato (oxidação) ou sulfato. A introdução dos novos grupos funcionais foi confirmada por espectroscopia de absorção na região do infravermelho. Os graus de substituição para os grupos carboxila e sulfato foram determinados por titulação potenciométrica e análise elementar, respectivamente. A posição de inserção desses grupos foi elucidada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), em técnicas unidimensionais (RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT 135) ou bidimensional (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, ^1H - ^{13}C HMQC). A viscosidade intrínseca foi determinada a partir de soluções com concentração inicial de 0,3% w/v. A massa molar ponderal foi determinada por dados obtidos com experimentos de espalhamento de luz. A viscosidade aparente foi determinada em soluções 1% (w/v), a taxa de cisalhamento de 200 s^{-1} , na temperatura de 25°C (CUNHA, 2006).

6. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

6.1. Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA) (modificado de STOOP *et al.*, 2001)

Os animais foram anestesiados por inalação de éter etílico. A região ventral do joelho direito foi depilada, higienizada e submetida a uma incisão longitudinal. Procedeu-se a uma incisão parapatelar lateral, seguida de luxação da patela, para acesso ao espaço articular. O ligamento cruzado anterior foi seccionado com o auxílio de uma tesoura (Figura 1). A translação pósterio-anterior da tíbia em relação ao fêmur (“sinal da gaveta”) assegura a completa ruptura do ligamento. Após redução da luxação patelar, a cápsula articular foi suturada com Vycril 5/0 (polyglactin 910 - Ethicon). A pele foi suturada com Nylon monofilamentar 4/0 (Point Suture), e submetida à anti-sepsia. Os pontos da sutura da pele foram retirados sete dias após a cirurgia. Grupos falso-operados (SHAM) foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito acima, com exceção da TLCA.

Os animais foram sacrificados em diferentes períodos de evolução da doença (7, 14, 28 ou 70 dias).

6.2. Registro da dor articular (modificado de TONUSSI & FERREIRA, 1992)

Os animais foram postos a deambular sobre um cilindro de alumínio (30 cm diâmetro x 50 cm largura, 3 rpm), com capacidade para três animais por vez (Figura 2). As patas traseiras do animal foram calçadas com sapatilhas metálicas especialmente desenhadas. A sapatilha direita – correspondente ao joelho manipulado – foi conectada a uma porta de entrada de dados de um microcomputador, no qual está instalado um programa de aquisição de dados (IA – incapacitação articular 1.0). O toque da pata na superfície metálica fecha o circuito, enquanto que a elevação da mesma o abre. O registro do tempo de suspensão da pata (TSP), considerado proporcional à dor articular, foi realizado durante 10 min. Tal medida foi feita diariamente por até 28 dias, ou duas vezes semanais do 28º ao 70º dia.

6.3. Manipulação farmacológica

A. Intervenções na fase inicial do modelo

Indometacina (2 mg/kg/dia s.c.), meloxicam (6 mg/kg/dia i.p.) ou tadalafila (6mg/kg/dia i.p.) foram administrados do 4º ao 7º dias após a TLCA, 30 min antes da avaliação da dor. Morfina (200µg i.art.) foi administrada apenas no 4º dia após a TLCA, 30 min antes da avaliação da dor. Naloxona (500 µg i. art.) foi administrada 15 min antes de morfina. A administração de alendronato sódico (30 ou 240 µg/kg s.c.) se deu no 3º dia anterior à TLCA, sendo repetida a cada 3 dias, até o 6º dia após a TLCA.

Soluções salinas de goma guar (100 µg/50 µl i. art.), com sua estrutura inalterada (GG), sulfatada ou oxidada foram administradas apenas no 4º dia após a TLCA. Os monossacarídeos manose ou galactose (500 µg/50 µl i. art.) foram dissolvidos na solução de GG descrita acima.

Os grupos não-tratados (NT) receberam salina por vias correspondentes.

B. Intervenções na fase crônica do modelo

A solução salina de goma guar (100 µg/50 µl i. art.), com sua estrutura inalterada, foi administrada semanalmente a partir do 14º dia após a TLCA, até o 63º dia, totalizando oito administrações. Os grupos não-tratado e (NT) e SHAM receberam salina i. art.

6.4. Coleta do lavado e estruturas articulares

Os animais foram sacrificados por exsanguinação sob anestesia terminal (hidrato de cloral – 400 mg/kg, i.p.). À cavidade articular do joelho direito, fizeram-se duas injeções de 0,2mL de EDTA 10mM em PBS. O lavado articular foi coletado por aspiração e mantido em banho de gelo, para coleta de alíquotas. Estas foram diluídas em líquido de Turk, para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Em seguida, o lavado foi centrifugado (430 x g, 10 min, 4°C). O sobrenadante foi estocado à -20°C, para posterior análise (determinação de nitrito total), e o *pellet* celular, ressuspenso em PBS, para contagem diferencial. As articulações submetidas ao procedimento acima tiveram suas extremidades femorais distais removidas, para coleta de fragmentos da cartilagem dos côndilos.

Em outros grupos, o joelho direito inteiro foi dissecado, fixado em formalina a 10% v/v por 24 h e imerso em solução descalcificante por 15 dias. Os compartimentos mediais e laterais foram separados longitudinalmente, e encaminhados para preparação histológica rotineira por H&E. Uma série de cinco cortes, distanciados em 200 µm, foram realizados no sentido centrífugo para cada compartimento. As lâminas receberam códigos e foram examinadas em cego pela Prof. Dra. Margarida M.L. Pompeu (Depto. de Patologia e Medicina Legal/ UFC). O escore para a lesão da cartilagem femoral foi dado pelo produto dos parâmetros *grau x estágio* (PRITZKER *et al.*, 2006)(Tabelas II e III). Como controle histológico da cartilagem, foi feita também a coloração por Azul de Toluidina, que cora especificamente os proteoglicanos da matriz orgânica da cartilagem.

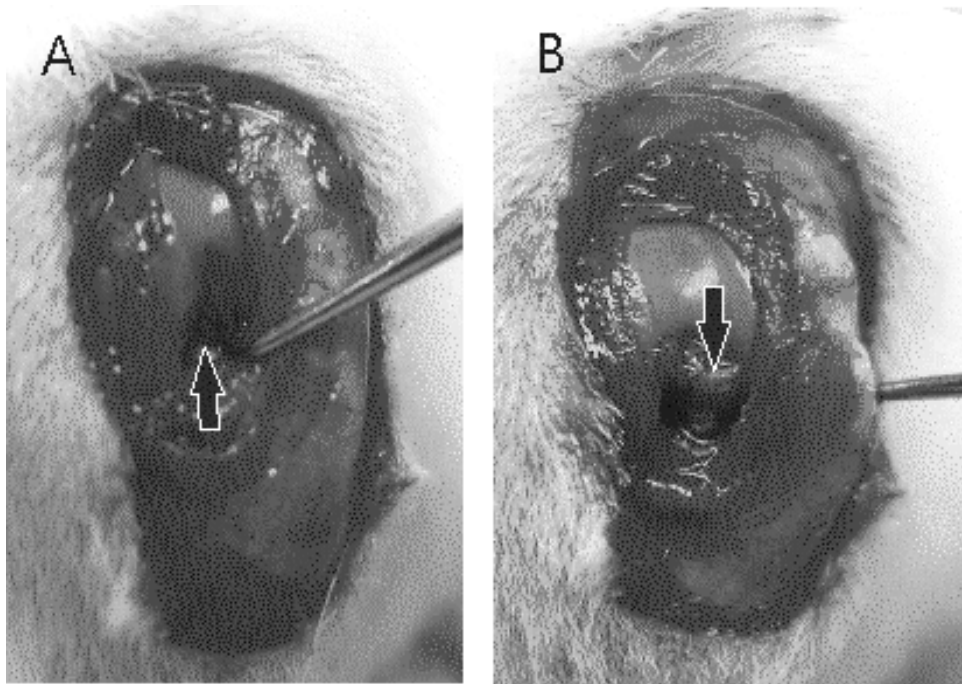


Figura 1: Transecção do Ligamento Cruzado Anterior. (A) Animal submetido à artrotomia, porém com o ligamento (seta) e intacto. (B) Ligamento seccionado.

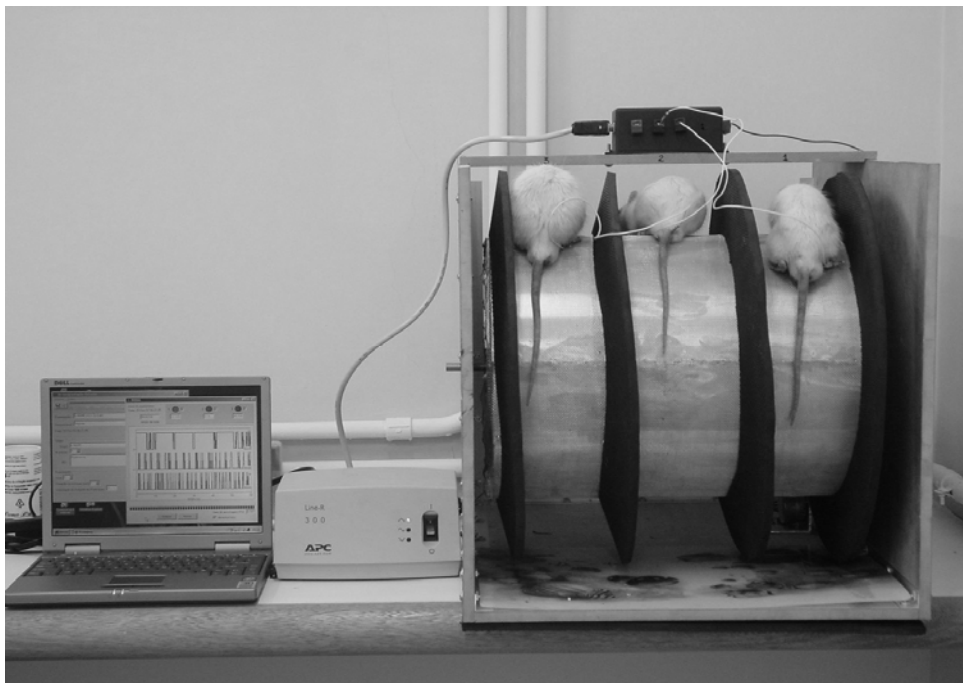


Figura 2: Animais deambulando no sistema para avaliação da incapacitação articular. Ratos Wistar machos, após colocação de sapatilhas metálicas, são postos a deambular sobre um cilindro metálico giratório (3 rpm) por 10 min. O cilindro está conectado a um microcomputador no qual o software IA – incapacitação articular 1.0 registra o Tempo de Suspensão da Pata (em s) para cada animal.

Tabela II: Sistema OARSI para avaliação da cartilagem OA – grau

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

Fonte: PRITZKER *et al.*, 2006.

Tabela III: Sistema OARSI para avaliação da cartilagem OA – estágio

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

Fonte: PRITZKER *et al.*, 2006.

6.5. Extração e avaliação dos GAG da matriz da cartilagem femoral

A. Extração

Fragments da cartilagem dos côndilos femorais foram desidratados a 80 C e homogeneizados em acetona. 20,0  L de uma suspensão de PROLAV 750^R em tampão Tris-HCl/NaCl (4 mg enzima / mL tampão) foram adicionados a cada miligrama de p  cet nico obtido. A digestão se deu em banho-maria (56 C) em três períodos distintos (24, 48 e 72 h), para determina o do rendimento ideal do processo. Concluída a digestão, a mistura reacional foi mantida em banho-maria (37 C) por 30 min, seguindo-se adi o de ácido tricloroacético (concentra o final de 10% w/v), agita o a 4 C por 15 min e centrifuga o (10.000 x g, 15 min, 25 C). Ao sobrenadante coletado, dois volumes de etanol foram adicionados e a mistura foi mantida *overnight* a 4 C. Uma segunda centrifuga o foi realizada (10.000 x g, 15 min, 15 C): o sobrenadante foi descartado e o precipitado (GAG), dissolvido em 20  L de água destilada. O resíduo da digestão foi lavado com água destilada, dessecado e pesado, para determina o da massa de tecido realmente digerido.

B. Eletroforese em gel de agarose

Procedeu-se   eletroforese em gel de agarose para determina o semi-quantitativa dos GAG extraídos de cartilagem femoral. 5,0  L da soluço aquosa de GAG foram aplicados em gel de agarose 0,6% w/v, e separados por eletroforese vertical (100V), em tampão diaminopropano-acetato, por 1 h. Os GAG foram fixados no gel por imersão em soluço de brometo de cetil-trimetilamônio 0,1% w/v durante 2 horas. Após secagem sob calor e ventila o, o filme obtido foi imerso em azul de toluidina 0,1% w/v durante 15 min. O excesso de corante foi removido por imersão em soluço descorante por 5 min.

C. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Procedeu-se à eletroforese em gel de poliacrilamida para avaliação indireta da massa molar dos GAG extraídos da cartilagem femoral. 10 µg de GAG foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% w/v, e submetidos à eletroforese vertical (100 V), em tampão barbital, por 1 h. Os GAG no gel foram corados por azul de toluidina durante 15 min. O excesso de corante foi removido por imersão em ácido acético a 1% v/v por 3 horas. Para proceder à secagem, o gel foi imerso em solução de glicerol 5% v/v por 30 min, e colocado entre duas folhas úmidas de celofane, sob tensão, por 48 h.

D. Análise de imagens

Os filmes obtidos a partir dos géis foram digitalizados e analisados pelo software ImageJ 1.37v, disponibilizado gratuitamente pelo U. S. National Institutes of Health (RASBAND, 2006). Para cada banda do gel de agarose, determinou-se a densidade óptica (DO) relativa:

$$\text{DO relativa} = \log \frac{256,00}{\text{luminosidade}}$$

A quantificação de GAG no gel de agarose, deu-se mediante comparação da DO relativa, frente a uma curva padrão de condroitin-6-sulfato (C6S) (2-12 µg) (Figura 3).

Para avaliação da migração do GAG em gel de poliacrilamida, determinou-se a mobilidade eletroforética relativa ao condroitin-4-sulfato (C4S) (DIETRICH & DIETRICH, 1976), o padrão de menor massa molar ponderal utilizado ($4,55 \times 10^4$ g/mol) (Figura 4):

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

E. Cromatografia de alta eficiência por exclusão de tamanho (*HIGH PERFORMANCE SIZE-EXCLUSION CHROMATOGRAPHY*, HPSEC)

A massa molar dos GAG da cartilagem femoral também foi avaliada indiretamente por HPSEC. 10 µg de GAG por amostra foram dissolvidos em 50,0 µL de uma solução de NaNO₃ 0,1M e injetados em cromatógrafo Shimadzu LC-14AD, munido de detectores para índice de refração RID-6A e UV-VIS SDP-10AV. A amostra foi eluída por solução aquosa de NaNO₃ 0,1M, que percolou durante 30 min uma coluna Ultrahydrogel Linear (Waters^R) de dimensões 7,5 x 300 mm, sob um fluxo de 0,5 mL/min, em pressão aproximada de 9-10 kgf/cm². O sinal no detector para índice de refração compreendido entre 14,00 e 19,00 min, sem correspondência no detector UV-VIS a 280 nm (Figura 5), representa a fração polissacarídica de elevada massa molar contida nos extratos. Registrou-se o tempo de retenção para o pico desse sinal, corrigindo-o com o padrão interno etilenoglicol.

6.6. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

O NO produzido na articulação foi determinado indiretamente pelo ânion nitrito (NO₂⁻), seu metabólito estável presente no lavado articular. Procedeu-se à reação de Griess, antecedida pelo tratamento das amostras com nitrato-redutase, para determinação do nitrito total. Utilizou-se kit colorimétrico comercialmente disponível (CaymanChem, Ann Arbor, USA), observando o protocolo preconizado pelo fabricante. A absorbância foi medida a 540 nm, e a concentração de nitrito determinada por uma curva-padrão de nitrito de sódio (0-35 mM).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada com teste t de Student ou Análise de variância univariada (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Na ocorrência de duas fontes de variabilidade, utilizou-se a Análise de variância

bivariada (Two-way ANOVA). Na análise dos escores histopatológicos, os testes de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis seguido de Dunns, foram utilizados. A regressão linear ou a análise de correlação foram realizadas em alguns casos. Para todos os testes, adotou-se o nível de significância mínimo de 5% ($p < 0,05$).

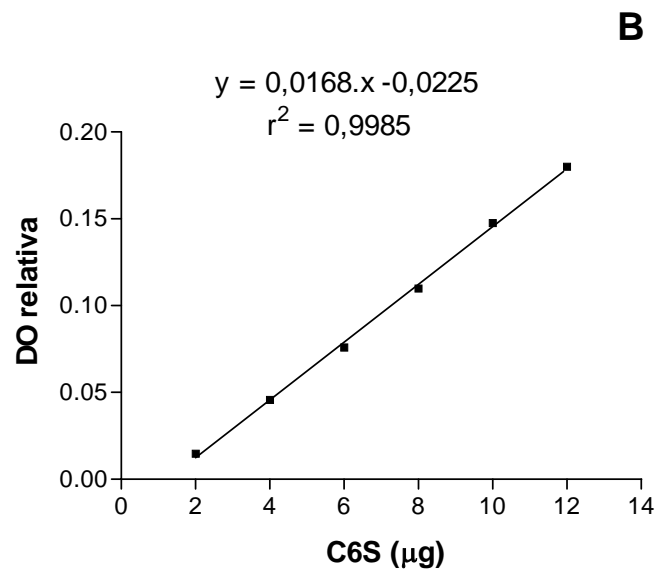
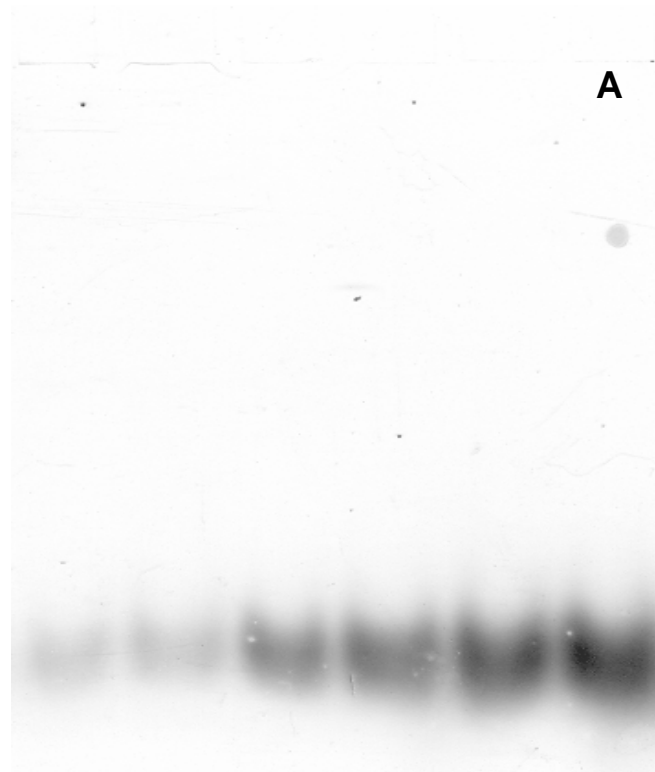


Figura 3: Curva-padrão de condrotin -6-sulfato (C6S). (A) Eletroforese de diferentes quantidades de C6S em gel de agarose, tampão diaminopropano-acetato 50 mM, pH 9,00 (2-12 µg). (B) Reta obtida pela plotagem da quantidade de C6S vs densidade óptica relativa.

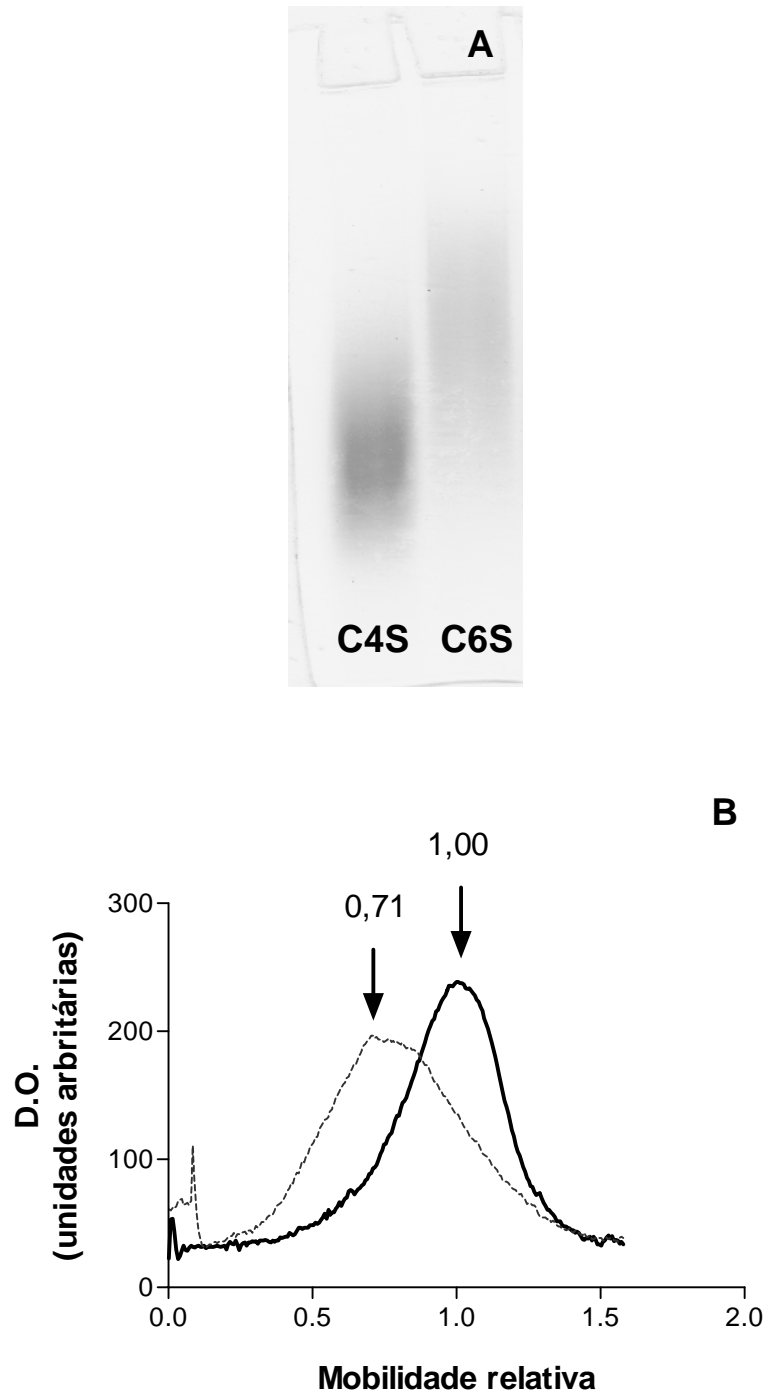


Figura 4: Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (6% w/v) de condroitin-4-sulfato (C4S) e condroitin-6-sulfato (C6S). (A) 10 μg de cada GAG foram submetidos à eletroforese (100V) em tampão barbital 60mM (pH 8,60). (B) Distribuições obtidas pela leitura das bandas no software ImageJ 1.37 v. As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

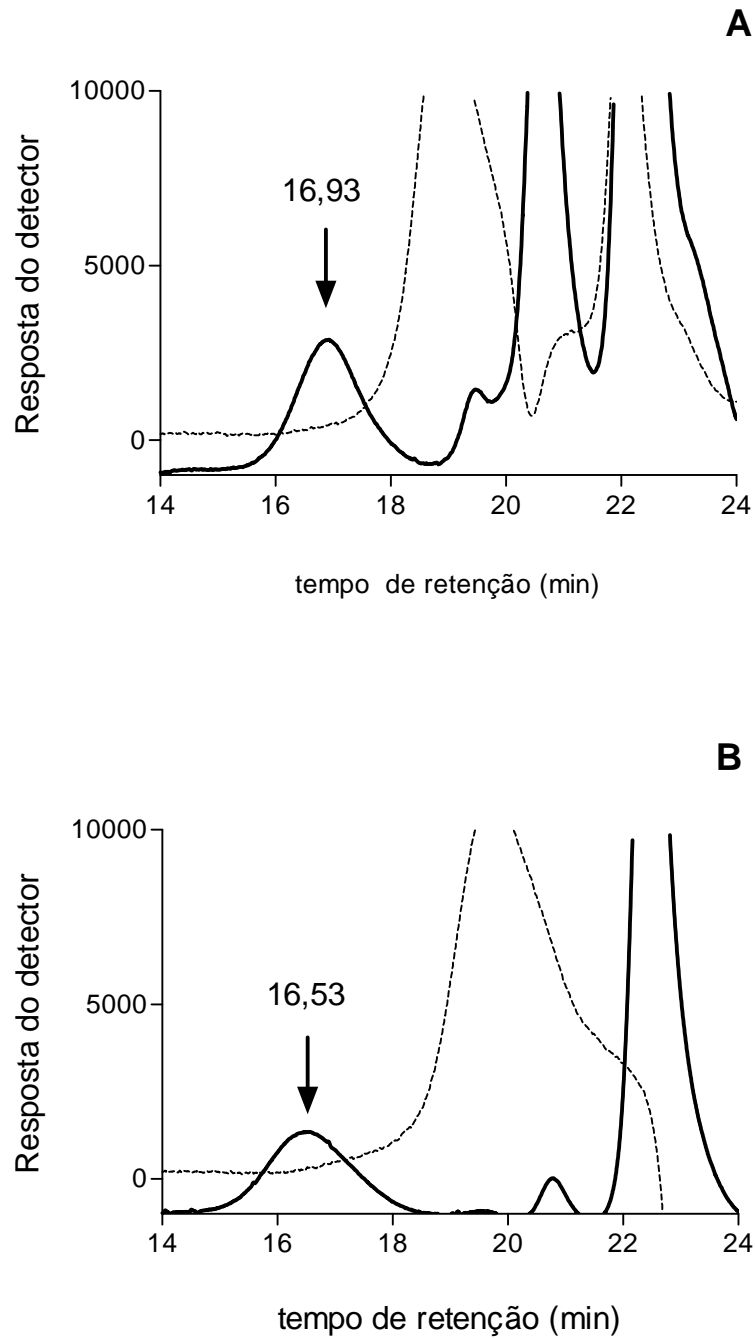


Figura 5: Perfil cromatográfico (HPSEC) de amostras comerciais (SIGMA) de condroitin-4-sulfato (A) e condroitin-6-sulfato (B). 10 μ g de cada GAG foram injetados no sistema. As linhas contínua e descontínua ilustram as respostas para índice de refração e absorvância no ultravioleta a 280 nm, respectivamente. As setas indicam o tempo de retenção de pico da fração polissacarídica de elevada massa molar. O sinal entre 22,00 e 24,00 min corresponde ao pico do etilenoglicol (padrão interno).

Resultados

1. DOR ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (TLCA)

Os animais submetidos à TLCA (grupo OA) desenvolveram dor articular, observada pelo aumento no tempo de suspensão da pata (TSP), mensurado pelo Teste de Incapacitação Articular para ratos (vide materiais e métodos). Valores do TSP para o grupo OA foram máximos nos três primeiros dias, mas diminuíram em seguida, permanecendo significativamente superiores aos apresentados pelo grupo SHAM (artrotomia sem TLCA) por duas semanas. Os animais do grupo SHAM não apresentaram dor, quando comparados a animais não manipulados (grupo NAIVE), mostrando que isoladamente a artrotomia não induz dor (Figuras 6A e 6B). A dor articular não foi evidente nas fases avançadas do modelo (Figuras 6C a 6F).

A administração terapêutica de inibidores das ciclooxigenases, meloxicam (6mg/kg/dia i.p.) e indometacina (2 mg/kg/dia s.c.), inibiu de forma significativa o pico de dor articular, reduzindo-o em 55% e 118%, respectivamente (SHAM: $120,4 \pm 8,8s$; NT: $203,0 \pm 14,4s$; Meloxicam: $157,5 \pm 9,2s$; Indometacina: $105,2 \pm 4,2s$)(Figura 7).

A figura 8 apresenta a inibição percentual da dor, obtida pela administração intra-articular da morfina (200 µg) em animais cujos valores de TSP se apresentassem maiores ou iguais a 150,0s/10 min, no quarto dia após a TLCA. Esse efeito foi revertido pela administração prévia de naloxona (500 µg i. art.) (NT: $13,8 \pm 2,9\%$; Morfina: $28,2 \pm 2,2\%$; Morfina + Naloxona: $-55,6 \pm 1,4\%$).

2. MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA POR INIBIDOR DE FOSFODIESTERASE E ALENDRONATO SÓDICO NA DOR ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR (TLCA)

A administração terapêutica de tadalafila (0,5 mg/kg/dia p.o.) inibiu de forma significativa o pico de dor articular, reduzindo-o em 67% (SHAM: $120,4 \pm 8,8s$; NT: $203,0s \pm 14,4s$; Tadalafila: $147,8 \pm 9,9s$)(Figura 9).

A administração profilática de alendronato sódico, nas doses de 30 e 240 µg, aboliu o desenvolvimento de dor articular, determinada pelo pico de TSP entre o quarto e o

sétimo dias após a TLCA, reduzindo-o em 114% e 92%, respectivamente (SHAM: $120,4 \pm 8,8s$; NT: $203,0 \pm 14,4s$; Alendronato 30 μg : $108,8 \pm 3,8s$; Alendronato 240 μg : $126,9 \pm 5,0s$)(Figura 10).

3. LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA OSTEORRITE INDUZIDA POR TLCA EM RATOS

As concentrações de nitrito total presente no lavado articular de animais dos grupos OA e SHAM, em distintos períodos, estão ilustradas na figura 11. Os fatores grupo e tempo de indução são influentes na variabilidade dos dados ($p=0,0146$ e $p\leq 0,0016$, respectivamente), não havendo interação entre eles ($p=0,0370$). Os níveis de nitrito total mostraram-se significativamente elevados no 7º dia após TLCA (OA: $9,5 \pm 1,8\mu M$; SHAM: $2,7 \pm 0,7\mu M$; $p<0,001$). Tais valores decresceram com a evolução do modelo.

4. EFEITO DE ESTRUTURAS DA GOMA GUAR QUIMICAMENTE MODIFICADAS NA DOR ARTICULAR EM RATOS SUBMETIDOS À TLCA: REVERSÃO DA ANALGESIA OBTIDA POR GOMA GUAR POR MONOSSACARÍDEOS.

Na tabela IV, estão descritas as alterações nas características físico-químicas da goma guar após as reações de modificação estrutural, determinadas no Laboratório de Polímeros do Depto. de química Orgânica e Inorgânica (UFC) (ver CUNHA, 2006). Observou-se redução nos valores de massa molar ponderal e viscosidade intrínseca, embora haja manutenção da ordem de grandeza desses parâmetros. A sulfatação deu-se preferentemente no carbono 6 do resíduo de galactose, enquanto que a oxidação (carboxilação), no carbono 6 do resíduo de manose. Para tais modificações, são sugeridas as estruturas ilustradas na figura 12.

Embora a administração intra-articular de 100 μg de goma guar quimicamente inalterada, no quarto dia após a TLCA, reduzisse significativamente o pico de dor articular em 96%, as soluções de goma guar modificada não exerceram analgesia (NT: $183,3 \pm 15,7s$;

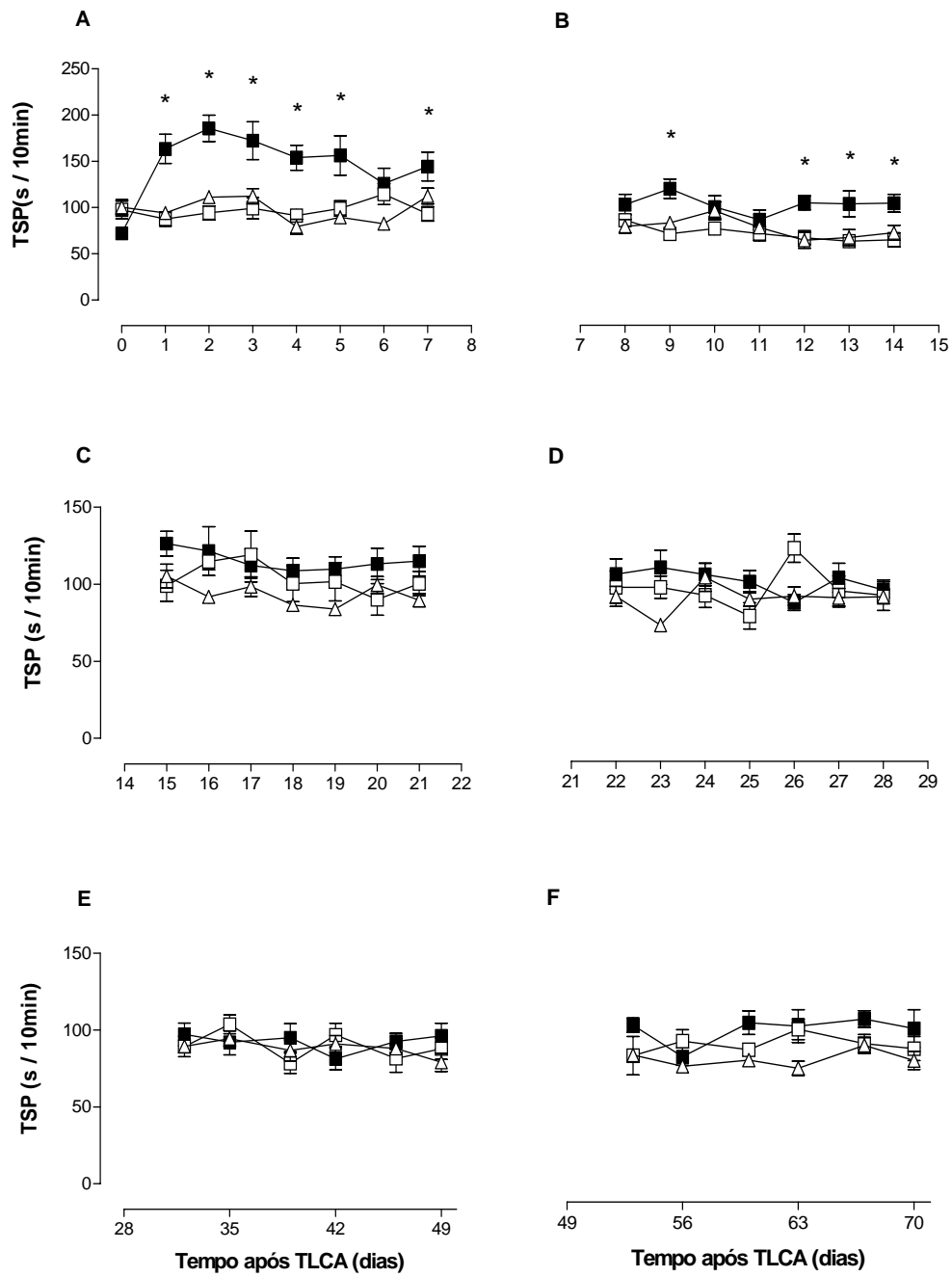


Figura 6: Cinética da dor articular na osteoartrite induzida por TLCA em ratos. (Δ) NAIVE, (\square) SHAM, (\blacksquare) OA. Dados expressos como média \pm e. p. m. de grupos de 6 animais. * $p < 0,05$ vs SHAM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).

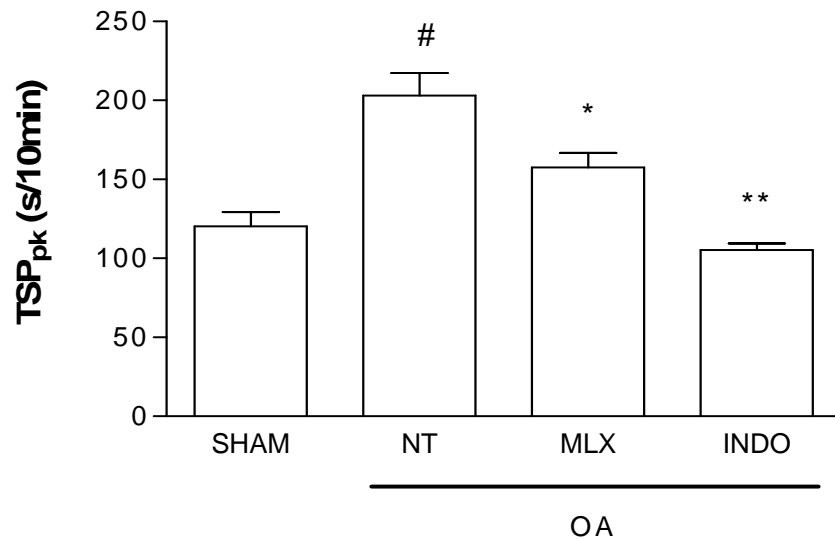


Figura 7: Efeito terapêutico sistêmico de inibidores de ciclooxigenases sobre o pico de dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. Meloxicam (MLX: 6 mg/kg/dia i.p.) e indometacina (INDO: 2mg/kg/dia s.c.) foram administrado a partir do 4º dia após TLCA, 30 min antes da avaliação da dor. Grupo não-tratado (NT) recebeu salina. O pico de dor (TSP_{pk}) foi determinado por avaliações diárias entre o quarto e o sétimo dias. Dados expressos como média ± e. p. m. de grupos de 6 animais. *p<0,01; **p<0,001 vs OA-NT; #p<0,001 vs SHAM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).

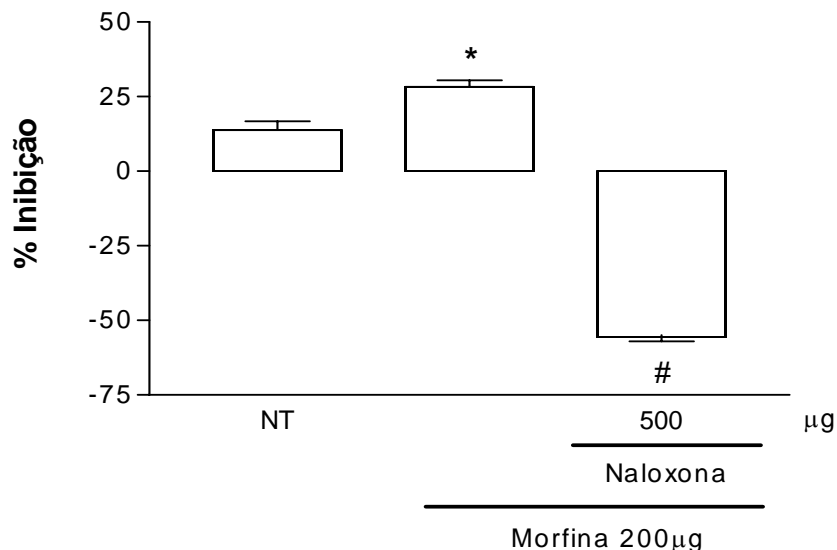


Figura 8: Efeito terapêutico local de agentes opióides sobre a dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. Morfina (200 µg i.art.) foi administrada no 4º dia após a TLCA, 30 min antes da avaliação da dor. Naloxona (500 µg i. art.) foi administrada 15 min antes de morfina. Grupo não-tratado (NT) recebeu salina. Dados expressos como média ± e. p. m. de 6 animais por grupo *p<0,05 vs NT; #p<0,001 vs Morfina 200 µg (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).

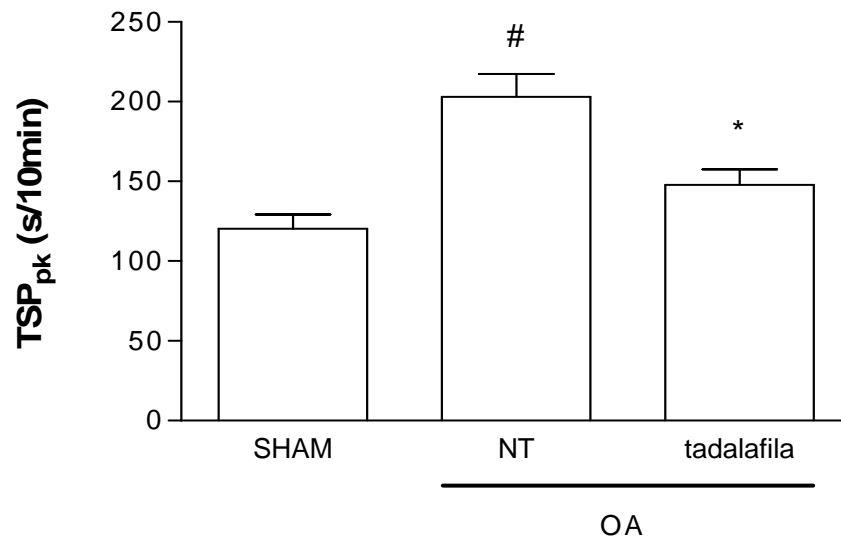


Figura 9: Efeito terapêutico de tadalafila sobre o pico de dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. Tadalafila (6 mg/kg/dia p.o.) foi administrada a partir do 4º dia após TLCA, 30 min antes da avaliação da dor. Grupo não-tratado (NT) recebeu salina. O pico de dor (TSP_{pk}) foi determinado por avaliações diárias entre o quarto e o sétimo dias. Dados expressos como média ± e. p. m. de 6 animais por grupo. *p<0,001 vs OA-NT; #p<0,001 vs SHAM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).

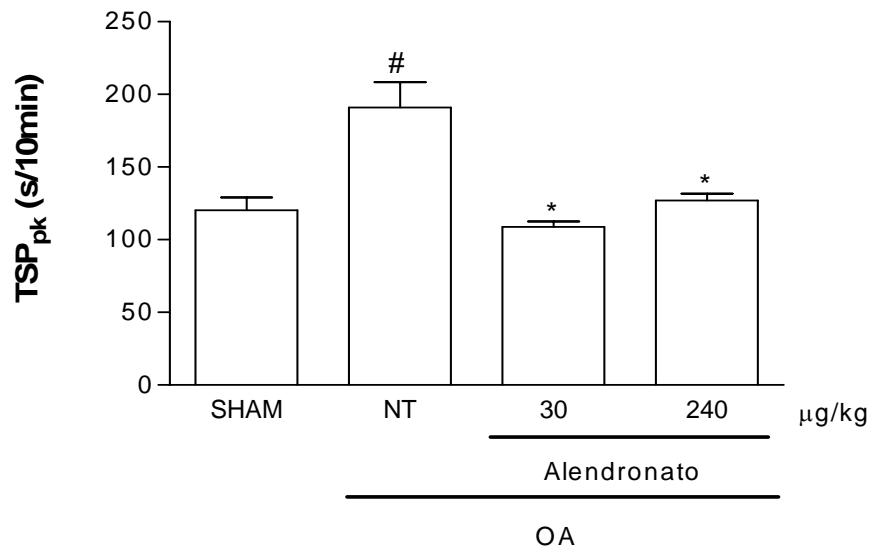


Figura 10: Efeito profilático sistêmico de alendronato sódico sobre a dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. Alendronato sódico (30 ou 240 µg/kg s.c.) foi administrado em intervalos de 3 dias, iniciando 3 dias antes da TLCA. Grupo não-tratado (NT) recebeu salina. O pico de dor (TSP_{pk}) foi determinado por avaliações diárias entre o quarto e o sétimo dias. Dados expressos como média ± e. p. m. de 6 animais por grupo. *p<0,05 vs OA-NT; #p<0,001 vs SHAM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).

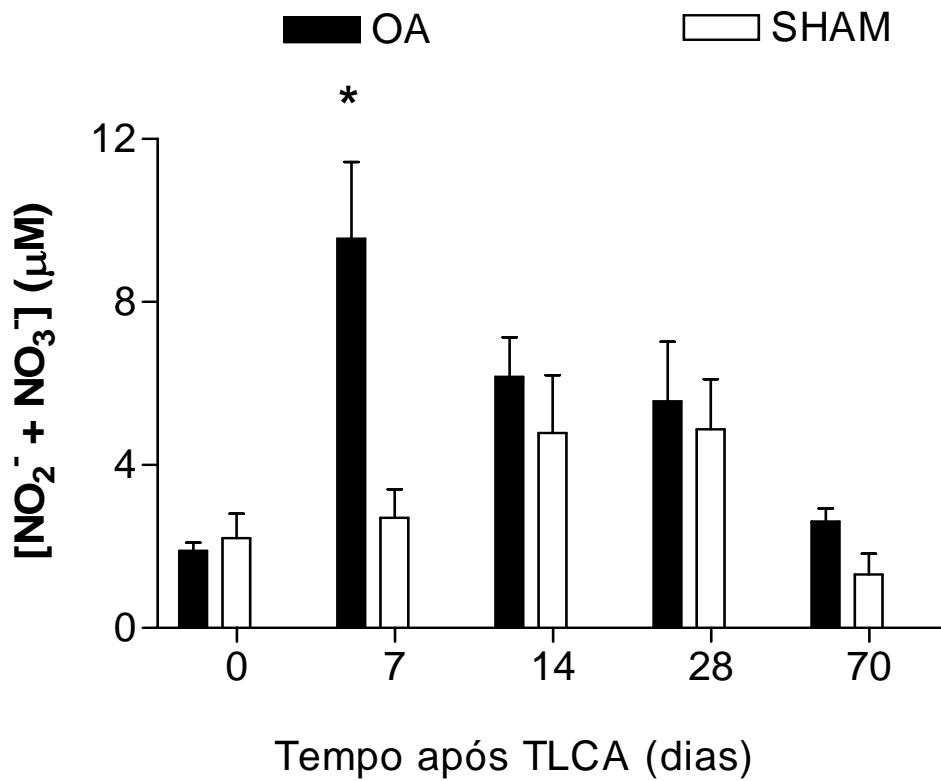


Figura 11: Liberação articular de óxido nítrico na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. As concentrações de nitrito total foram determinadas no lavado articular. Dados expressos como média \pm e. p. m. de grupos de 6 animais. * $p < 0,001$ vs SHAM 7 dias (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Bonferroni).

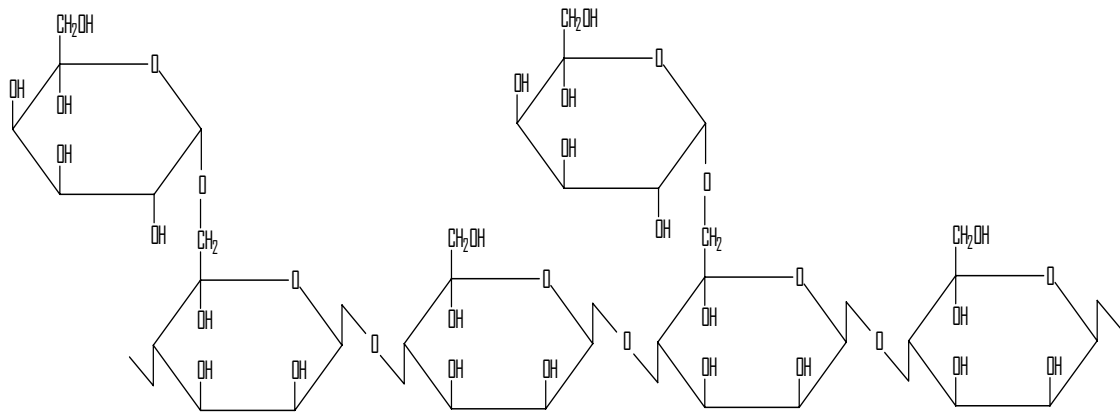
Tabela IV: Características físico-químicas da goma guar após modificação estrutural

	Goma guar não-modificada	Goma guar sulfatada	Goma guar oxidada
Grupo funcional inserido	-	-OSO ₃ H	-COOH
Grau de substituição (mol/mol de unidade monossacarídica)	-	0,60	0,36
Posição majoritária da inserção	-	C6 da galactose	C6 da manose
Viscosidade intrínseca [η] (dL/g)	6,2	4,9	2,2
Massa molar ponderal (M_w) (x 10⁶ g/mol)	3,87	2,79	2,62
Viscosidade aparente* (mPa x s)	58	39	9

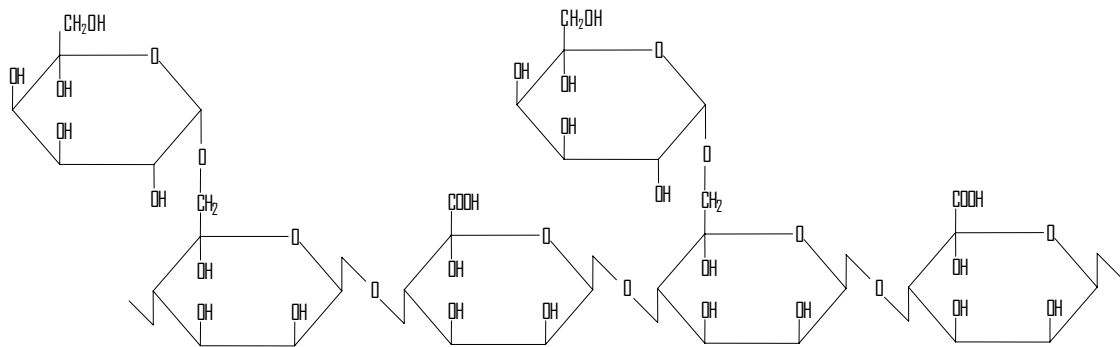
Fonte: Cunha, 2006.

*A viscosidade aparente foi determinada em solução (1% w/v), taxa de cisalhamento a 200 s⁻¹ e temperatura de 25°C.

A



B



C

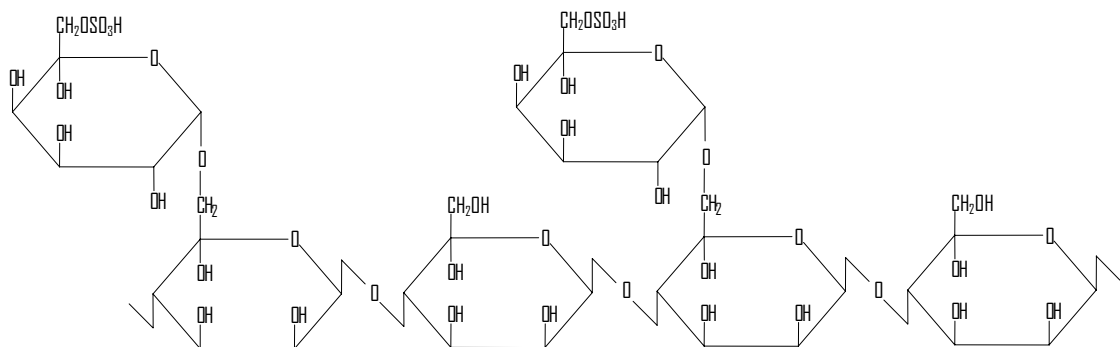


Figura 12: Estruturas modificadas da goma guar (GG). (A) GG não modificada, (B) GG oxidada (inserção de grupo carboxilato em C6 da manose) e (C) GG sulfatada (inserção de grupo sulfato em C6 da galactose).

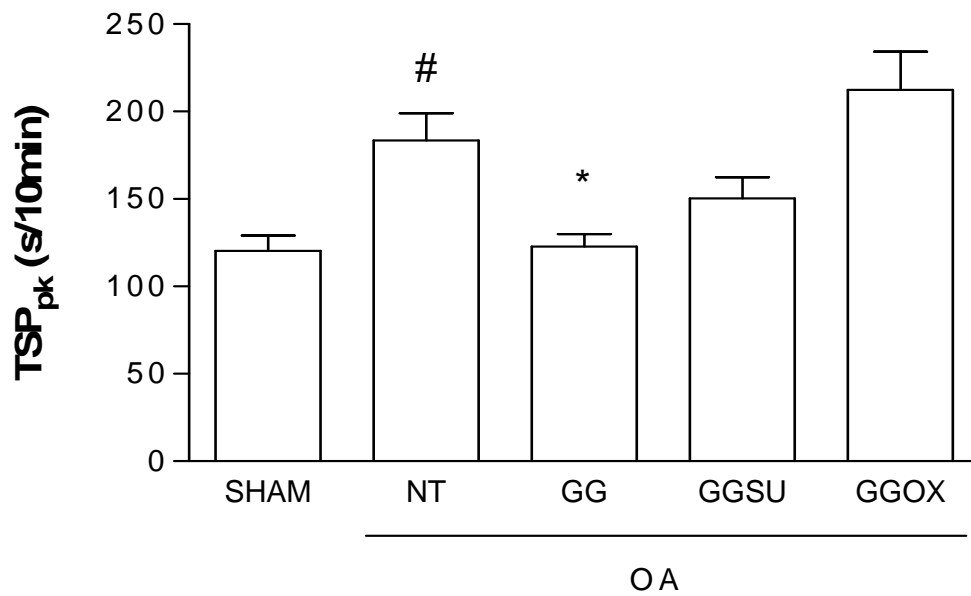


Figura 13: Efeito terapêutico local de preparações quimicamente modificadas de goma guar sobre a dor articular na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. 100 µg de goma guar inalterada, sulfatada ou oxidada foram administradas intra-articular no quarto dia após a TLCA. Grupo OA não-tratado (NT) recebeu veículo (salina i. art.). O pico de dor (TSP_{pk}) foi determinado por avaliações diárias entre o quarto e o sétimo dias. Dados expressos como média ± e. p. m. de 6 animais por grupo. *p<0,01 vs OA-NT; #p<0,01 vs SHAM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).

goma guar inalterada: $122,7 \pm 7,2s$; goma guar sulfatada: $150,3 \pm 12,0s$; goma guar oxidada: $212,4 \pm 21,9s$) (Figura 13).

A co-administração intra-articular de galactose (500 μ g) e goma guar (100 μ g), no quarto dia após a TLCA, reverte totalmente o efeito analgésico da galactomanana. Tal reversão não foi obtida por co-administração de manose (NT: $192,2 \pm 15,3s$; goma guar isolada: $128,0 \pm 5,8s$; goma guar + manose: $116,9 \pm 8,7s$; goma guar + galactose: $194,0 \pm 24,3s$) (Figura 14).

5. PROTEÓLISE DA CARTILAGEM FEMORAL

A figura 15A apresenta a cinética de digestão enzimática do pó cetônico obtido a partir de cartilagens desidratadas de animais NAIVE, mediante uso de PROLAV 750^R. Observamos que a taxa máxima de degradação foi alcançada às 48 h, sendo invariável após tal período. Pela eletroforese em gel de agarose, com tampão diaminopropano-acetato, verificou-se uma intensa banda característica para os condroitin-sulfatos, os GAG majoritariamente presentes na matriz da cartilagem. A banda relativa ao keratan-sulfato, minoritariamente presente na matriz, não foi evidente (Figura 15B). Nos períodos estudados, a concentração de CS tecidual determinada se manteve invariável, independente, portanto, da quantidade de material degradado (Figura 15C).

6. CARACTERIZAÇÃO DA LESÃO DA CARTILAGEM ARTICULAR NA FASE CRÔNICA DA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR TLCA EM RATOS

O conteúdo de condroitin-sulfato (CS) presente na cartilagem femoral desidratada de animais dos grupos OA e SHAM, em distintos períodos, está ilustrado na figura 16. Os fatores grupo e tempo de indução são influentes na variabilidade dos dados ($p=0,00329$ e $p<0,0001$, respectivamente), havendo interação entre eles ($p=0,0034$). Aos 70 dias, foi observado um aumento significativo na quantidade de CS do grupo OA, em relação ao SHAM (OA: $77,7\mu\text{g}/\text{mg} \pm 3,4\mu\text{g}/\text{mg}$; SHAM: $50,7\mu\text{g}/\text{mg} \pm 4,5\mu\text{g}/\text{mg}$; $p<0,001$). A concentração de CS na cartilagem dos animais do grupo SHAM permaneceu invariável durante o período estudado.

Verificou-se que o CS extraído dos animais do grupo OA apresenta tanto mobilidade eletroforética quanto tempo de retenção significativamente inferiores ao CS dos animais do grupo SHAM ($p = 0,0039$; $p = 0,0142$, respectivamente), indicando presença de cadeias polissacarídicas de maior massa, ou seja, mais longas (Tabela V). Importante observar que os parâmetros eletroforético e cromatográfico correlacionam-se linearmente, demonstrando a concordância entre ambos os métodos (Figura 17A). Mais ainda, as correlações entre as variáveis concentração de CS em tecido seco *versus* mobilidade, ou tempo de retenção, sugerem que as cartilagens com maior teor de CS, são também aquelas que portam cadeias mais longas do mesmo (Figuras 17B e 17C).

A tabela VI apresenta a análise histopatológica da cartilagem femoral, realizada segundo critérios OARSI em animais sacrificados setenta dias após o procedimento cirúrgico no joelho direito. Lesões graves foram encontradas em animais do grupo OA, desde escavações na zona média da cartilagem a formação de osteófitos centrais, com mediana igual a 6,0 (deformação do contorno ósseo). Lesões que conferem menor grau, como edema, fibrilação da superfície e alterações celulares (*clustering*, perda de polarização ou necrose) e reparos com fibrocartilagem, também foram encontradas. As alterações comprometeram mais de 50% da superfície articular, medianamente (estágio 4). Ambos os côndilos foram acometidos por lesões de gravidade e extensão semelhantes. O escore final dos fêmures do grupo OA apresentou uma mediana significativamente superior ao grupo SHAM (respectivamente 24,0 e 3,0; $p < 0,001$). Na figura 18, são ilustradas fotomicrografias representativas para cada grupo.

7. EFEITO CONDROPROTETOR DA GOMA GUAR EM TRATAMENTO TERAPÊUTICO INTRA-ARTICULAR NA FASE CRÔNICA DA OSTEOARTRITE INDUZIDA POR TLCA EM RATOS

A figura 19 apresenta a prevenção das alterações do condroitin-sulfato (CS) da cartilagem femoral, ocorridas 70 dias após a TLCA, obtida pela administração intra-articular semanal de goma guar em solução (100 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$), do 14º ao 63º dia. Goma guar preveniu significativamente a elevação da concentração tecidual de CS (OA-NT: $74,1 \pm 4,6 \mu\text{g}/\text{mg}$; goma guar: $43,8 \pm 4,7 \mu\text{g}/\text{mg}$; $p < 0,001$), bem como a redução da mobilidade relativa, isto é, preveniu o aumento da massa molar desse GAG (OA-NT: $0,98 \pm 0,02$; goma guar: $1,18 \pm$

0,03; $p < 0,001$). Os escores histopatológicos também foram reduzidos pelo tratamento com goma guar [OA-NT: 24,0 (24,0-26,0); goma guar: 7,0 (2,5-18,0); $p < 0,05$] (Figura 20).

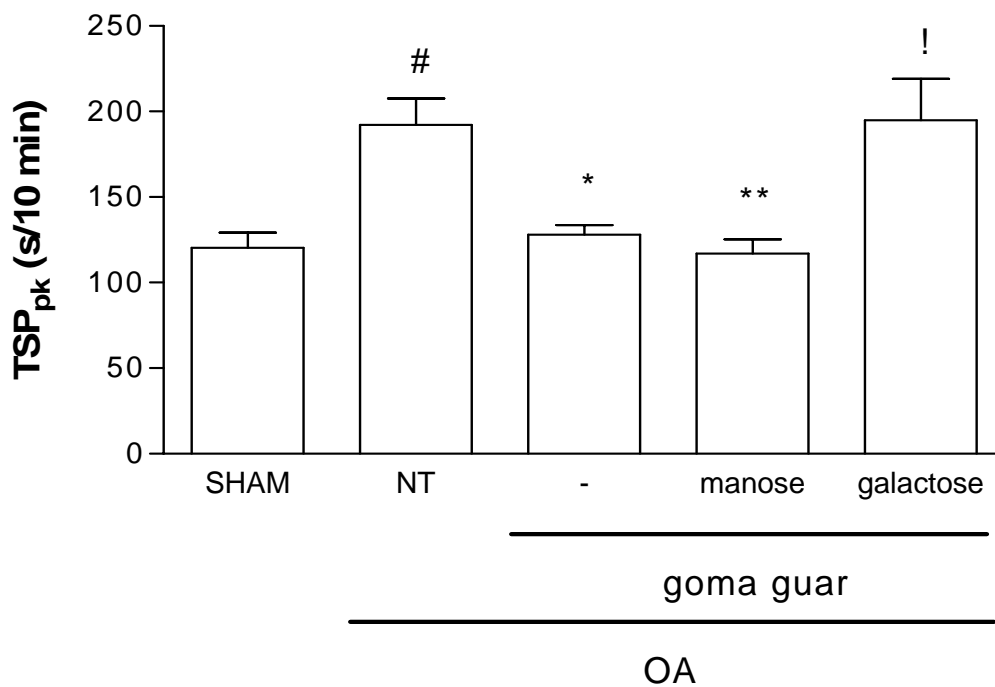


Figura 14: Reversão por galactose do efeito analgésico terapêutico da goma guar na fase inicial da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. 100 µg de goma guar foram administrados i. art. isoladamente ou com manose (500 µg) ou galactose (500 µg) no quarto dia após TLCA. Grupo OA não-tratado (NT) recebeu veículo (salina i. art.). O pico de dor (TSP_{pk}) foi determinado por avaliações diárias entre o quarto e o sétimo dias. Dados expressos como média ± e. p. m. de 6 animais por grupo. *p<0,01; **p<0,001 vs OA-NT; !p<0,01 vs OA-goma guar; #p<0,01 vs SHAM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).

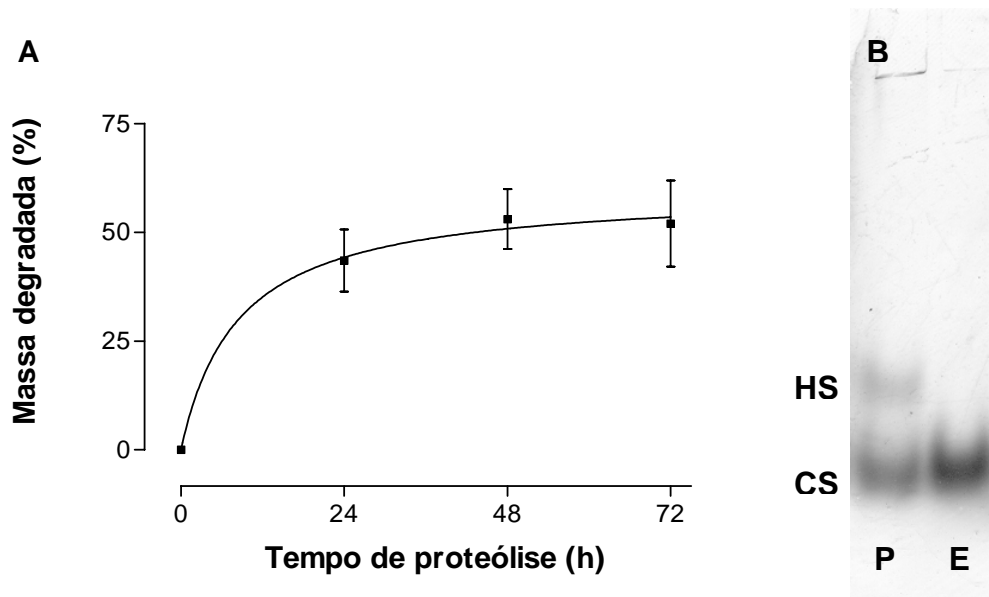


Figura 15: Proteólise enzimática da cartilagem femoral. (A) Amostras de cartilagem femoral de animais não manipulados foram submetidas à proteólise com PROLAV 750^R, por distintos períodos de tempo. (B) Eletroforese em gel de agarose dos GAG extraídos após 72 h de digestão com PROLAV 750^R. O tampão diaminopropano-acetato 50 mM (pH 9,00) discrimina as bandas do condrotim-sulfato (CS), dermatam-sulfato e keratam-sulfato (não utilizados) e heparan-sulfato (HS). P: 5,0 μg de cada padrão (C4S, C6S e HS), E: 5,0 μL do extrato de um espécime. (C) Concentração de CS em tecido seco, obtidas após distintos períodos de degradação com PROLAV 750^R. A quantificação foi realizada a partir de uma curva-padrão de C6S. Dados expressos como média \pm e. p. m. de 6 animais por cada período.

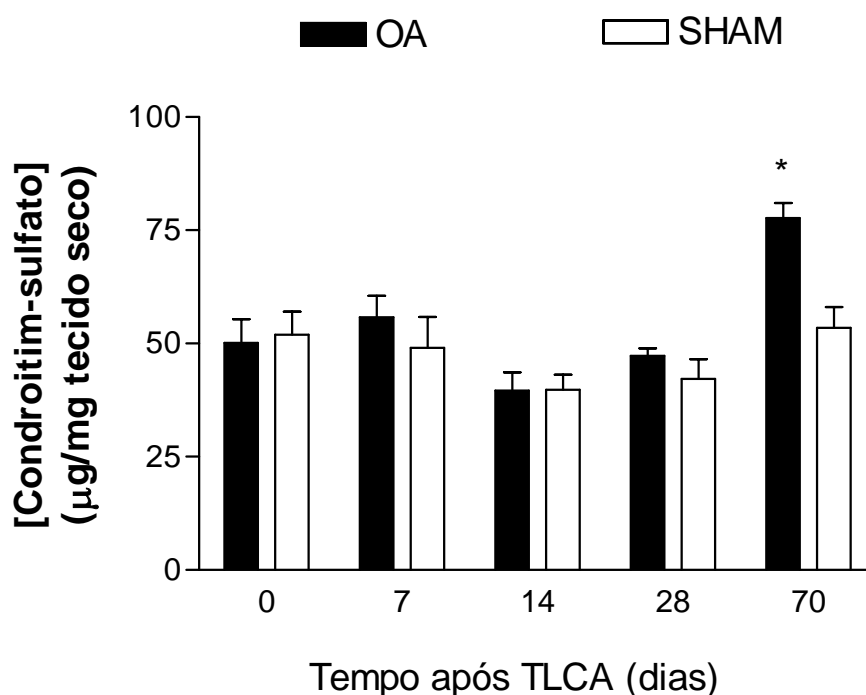


Figura 16: Conteúdo de condroitim-sulfato presente na matriz da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. Amostras desidratadas de cartilagem dos côndilos femorais foram submetidas à proteólise com PROLAV 750^R, por 48h. Os GAG extraídos de cartilagens de côndilos femorais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, em tampão diaminopropano-acetato 0,05M (pH 9,00), evidenciando exclusivamente a banda dos condroitin-sulfatos. Dados expressos como média \pm e. p. m. de 6 animais por grupo. * $p < 0,0001$ vs SHAM 70 dias (ANOVA bivariada seguida pelo teste de Bonferroni).

Tabela V: Avaliação indireta da massa molar do CS extraído da cartilagem femoral de grupos experimentais crônicos.

Amostra	Mobilidade relativa	Tempo de retenção de pico (min)
C4S ($4,55 \times 10^5$ g/mol)	1,00	16,93
C6S ($5,88 \times 10^5$ g/mol)	0,71	16,53
SHAM	$1,10 \pm 0,02$	$17,11 \pm 0,04$
OA	$0,98 \pm 0,02$ **	$16,94 \pm 0,03$ *

Animais do grupo OA foram submetidos à TLCA e sacrificados após 70 dias. Um grupo falso-operado (SHAM) de mesmo período foi realizado. 10,0 μg de CS foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% w/v, com tampão barbital 60mM (pH 8,60), para determinação da mobilidade relativa, ou à cromatografia de alta eficiência por exclusão de tamanho (HPSEC) em NaNO_3 0,1 M, para determinação do tempo de retenção de pico. C4S e C6S (SIGMA) foram utilizados como padrões de massa molar ponderal. Dados representam média \pm e. p.m. de 6 animais por grupo. * $p = 0,0142$; ** $p = 0,0039$ vs SHAM (teste t de Student).

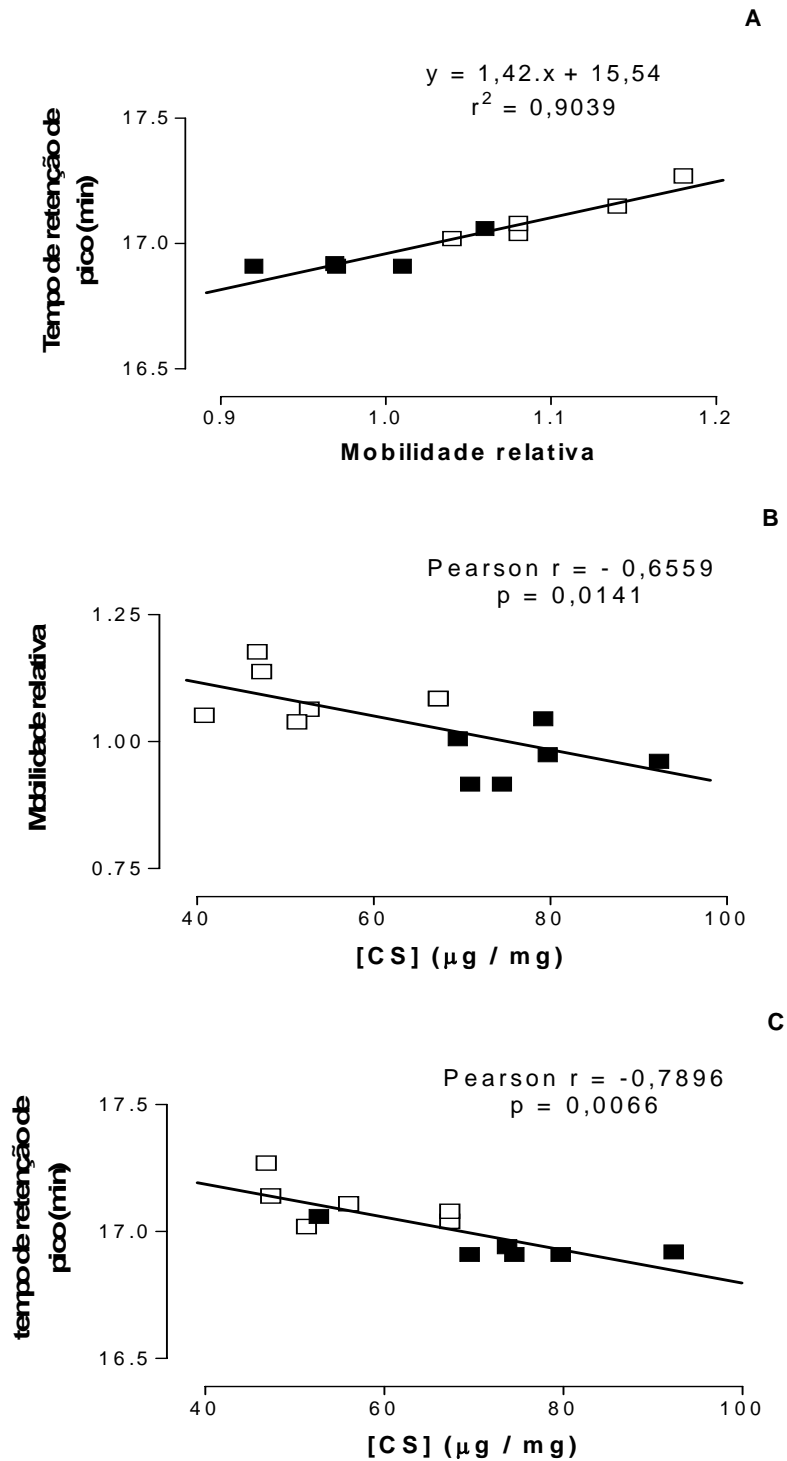


Figura 17: Análises de correlação. (A) Regressão linear entre as variáveis mobilidade relativa em PAGE vs tempo de retenção de pico em HPSEC. (B) Concentração de CS em tecido seco vs mobilidade relativa. (C) Concentração de CS em tecido seco vs tempo de retenção de pico. (■) CS da cartilagem de animais do grupo OA, 70 dias após TLCA. (□) CS da cartilagem de animais falso-operados (SHAM) de mesmo período.

Tabela VI: Análise histopatológica da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos.

Grupo	Compartimento	Grau	Estágio	Escore final
OA	Medial	6,0 (2,0-6,0)*	4 (2-4)*	24,0 (22,0-24,0)*
	Lateral	6,0 (4,5-6,0)**	4 (2-4)**	23,0 (9,0-26,0)**
	Inteiro	6,0 (6,0-6,5)**	4 (2-4)**	24,0 (24,0-26,0)***
SHAM	Medial	2,0 (1,0-2,5)	2 (1-2)	4,0 (1,0-5,0)
	Lateral	3,0 (1,0-3,0)	1 (1-2)	3,0 (1,5-6,0)
	Inteiro	3,0 (1,0-3,0)	1 (1-2)	3,0 (1,0-6,0)

Animais do grupo OA foram submetidos à TLCA e sacrificados após 70 dias. Um grupo falso-operado (SHAM) de mesmo período foi realizado. O dano estrutural foi avaliado segundo critérios recomendados pela OARSI (PRITZKER *et al.*, 2006). Grau refere-se à profundidade das lesões, enquanto estágio, à extensão das mesmas. O produto grau x estágio confere o escore final para cada animal. Dados expressos como mediana (intervalo do rol) de 6 animais por grupo. *p<0,05; **p< 0,01 , ***p<0,001 vs SHAM (teste de Mann-Whitney).

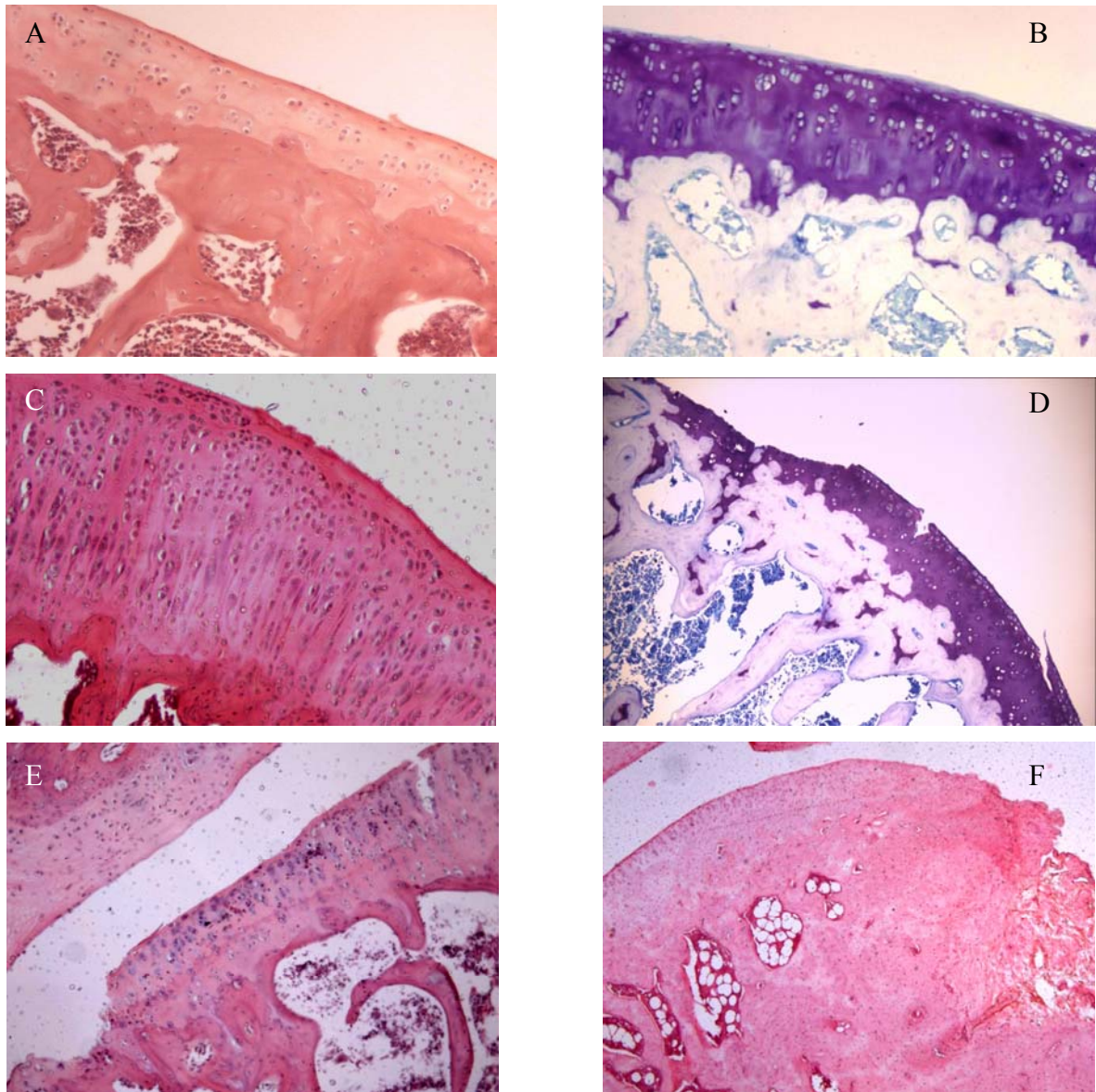


Figura 18: Fotomicrografia da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. Grupo SHAM, em H&E (A) e azul de toluidina (B). Grupo OA em H&E (C) e azul de toluidina (D). (E) Alterações em animal OA, ilustrando fissura e desnudamento do osso subcondral. (F) Osteófito em animal OA. Aumento de 100x, exceto em F (40X).

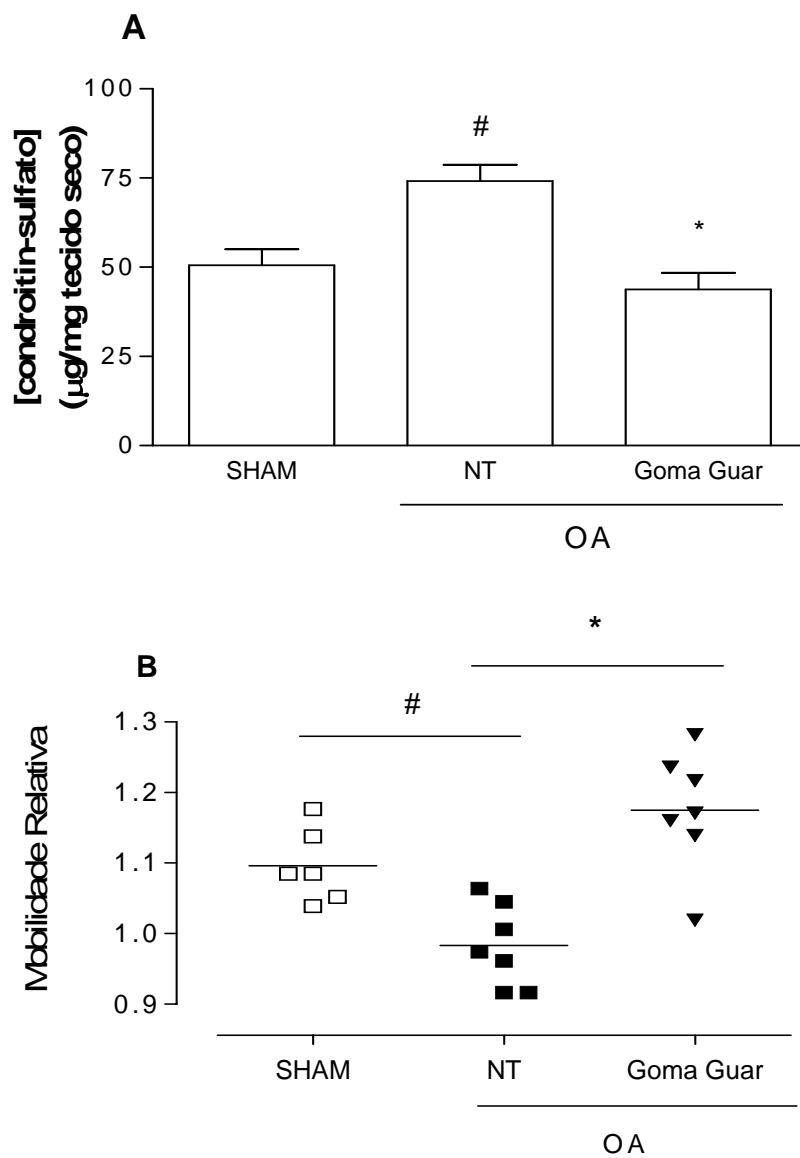


Figura 19: Tratamento terapêutico intra-articular com goma guar previne alterações do condroitin-sulfato da cartilagem femoral na fase crônica da osteoartrite induzida por TLCA em ratos. 100 µg (i.art.) de goma guar foram administrados semanalmente, iniciando no 14º após a TLCA, até o 63º dia, totalizando oito injeções. Grupos OA não-tratado (NT) e SHAM receberam veículo (salina i. art.). Os animais foram sacrificados no 70º dia. (A) Efeito sobre a elevação tecidual do CS. Dados expressos como média ± e. p. m. de 6 animais por grupo. (B) Efeito sobre a redução da mobilidade relativa em gel de poliacrilamida. A linha horizontal representa a média dos dados individuais. * $p < 0,001$ vs OA-NT; # $p < 0,05$ vs SHAM (ANOVA univariada seguida pelo teste de Tukey).

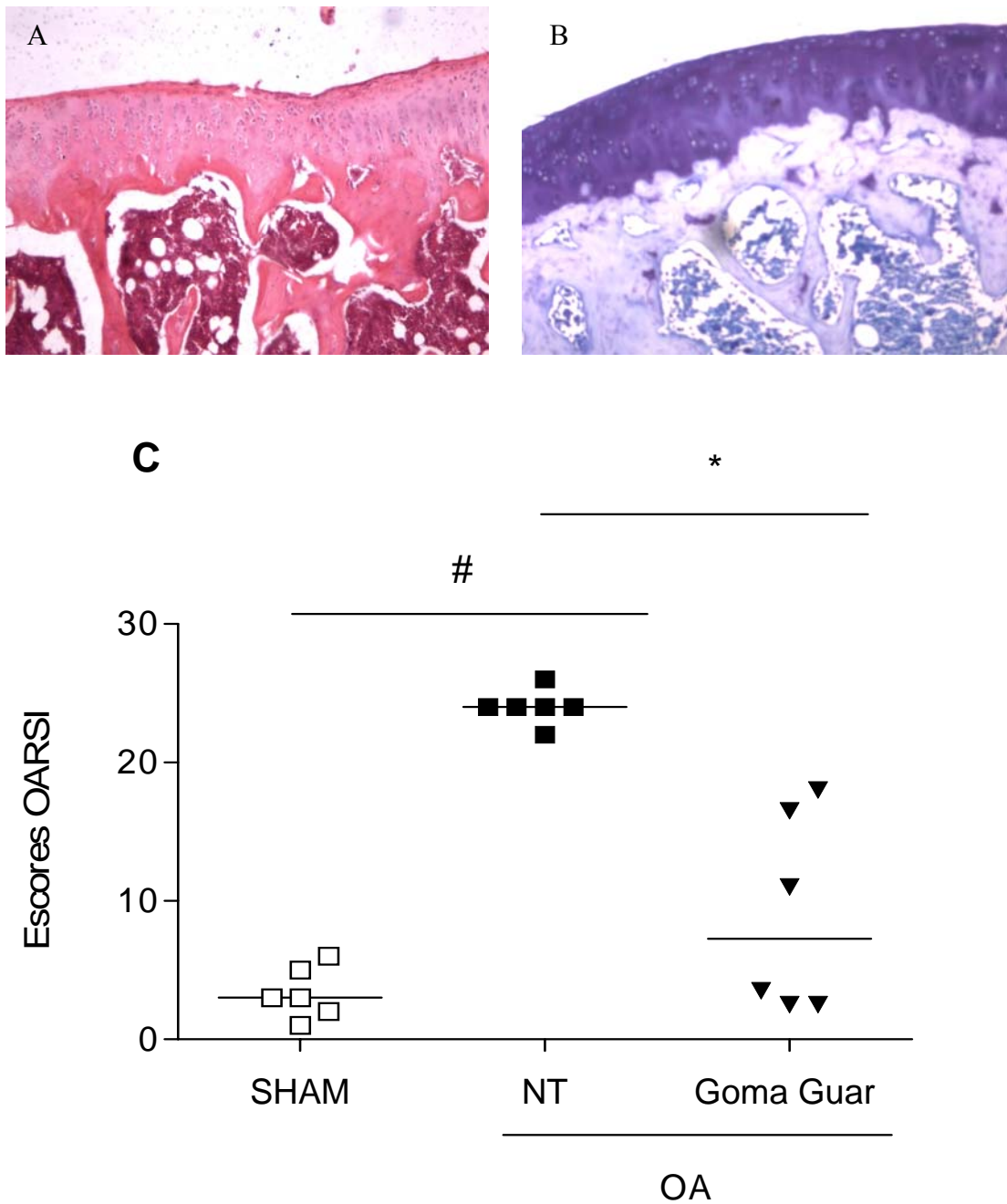


Figura 20: Efeito terapêutico intra-articular da goma guar sobre as alterações histopatológicas na osteoartrite induzida por TLCA em ratos. 100 μ g (i.art.) de goma guar foram administrados semanalmente, iniciando no 14^o após a TLCA, até o 63^o dia, no total de oito injeções. Grupos OA não-tratado (NT) e SHAM receberam veículo (salina i. art.). Os animais foram sacrificados no 70^o dia. (A) e (B) Fotomicrografias de animais tratados com GG, nas colorações de H&E e azul de toluidina, respectivamente (aumento 100x). (C) Dados individuais de 6 animais por grupo. O dano estrutural foi avaliado segundo critérios recomendados pela OARSI (PRITZKER *et al.*, 2006). A linha horizontal representa a mediana dos valores obtidos. * $p < 0,05$ vs OA-NT; # $p < 0,05$ vs SHAM (teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunns).

Discussão

Ratos submetidos à TLCA exibem alterações tanto quantitativas quanto qualitativas do condroitin-sulfato (CS) extraído da matriz da cartilagem articular, quando comparados a animais controles falso-operados. Setenta dias após a indução da OA, a concentração de CS na matriz da cartilagem encontra-se elevada. A massa molar desse glicosaminoglicano também está significativamente aumentada, conforme observado pelas técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e cromatografia por exclusão de tamanho (HPSEC). Tais eventos bioquímicos estiveram associados aos danos histopatológicos observados na cartilagem e no osso subcondral dos animais submetidos a esse modelo de OA experimental. A administração intra-articular terapêutica da galactomanana da goma guar, um polissacarídeo, realizada semanalmente entre o 14º e o 63º dias após a TLCA, preveniu, de forma estatisticamente significativa, as alterações bioquímicas registradas na cartilagem articular em animais submetidos à TLCA, bem como promoveu redução dos escores histopatológicos para a lesão articular. Ao nosso conhecimento, o presente trabalho demonstra de maneira inédita o efeito condroprotetor *in vivo* de um polissacarídeo neutro em um modelo experimental de OA.

A integridade do ligamento cruzado anterior é essencial à estabilidade articular do joelho, por reduzir a intensidade de translação anterior e rotação tibiais (LI, SUGGS & GILL, 2002). A desestabilização secundária à TLCA tem sido proposta como um modelo para estudo de alterações articulares semelhantes às ocorridas na OA humana (BRANDT *et al.*, 1991), que incluem fibrilação superficial, desorganização da rede de colágeno e proteoglicanos, espessamento da cápsula articular e osteofitose (SETTON *et al.*, 1999). Em estudo prévio, nosso grupo padronizou um método objetivo, independente do observador, para avaliar hipernocicepção em ratos submetidos à TLCA (CASTRO *et al.*, 2006). As abordagens para hipernocicepção em modelos para OA em ratos, descritas até então, avaliavam a distribuição do peso corporal entre as patas traseiras de animais estáticos (KOBAYASHI *et al.*, 2003; POMONIS *et al.*, 2005), podendo acrescentar a tal parâmetro avaliações para anodínia ou hiperalgisia mecânicas (COMBE, BRAMWELL & FIELD, 2004; FERNIHOUGH *et al.*, 2004). O método desenvolvido em nosso laboratório, entretanto, destaca-se por avaliar a dor mediante surgimento de incapacitação articular associada à deambulação, assemelhando-se mais proximamente ao fenômeno encontrado na doença humana, possibilitando-nos sugerir um índice para lesão funcional da articulação. Durante quatro semanas de observação (CASTRO *et al.*, 2006), registrou-se incapacitação articular nas duas primeiras semanas após a TLCA. Na hipótese de que a incapacitação, refletindo dor articular, ressurgisse em estágios mais avançados do modelo, quando existem significativas

alterações estruturais, decidimos expandir o período de observação até setenta dias. Entretanto, não conseguimos demonstrar incapacitação na fase mais crônica do modelo. Admite-se que animais submetidos à TLCA podem desenvolver mecanismos de adaptação da marcha, havendo participação das demais estruturas articulares no sentido de atenuar a instabilidade da junta e poupar a pata afetada. Cães submetidos à TLCA exibem redução temporária da fase estacionária da marcha (VILENSKY *et al.*, 1994), enquanto que um aumento na extensão do joelho ocorre por todo período de observação no modelo (VILENSKY *et al.*, 1994; O'CONNOR *et al.*, 1999). A extensão aumentada do joelho provavelmente reduziria a demanda sobre o músculo quadríceps quando do pouso da pata acometida sobre o solo, reduzindo a translação anterior tibial. Análises de deambulação têm mostrado adaptações semelhantes em humanos portadores de deficiência do ligamento cruzado anterior (ANDRIACCHI & BIRAC, 1993). Além disso, em gatos submetidos à TLCA, o surgimento de hipertrofia e fibrose da cápsula articular minimizam a translação tibial anterior, o que poderia aliviar as alterações da marcha associadas à dor (HERZOG *et al.*, 1993; SUTER *et al.*, 1998). É possível especular que tais adaptações também ocorram em ratos, o que impossibilitaria registrar o fenômeno doloroso, tal como utilizamos no presente estudo. Ademais, alterações estruturais nem sempre estão associadas a agravamento sintomatológico. Em humanos portadores de OA, relatou-se que dois em cada cinco portadores de lesões radiológicas graves seguem assintomáticos (DIEPPE & LOHMANDER, 2005), e a correlação entre sintoma e lesão não está suficientemente elucidada, mesmo em modelos experimentais (VERMEIRSH *et al.*, 2007). Convém ainda observar que o teste para incapacitação articular avalia o tocar ou não da pata do animal sobre o cilindro giratório (TONUSSI & FERREIRA, 1992), não fornecendo informações quanto à intensidade da pressão exercida pela pata contra o solo. Assim, uma resposta do tipo “quantal”, como a obtida nesse teste, limita-o frente à percepção de alterações mais sutis na deambulação. Além disso, é significativo o aumento de peso dos animais (cerca de 85%), por crescimento e envelhecimento naturais, durante os experimentos crônicos. Um fator como esse não pode ser desconsiderado, uma vez que a agilidade dos animais fica comprometida e a sobrecarga de peso sobre as patas, especialmente as traseiras, passa a incrementar a demanda de utilização das mesmas. De fato, a fim de reduzir esse viés, nos experimentos realizados em nosso laboratório, com o modelo de artrite induzida por zymosan em ratos, cuja magnitude da hipernocicepção suplanta significativamente aquela obtida por TLCA, evita-se utilizar animais cujo peso ultrapasse 220 g.

Na literatura consultada, há poucos relatos incluindo avaliação de dor em OA experimental e as metodologias empregadas avaliam predominantemente modelos quimicamente induzidos, em especial a injeção intra-articular de iodoacetato de sódio, um composto que inibe a glicólise em condrócitos, levando à necrose dessas células (KOBAYASHI *et al.*, 2003). Esse modelo tem por característica marcante provocar alterações graves na cartilagem em curto espaço de tempo: em apenas duas semanas já se podem visualizar, por exemplo, áreas desnudas da cartilagem, com exposição do osso subcondral. Importantes fenômenos inflamatórios também se fazem presentes, tais como infiltração da sinóvia por células inflamatórias e proliferação das células sinoviais (KOBAYASHI *et al.*, 2003), bem como edema sub-agudo da articulação (FERNIHOUGH *et al.*, 2004). Embora o parâmetro nociceptivo se estenda (COMBE, BRAMWELL & FIELD, 2004), são nas fases subagudas que se obtêm os registros máximos (POMOVIS *et al.*, 2005). Assim, inflamação intensa, como nesse último modelo, constitui um argumento contrário à sua utilização para estudo de dor em OA experimental, na qual as alterações articulares se dão gradualmente, na presença de processo inflamatório discreto. No tocante ao estudo de hipernocicepção em modelos cirúrgicos, os relatos tornam-se ainda mais escassos. FERNIHOUGH *et al.* (2004) intentaram avaliar hiperalgesia mecânica e alodínia tátil em ratos Wistar submetidos à meniscectomia parcial, conseguindo observar apenas esta última. À semelhança desse estudo, BOVE *et al.* (2006) também registraram alodínia persistente em ratos Lewis submetidos à meniscectomia e secção do ligamento colateral medial.

Havíamos postulado (CASTRO *et al.*, 2006) que a instabilidade articular seria capaz de alterar o padrão fisiológico de distribuição de pressões aplicadas sobre as estruturas articulares, deflagrando eventos fisiopatológicos, como liberação de mediadores inflamatórios, p.ex. prostanóides e NO, desencadeando hipernocicepção. Desse modo, quantificamos o nitrito, metabólito do NO, nos lavados articulares de animais em distintos períodos de indução da OA. Embora níveis de nitrito estivessem presentes ao fim da primeira semana, coincidindo com a hipernocicepção, não houve alteração dos níveis de NO nos animais submetidos à TLCA, quando comparados a controles, ao fim dos setenta dias. Concentrações sinoviais inalteradas de nitrito foram também descritas em cães portadores de OA decorrentes de lesão do ligamento cruzado anterior (HAY *et al.*, 1997; SPRENG *et al.*, 2001). Neste último trabalho, em contrapartida, detectaram-se elevações séricas e urinárias de nitrito, atribuídas a clearance sinovial desse metabólito do NO, tendo sido encontrada associação, naquele estudo, de aumento dos níveis de nitrito na urina dos animais e maior

gravidade das lesões articulares. A possibilidade de esse processo ocorrer no modelo de TLCA, portanto, ainda merece ser investigada.

A modulação farmacológica por compostos analgésicos e/ou antiinflamatórios clássicos é importante para a caracterização de um fenômeno hipernociceptivo. Indometacina e meloxicam, antiinflamatórios não esteroidais, inibiram significativamente a dor articular. Na intenção de ainda melhor caracterizá-la, testamos a resposta do modelo à morfina, agonista opióide clássico. No tocante a essa modulação farmacológica, algumas precauções fizeram-se necessárias. Em estudo piloto com ratos após TLCA (dados não mostrados), doses sistêmicas diárias de morfina (2 ou 4 mg/kg i.p.), notadamente efetivas na incapacitação articular por carragenina (TONUSSI & FERREIRA, 1992) não promoveram a analgesia pretendida. Elevar a dose de morfina para 6 mg/kg i.p. mostrou-se inadequado, por causar a sedação e aparente comprometimento motor dos animais. Ademais, poderia ocorrer tolerância a morfina, após sua administração repetitiva em doses elevadas (OUELLET & POLLACK, 1995). Para dirimir tais inconvenientes, efetuamos a administração local de morfina em dose única (200 µg) no quarto dia após a TLCA, expressando os resultados em porcentual de redução da dor (FERNIHOUGH *et al.*, 2004). Convém explicitar que foram incluídos nessa avaliação apenas aqueles animais que exibiram, no quarto dia após TLCA, TSP em pré-tratamento maior ou igual a 150 s, condição satisfeita por 83% dos animais. Tal cautela exclui a ocorrência de resultado falso-positivo, ou seja, de atribuir ao efeito da morfina uma redução no TSP que, na verdade, poderia dever-se a uma indução inadequada da TLCA, culminando em um animal não incapacitado. Feitas as considerações acima, encontramos que a administração local de morfina inibiu a dor articular. Este efeito foi revertido pela administração combinada de morfina e naloxona, antagonista do receptor μ -opióide. Além da indicação de participação de opióides endógenos na modulação da dor articular, esse resultado reforça a similaridade da dor, conforme mensurada nesse modelo, com aquela observada em humanos (BRANDT, 2004). Mais ainda, a resposta local à morfina argumenta em favor de um fenômeno de dor, mais que um componente comportamental na incapacitação articular observada.

Na TLCA em ratos, demonstramos a inibição de dor articular via tratamento profilático, mas não terapêutico, com inibidores da síntese de NO (CASTRO *et al.*, 2006). Esse efeito chamou-nos a atenção, uma vez que nosso grupo já havia descrito um comportamento semelhante no modelo de artrite por zymosan em ratos (ROCHA *et al.*, 2002). Assim, decidimos investigar o envolvimento da via L-Arg:NO:cGMP em um possível efeito dual, como observado no trabalho acima citado. A administração sistêmica terapêutica de tadalafila, inibidor da degradação do cGMP pela fosfodiesterase 5, promove

antinocicepção em ratos sob TLCA. A exacerbação dos efeitos do NO por inibição da remoção de seu segundo mensageiro, torna plausível atribuir ao NO endógeno uma modulação dual sobre a hipernocicepção nesse modelo. Descrições detalhadas sobre a antinocicepção por inibidores de fosfodiesterase já foram realizadas para sildenafil (JAIN *et al.*, 2001), fármaco protótipo do grupo.

Em face de recentes relatos sugerindo o efeito analgésico de bisfosfonatos, como o alendronato sódico, na OA humana (CARBONE *et al.*, 2004), além da ação condroprotetora e inibidora da osteofitose no mesmo modelo em ratos que utilizamos (HAYAMI *et al.*, 2004), investigamos o efeito dessa substância no nosso modelo, obtendo analgesia significativa. Os mecanismos envolvidos nesse processo, entretanto, ainda carecem de investigação.

Em trabalho recentemente publicado (CASTRO *et al.*, 2007), avaliamos a eficácia analgésica da goma guar no modelo de TLCA em ratos, que se mostrou similar àquela obtida pelo Hilano G-F 20®, produto comercial utilizado na viscosuplementação humana. Na ocasião, sugerimos que a analgesia observada devia-se a uma ação farmacológica dessa galactomanana e não pelas propriedades reológicas da preparação. No intuito de investigarmos tal possibilidade, avaliamos o impacto de alterações estruturais sobre a atividade analgésica da goma guar. A introdução dos grupos sulfato e carboxilato conferem cargas negativas repetitivas a sua estrutura. Tais modificações tornaram-na desprovida de efeito analgésico. Embora as modificações estruturais modifiquem os parâmetros de viscosidade das soluções, não se pode descartar que as propriedades farmacológicas do composto tenham sido também comprometidas. No intuito de responder a esse questionamento, vale recordar que o polissacarídeo de goma guar exerce efeito tanto em preparação reticulada altamente viscosa (gel), quanto apenas em solução, cuja viscosidade é cerca de 850 vezes inferior ao gel (CASTRO *et al.*, 2007). Uma viscosidade alta parece não ser, portanto, condição indispensável para a eficácia. Os decréscimos na viscosidade aparente entre a solução de guar não-modificada e de guar sulfatada ou oxidada (carboxilada) são muito pequenos (1,5 e 6,4 vezes, respectivamente), se comparados àquele entre o gel e a solução não-reticulada, parecendo então insuficientes para justificar o efeito da viscosidade na perda da eficácia. Mais provável é pensar na hipótese farmacológica envolvendo a ligação da estrutura química inalterada a um receptor e que as modificações estruturais dificultem tal interação. Para confirmarmos essa hipótese, procedemos à co-administração intra-articular do polissacarídeo e seus monossacarídeos constituintes (manose e galactose). Encontramos a reversão total do efeito da goma guar apenas pela galactose, e nenhuma reversão pela manose, sugerindo fortemente que a analgesia do polissacarídeo se deva à sua ligação a um sítio de

reconhecimento específico para galactose. É sabido que certas proteínas ligantes à galactose (galectinas), participantes em mecanismos de sinalização intracelular (RABINOVICH *et al.*, 2007), estão presentes em tecidos articulares e parecem participar na fisiopatologia de artrites (HARJACEK *et al.*, 2001). Seria interessante, então, investigar se tais proteínas constituiriam, de fato, receptores para a galactomanana de goma guar.

Para a proposição de se avaliar a lesão da cartilagem por determinação de GAG presentes na matriz, procedemos à adaptação do seu protocolo de extração, visando à utilização do complexo PROLAV 750®. Tal adaptação fez-se necessária frente à impossibilidade de realizarmos o protocolo original descrito por RAMOS *et al.* (2001), e reproduzido em nosso laboratório por BEZERRA *et al.* (2004). A metodologia descrita por esses autores fundamenta-se na proteólise por MAXATASE®, um complexo proteolítico atualmente ausente do mercado. Após adaptação do protocolo utilizando cartilagens de espécimes naive, obtivemos a taxa máxima de digestão das amostras após 48 h. A eletroforese em gel de agarose, com tampão diaminopropano-acetato, revelou presença exclusiva de CS, achado semelhante aos dos trabalhos supracitados. A proteólise com PROLAV 750®, adicionalmente, aumentou a capacidade de extração, em relação à utilização de MAXATASE®. Enquanto, por esta, foram determinados teores de 11,2 µg/mg em cartilagens desidratadas de animais não-manipulados (RAMOS *et al.*, 2001), a proteólise por PROLAV 750® forneceu valores médios iguais a 45,4 µg/mg. Na cartilagem ainda hidratada de coelhos, determinou-se um teor de CS igual a 27,8 µg/mg (PRICE, LEVICK & MASON, 1996). Assumindo um grau de hidratação médio de 70% (GOLDRING & GOLDRING, 2005), poder-se-ia estimar grosseiramente um teor de CS entre 90-100 µg/mg no tecido seco. Tomando esse valor por padrão de comparação, é patente o aperfeiçoamento do método extrativo pela utilização de PROLAV 750®. Na raspagem da cartilagem de ratos, é razoável aceitar que porções de osso subcondral sejam concomitantemente removidas. Como as determinações obtidas são normalizadas pela massa tecidual, a presença de osso na amostra pode ser uma fonte incontrolável de erro na determinação. Por isso, procedemos à pesagem dos debrís ao final da proteólise, a fim de determinarmos a massa realmente digerida de tecido. Em um experimento piloto, observamos digestão inferior a 5% para o tecido ósseo, a qual não forneceu quantidade detectável de CS. Desse modo, podemos assegurar que a massa realmente digerida em nosso método corresponde a tecido cartilaginoso, e que o CS detectado é proveniente dessa mesma massa.

Concluída a adaptação do protocolo, submetemos à proteólise cartilagens de animais sob TLCA ou falso-operados, em distintos períodos de indução e determinamos a

concentração do condroitin-sulfato (CS) no tecido desidratado. Aos setenta dias após a TLCA, observa-se um aumento significativo no conteúdo de CS, bem como a elevação de sua massa molar, vista em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Essa elevação na massa molar também pôde ser visualizada na cromatografia por exclusão de tamanho (HPSEC), técnica amplamente utilizada para investigação da massa molar de materiais poliméricos, observando-se inclusive uma excelente relação linear entre os parâmetros de ambas as técnicas, revalidando a clássica técnica de PAGE (DIETRICH & DIETRICH, 1976) na investigação da alteração na massa molar de GAG. Concordando com nosso achado, relatou-se que as moléculas de CS no fluido sinovial de cavalos portadores de injúria osteocondral por esforço também apresentam elevação na massa molar (BROWN *et al.*, 2007). A análise de correlação entre as variáveis concentração *versus* mobilidade em PAGE, ou tempo de retenção em HPSEC, revelou que as alterações na massa molar são mais pronunciadas naquelas cartilagens cujo teor de CS está aumentado, fazendo-nos supor que uma neossíntese reparativa de proteoglicanos com cadeias maiores de CS esteja acontecendo nas cartilagens do grupo OA. Essa suposição concorda com a observação clássica em cães submetidos à OA experimental, na qual se observa aumento na síntese de agregano portando cadeias de CS anormalmente mais longas (CARNEY *et al.*, 1985).

Ainda sobre os grupos experimentais supracitados, coletamos a articulação direita para análise histopatológica. Apesar de originalmente objetivarmos proceder à avaliação segundo os critérios clássicos de MANKIN (1971), realizamo-la segundo as orientações recentemente preconizadas pela OARSI (PRITZKER *et al.*, 2006). Essa publicação apontou a limitação do Sistema de Mankin em apreender alterações estruturais mais precoces, além de haver questionado sua reprodutibilidade. Semelhante ao descrito por HAYAMI *et al.* (2004), encontramos deformações no contorno ósseo, acompanhadas de osteofitose nas articulações dos animais, após 70 dias da TLCA (grupo OA). Essa lesão confere grau máximo no sistema OARSI (grau 6). Nos espécimes desse grupo, foram visualizados osteoclastos em nítida atividade, em regiões próximas a microfraturas do osso subcondral, preenchidas por fibrocartilagem. Além de desnudações, a cartilagem remanescente apresentou áreas de escavação a atingir a zona média e profunda. Ao lado de regiões fibriladas e acelulares, extensas regiões de hiperplasia da zona superficial foram observadas. Embora tal alteração não seja pontuada pelos escores OARSI, acreditamos que não deva ser negligenciada, uma vez que o aumento anormal da densidade celular constitui, por si só, um critério de lesão. É o que ocorre na zona média da cartilagem, na qual se visualizaram *clusters* em muitos campos. É interessante notar que, mesmo próximo a tais campos, encontram-se consideráveis

extensões acelulares ou de condrócitos necróticos. Em alguns pontos, grupos de células viáveis retiveram o corante basofílico mais intensamente, podendo justificar uma síntese aumentada de proteoglicanos, conforme o observado acima pelo teor de CS no tecido. Tal basofilia se observou inclusive em algumas regiões da própria matriz extracelular. Em termos de extensão, as alterações comprometeram mais de 50% da superfície articular, medianamente (estágio 4). Ambos os côndilos foram acometidos por lesões de gravidade e extensão semelhantes.

O achado das alterações acima descritas adquire importância por atestar a reprodutibilidade do modelo experimental em nossas condições laboratoriais. Nosso grupo recentemente demonstrou que alterações na concentração do CS e em sua massa molar, bem como a lesão histopatológica da cartilagem, podem ser prevenidas pelo uso oral diário da associação de sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina, candidatos a agentes modificadores da evolução da doença (SILVA Jr. *et al.*, 2007). Assim, a existência de lesões típicas da OA, no momento em que se apresentam alterações no conteúdo e na qualidade do CS, bem como a reversão dos mesmos por drogas anti-artrósicas, legitima o uso desses parâmetros como índices de lesão da cartilagem articular.

Demonstramos de modo inédito o efeito condroprotetor *in vivo* da goma guar em nosso modelo. Solução salina de goma guar (100µg /50µl) foi administrada por via intra-articular (i. art.), uma vez por semana, iniciando aos 14 dias após a TLCA, até o dia 63, totalizando oito administrações. Nessas condições, a goma guar preveniu as alterações sofridas pelo CS após a TLCA, e reduziu significativamente o dano estrutural, conforme análise histopatológica pelos critérios OARSI. Somando esse efeito condroprotetor ora obtido àquele efeito analgésico previamente descrito (CASTRO *et al.*, 2007), podemos concluir positivamente quanto ao potencial anti-artrósico da galactomanana de goma guar. Mais ainda, os resultados obtidos são indícios de que mecanismos envolvendo sinalização por carboidratos sejam relevantes na fisiopatologia de osteoartropatias.

Conclusões

1. O modelo de osteoartrite por Transecção do Ligamento Cruzado Anterior em ratos apresenta um fenômeno efêmero de incapacitação articular, presente apenas em sua fase inicial, sendo responsivo a antiinflamatórios não-esteroidais e morfina;
2. O óxido nítrico parece participar ativamente na hipernocicepção na fase inicial do modelo, sugestivo de um comportamento dual;
3. O desenvolvimento de dor articular pode ser abolido pela administração profilática de alendronato sódico;
4. A analgesia pela galactomanana da goma guar parece depender de sua ligação a um receptor específico para resíduos de galactose, a sulfatação ou oxidação de sua estrutura prejudicam a atividade analgésica;
5. Na fase avançada do modelo, em que surgem alterações histopatológicas importantes, o condroitim-sulfato encontra-se aumentado em seu teor na matriz da cartilagem femoral, bem como em sua massa molar;
6. Goma guar parece exercer atividade condroprotetora *in vivo*, prevenindo as alterações sofridas pelo condroitim-sulfato da matriz da cartilagem femoral, bem como reduzindo sua lesão histopatológica.

*Referências
Bibliográficas*

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, apr. 2004.

AIGNER T.; MCKENNA, L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 59, n. 1, p. 5-18, jan. 2002.

ANDRIACCHI, T. P.; BIRAC, D. Functional testing in the anterior cruciate ligament-deficient knee. **Clin. Orthop.**, n. 288, p. 40-47, mar. 1993.

AQUINO, R. S. *et al.* Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, n. 1, p. 11-20, aug. 2005.

ALTMAN, R. D. *et al.* Total joint replacement of hip or knee as an outcome measure for structure modifying trials in osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 13, n. 1, p. 13-19, jan. 2005.

ALTMAN, R. *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. **Arthritis Rheum.**, v. 29, n. 8, p. 1039-1049, aug. 1986.

AMEYE, L. G.; YOUNG, M. F. Animals models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the "Holy Grail". **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 18, n. 5, p. 537-547, set. 2006.

AMIN, A. R. *et al.* The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis-affected chondrocytes: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, v. 182, n. 6, p. 2097-2102, dec. 1995.

ATTUR, M. G. *et al.* Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 1, p. 1-4, jan. 2002.

BAJAJ, P. *et al.* Osteoarthritis and its association with muscle hyperalgesia: an experimental, controlled study. **Pain**, v. 93, n. 2, p. 107-114, aug. 2001.

BALAZS, E. A.; BRILLER, S. O.; DENLINGER, J. L. Na-hyaluronate molecular size variations in equine and human arthritic synovial fluids and the effect on phagocytic cells. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 11, n. 1, p. 141-143, mar. 1981.

BALAZS, E. A.; DENLINGER, J.L. Sodium hyaluronate and joint function. **Equine Vet. Sci.**, v. 5, n. 4, p. 217-228, 1985.

BALAZS, E. A.; DENLINGER, J. L. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, v. 39, p. 3-9, aug. 1993. Supplement.

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

BANK, R.A. *et al.* The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. **Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 10, p. 2202-2210, oct. 2000.

BAU, B. *et al.* Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. **Arthritis Rheum.**, v. 46, n. 10, p. 2648-2657, oct. 2002.

BAYLISS, M.T. *et al.* Sulfatation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age, topographical position, and zone of cartilage on tissue composition. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 22, p. 15892-15900, may. 1999.

BELLAMY, N. *et al.* Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 18, n. 2, p. CD005328, apr. 2005.

BEZERRA, M. M. *et al.* Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, n. 1, p. 172-82, jan. 2004.

BLANCO, F. J. *et al.* Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. **Am. J. Pathol.**, v. 146, n. 1, p. 75-85, jan. 1995.

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. 4, n. 10, p. 1041-1048, oct. 2006.

BRADLEY, L. A. *et al.* Lessons from fibromyalgia: abnormal pain sensitivity in knee osteoarthritis. **Novartis Found. Symp.**, v. 260, p. 258-276, 2004.

BRANDT, K.D. Non-surgical treatment of osteoarthritis: a half century of “advances”. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 63, n. 2, p. 117-122, feb. 2004.

BRANDT, K. D. *et al.* Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. **J. Rheum.**, v. 18, n. 3, p. 436-446, mar. 1991.

BRANDT, K. *et al.* Effects of doxycycline on progression of osteoarthritis: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 7, p. 2015-2025, jul. 2005.

BREW, K.; DINAKARPARNDIAN, D., NAGASE, H. Tissue inhibitor of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 267-283, mar. 2000.

BROOKS, P. M. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 14, n. 5, p. 573-577, sep. 2002.

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, nov. 2007.

BOCATO, R. Artrose é a maior causa de afastamentos. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 18 dez. 2005.

CAPLAN, A.J. Cartilage. **Sci. Am.**, v. 251, n. 4, p. 82-90, oct. 1984.

CARNEY, S. L. *et al.* Structure of newly synthesized (35S)-proteoglycans and (35S)-proteoglycan turnover products of cartilage explants cultures from dogs with experimental osteoarthritis. **J. Orthop. Res.**, v. 3, n. 2, p. 140-147, 1985.

CARBONE, L. D. *et al.* The relationship of antiresorptive drug use to structural findings and symptoms of knee osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 11, p. 3516-3525, nov. 2004.

CARON, J. P. *et al.* Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis. Suppression of collagenase-1 expression. **Arthritis Rheum.**, v. 39, n. 9, p. 1535-1544, sep. 1996.

CASTRO, R. R. **Hiperalgisia articular no modelo de osteoartrite em ratos: Efeitos de inibidores da síntese de óxido nítrico e de polissacarídeos de elevado peso molecular.** 2004. 142 f. Dissertação. (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

CASTRO, R. R. *et al.* A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis – a evidence of a role for nitric oxide. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, n. 8, p. 769-776, aug. 2006.

CASTRO, R. R. *et al.* Analgesic activity of a polysaccharide in experimental osteoarthritis in rats. **Clin. Reumatol.**, v. 26, n. 8, p. 1312-1319, aug. 2007.

CEPEDA, M. S. *et al.* Tramadol for osteoarthritis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 3, p. CD005522, jul. 2006.

CHAMBERS, T.J. *et al.* The role of prostaglandins and nitric oxide in the response of bone to mechanical forces. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 7, n.4, p. 422-423, jul. 1999.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; *et al.* COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, out. 2002.

CHEVALIER, X. *et al.* Safety of intraarticular injection of interleukin-1 receptor antagonist in patients with painful knee osteoarthritis: a multicenter study. **J. Rheumatol.**, v. 32, n. 7, p. 1317-1323, jul. 2005.

COHEN, N. *et al.* Reduced NO accumulation in arthrotic cartilage by exposure to methylene blue. **Acta Orthop. Scand.**, v. 71, n. 6, p. 630-636, set. 2000.

COMBE, R.; BRAMWELL, S.; FIELD, M. J. The monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: a model of chronic nociceptive pain in rats? **Neurosci. Lett.**, v. 370, n. 2-3, p. 236-240, nov. 2004.

CREAMER, P. Current perspectives on the clinical presentation of joint pain in human OA. **Novartis Found. Symp.**, v. 260, p. 64-78, 2004.

CROFFORD, L.J. COX-2 in synovial tissues. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 7, n. 4, p. 406-408, jul. 1999.

CUNHA, P. L. R. **Desenvolvimento de polissacarídeos com ação terapêutica em osteoartrite**. 2006. 169 f. Tese. (Doutorado em Química Inorgânica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CUNHA, P. L. R. *et al.* Low viscosity hydrogel of guar gum: Preparation and physicochemical characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 37, n. 1-2, p. 99-104, oct.2005.

DAHL, L. B.; *et al.* Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropaties. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 44, n. 12, p. 817-822, dec. 1985.

DAVIS, M. *et al.* Correlates of knee pain among US adults with and without radiographic knee osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, v. 19, n. 12, p. 1943-1949, dec. 1992.

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

DENNISON, E.; COOPER, C. Osteoarthritis: epidemiology and classification. In: HOCHBERG, M.C. *et al.* **Rheumatology**. v. 2. 3rd ed. London: Mosby, 2003.

DiCESARE, P. E.; ABRAMSON, S. B. Pathogenesis of osteoarthritis. In: HARRIS Jr. *et al.* **Kelley's textbook of rheumatology**. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 2005.

DIEPPE, P. *et al.* The Bristol 'OA500 study': progression and impact of the disease after 8 years. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, n. 2, p. 63-68, mar. 2000.

DIEPPE, P. A.; LOHMANDER, L. S. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. **Lancet**, v. 365, n. 9463, p. 965-973, mar. 2005.

DIETRICH, C.P. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 17, n. 1, p. 5-13, 1984.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. **Anal. Biochem.**, v. 70, n. 2, p. 645-647, fev. 1976

DOUGADOS, M. Sodium hyaluronate therapy in osteoarthritis: arguments for a potential beneficial structural effect. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 30, n. 2, p. 19-25, oct. 2000. Supplement 1.

- DOUGADOS, M. *et al.* Evaluation of structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis: ECHODIAH, a three-year placebo-controlled trial. **Arthritis Rheum.**, v. 44, n. 11, p. 2539-2547, nov. 2001.
- EDWARDS, J. C. W. The synovium. In: HOCHBERG, M.C. *et al.* **Rheumatology**. v. 2. 3rd ed. London: Mosby, 2003.
- EGG, D. Concentrations of prostaglandin D2, E2, F2 alpha, 6-keto-F1 alpha and thromboxane B2 in synovial fluid from patients with inflammatory joint disorders and osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, v. 43, n. 2, p. 89-96, mar-apr. 1984.
- FAHMI, H.; PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J. PPAR gamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses on arthritis. An overview. **J. Rheumatol.**, v. 29, n. 1, p. 3-14, jan. 2002.
- FAHMI, H. *et al.* 15d-PGJ2 is acting as a dual agent on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 11, p. 845-848, nov. 2002.
- FARRELL, A.J. *et al.* Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 51, n. 11, p. 1219-1222, nov. 1992.
- FELSON, D. T. The sources of pain in knee osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 17, n. 5, p. 624-628, set. 2005.
- FELSON, D. T. *et al.* The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. **Ann. Intern. Med.**, v. 134, n. 7, p. 541-549, apr.2001.
- FERNANDES, J.C.; MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J.P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. **Biorheology**, v. 39, n. 1-2, p. 237-246, 2002.
- FERNIHOUGH, J. *et al.* Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. **Pain**, v. 112, n. 1-2, p. 83-93, nov. 2004.
- FUKUTO, J. M.; CHAUDHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 35, p. 165-194, 1995.

GALOIS, L. *et al.* Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 12, n. 10, p. 779-786, oct. 2004.

GILMAN, S.C. *et al.* Interleukin-1 activates phospholipase A2 in human synovial cells. **Arthritis Rheum.**, v. 31, n. 1, p. 126-130, jan. 1988.

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

GOLDBERG, V. M.; BURCKWALTER, J. A. Hyaluronans in the treatment of osteoarthritis of the knee: evidence for disease-modifying activity. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 13, n. 3, p. 216-224, mar. 2005.

GOLDRING, S. R.; GOLDRING, M. B. Biology of the normal joint. In: HARRIS Jr. *et al.* **Kelley's textbook of rheumatology**. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 2005.

GOMIS, A. *et al.* Effects of different molecular weight elastoviscous hyaluronan solutions on articular nociceptive afferents. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 1, p. 314-326, jan. 2004.

GREENWALD, R. A. Oxygens radicals, inflammation, and arthritis – pathophysiological considerations and implications for treatment. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 20, n. 4, p. 219-240, feb. 1991.

GRUBB, B. D. Activation of sensory neurons in the arthritic joints. **Novartis Found. Symp.**, v. 260, p. 28-36, 2004.

HARJACEK, M. *et al.* Expression of galectins-1 and -3 correlates with defective mononuclear cell apoptosis in patients with juvenile idiopathic arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 28, n. 8, p. 1914-1922, aug. 2001.

HASHIMOTO, S. *et al.* Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 41, n. 9, p. 1632-1638, sep. 1998.

HAY, C. W. *et al.* Synovial fluid interleukin 6, tumor necrosis factor, and nitric oxide values in dogs with osteoarthritis secondary to cranial cruciate ligament rupture. **Am. J. Vet. Res.**, v. 58, n. 9, p. 1027-1032, sep. 1997.

HAYAMI, T. *et al.* The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis; reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. **Arthritis Rheum.**, v. 5. n. 4, p. 1193-1206, apr. 2004.

HAYAMI, T. *et al.* Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in rat anterior cruciate ligament transections and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone**, 38, n. 2, p. 234-243, feb. 2006.

HAYWOOD, L. *et al.* Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 8, p. 2173-2177, aug. 2003.

HE, W. *et al.* Synthesis of interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with anti-inflammatory cytokines. **J. Rheumatol.**, v. 29, n. 3, p. 546-553, mar. 2002.

HEINEGARD, D.; OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. **FASEB J.**, v. 3, n. 9, p. 2042-2051, jul. 1989.

HERAUD, F.; HERAUD, A.; HARMAND, M.F. Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 59, n. 12, p. 959-965, dec. 2000.

HERZOG, W. *et al.* Hindlimb loading, morphology and biochemistry of articular cartilage in the ACL-deficient cat knee. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 1, n. 4, p. 243-251, oct. 1993.

HICKERY, M. S.; BAYLISS, M. T. Interleukin-1 induced nitric oxide inhibits sulphatation of glycosaminoglycan chains in human articular chondrocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1425, n. 2, p. 282-290, oct. 1998.

HOCHBERG, M. C. Nutritional supplements for knee osteoarthritis – still no resolution. **N. Eng. J. Med.**, v. 354, n. 8, p. 858-860, feb. 2006.

HOCHBERG, M.C. *et al.* Epidemiologic associations of pain in osteoarthritis of knee: data from the National Health and Nutrition Examination Survey and the National Health and Nutrition Examination I: epidemiologic follow-up survey. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 18, n. 4, p. 4-9, may. 1989. Supplement 2.

HOLLANDER, A. P. *et al.* Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. **J. Clin. Invest.**, v. 96, n. 6, p. 2859-2869, dec. 1995.

HONGBIN, W. *et al.* Carboximethylated chitin reduces MMP-1 expression in rabbit ACLT osteoarthritis cartilage. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 63, n. 4, p. 369-372, apr. 2004.

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

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

ISHIGURO, N. *et al.* Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 42, n. 1, p. 129-136, jan. 1999.

ISHII, H. *et al.* Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 4, p. 277-281, apr. 2002.

JAHN, M.; BAYNES, J. W.; SPITELLER, G. The reaction of hyaluronic acid and its monomers, glucuronic acid and N-acetylglucosamine, with reactive oxygen species. **Carbohydrates Res.**, v. 321, n. 3-4, p. 228-34, oct. 1999.

JAIN, N.K. *et al.* Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Brain Res.**, v. 909, n. 1-2, p. 170-178, aug. 2001.

JERÔNIMO, S. M. B. **Alterações no conteúdo e na estrutura dos glicosaminoglicanos urinários ácidos em tecidos e na urina de pacientes portadores de neoplasias.** 1994. 102 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 1994.

JOHNSON, K. *et al.* Mitochondrial oxidative phosphorylation is a downstream regulator of nitric oxide effects on chondrocyte matrix synthesis and mineralization. **Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 7, p. 1560-1570, jul. 2000.

KANWAR, Y.S.; LINKER, A.; FARQUHAR, M.G. Increase permeability of glomerular basement membrane to ferritin after removal glycosaminoglycans (heparin sulfate) by enzyme digestion. **J. Cell Biol.**, v. 8, n. 2, p. 688-693, aug. 1980.

KENGATHARAN, M.; De KIMPE, S. J.; THIEMERMANN, C. Role of nitric oxide in the circulation failure and organ injury in a rodent model of Gram-positive shock. **Br. J. Pharmacol.**, v. 119, n. 7, p. 1411-1421, dec. 1996.

KUETTNER, K; GOLDBERG, V.M. **Osteoarthritic disorders**. Rosemont (IL): American Academy of Ortopedic Surgeons, 1995.

KIDD, B. L.; PHOTIOU, A.; INGLIS, J. J. The role of inflammatory mediators on nociception and pain in arthritis. **Novartis Found. Symp.**, v. 260, p. 122-138, 2004.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 87, n. 1, p. 3-11, jul. 2001.

KIRWAN, J. Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee? **Knee**, v. 8, n. 2, p. 93-101, jun. 2001.

KOBAYASHI, K *et al.* Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, n. 11, p. 1195-1199, nov. 2003.

LANE, N. E. *et al.* Progression of radiographic hip osteoarthritis over eight years in a community sample of elderly white women. **Arthritis Rheum.**, v. 50, n. 5, p. 1477-1486, may. 2004.

LAUFER, S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 15, n. 5, p. 623-627, sep. 2003.

LAWRENCE, R. C. *et al.* Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. **Arthritis Rheum.**, v. 41, n. 5, p. 778-799, may. 1998.

LECO, K. J. *et al.* R. Tissue inhibitor metalloproteinase-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 12, p. 9352-9360, mar. 1994.

LEE, M.S. *et al.* Effects of shear stress on nitric oxide and matrix protein gene expression in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. **J. Orthop. Res.**, v. 20, n. 3, p. 556-561, may. 2002.

- LI, G., SUGGS, J.; GILL, T. The effect of anterior cruciate ligament injury on knee joint function under a simulated muscle load: a three-dimensional computational simulation. **Ann. Biomed. Eng.**, v. 30, n. 5, p. 713-720, may. 2002.
- LIACINI, A. *et al.* Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. **Exp. Cell Res.**, v. 288, n. 1, p. 208-217, aug. 2003.
- LOHMANDER, L.S.; IONESCU, M.; JUGESSUR, H.; POOLE, A.R. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 42, n. 3, p. 534-544, mar. 1999.
- LOPEZ, M. J. *et al.* comparison of joint stability between anterior cruciate intact and deficient knees: a new canine model of anterior cruciate ligament disruption. **J. Orthop. Res.**, v. 21, n.2, p. 222-230, mar. 2003.
- LUO, W *et al.* Aggrecan from start to finish. **J. Bone Miner. Metabol.**, v. 18, n. 2, p. 51-56, 2000.
- MALEMUD, C. J. Changes in proteoglycans in osteoarthritis: biochemistry, ultrastructure and biosynthetic processing. **J. Rheumatol. Suppl.**, v. 27, p. 60-62, 1991.
- MANKIN, H.J.; LIPPIELLO, L. The glycosaminoglycans of normal and arthritic cartilage. **J. Clin. Invest.**, v. 50, n. 8, p. 1712-1719, aug. 1971.
- MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. **Biogerontology**, 3:257-264, 2002.
- McCALL, T. B. *et al.* Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, n. 1, p. 234-238, jan. 1991.
- MICHEL, B. A. *et al.* Chondroitins 4 and 6 in osteoarthritis of the knee: a randomized, controlled trial. **Arthritis Rheum.**, v. 52, n. 3, p. 779-786, mar. 2005.
- MIWA, M.*et al.* Induction of apoptosis in bovine articular chondrocyte by prostaglandin E(2) through cAMP-dependent pathway. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 8, n. 1, p. 17-24, jan. 2000.

MIYAMOTO, M. *et al.* Simultaneous stimulation of EP2 and EP4 is essential to the effect of prostaglandin E2 in chondrocyte differentiation. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 11, n. 9, p. 644-652, sep. 2003.

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

MOREAU, M. *et al.* Licofelone reduces progression of structural changes in a canine model of osteoarthritis under curative conditions: effect on protease expression and activity. **J. Rheumatol.**, v. 33, n. 6, p. 1176-1183, jun. 2006.

MORT, J. S.; BILLINGTON, C. Articular cartilage and changes in arthritis: matrix degradation. **Arthritis Res.**, v. 3, n. 6, p. 337-341, sep. 2001.

MOSS, M.L. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that process tumour-necrosis factor-alpha. **Nature**, v. **385**, n. **6618**, p. 733-736, feb. 1997.

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

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. **Biol. Chem.**, v. 378, n. 3-4, p. 151-160, mar-apr. 1997.

NOTOYA, K. *et al.* The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. **J. Immunol.**, v. 165, n. 6, p. 3402-3410, sep. 2000.

O'CONNOR, B. L. *et al.* Serial force plate analyses of dogs with unilateral knee instability, with or without interruption of sensory input from the ipsilateral limb. **Osteoarthritis Cartilage**, v. **7**, n. **6**, p. 567-573, nov. 1999.

OBRIND *et al.* The effect of calcium on the macromolecular properties of heparan sulfate. **Connec. Tissue Res.**, v. 3, n. 2, p. 187-193, 1975.

OUELLET, D. M.; POLLACK, G. M. A pharmacokinetic-pharmacodynamic model of tolerance to morphine analgesia during infusion in rats. **J. Pharmacokinet. Biopharm.**, v. 23, n. 6, p. 531-49, dec. 1995.

ORDERBERG, G. Characterization of joint pain in human OA. **Novartis Found. Symp.**, v. 260, p. 105-121, 2004.

OSWALD, I. P. *et al.* IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. **J. Immunol.**, v. 148, n. 11, p. 3578-3582, jun. 1992.

PASQUALI RONCHETTI, I. *et al.* Morphological analysis of knee synovial membrane biopsies from a randomized controlled clinical study comparing the effects of sodium hyaluronate (Hyalgan) and methylprednisolone acetate (Depomedrol) in osteoarthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 40, n. 2, p. 158-169, feb. 2001.

PATWARI, P. *et al.* Proteoglycan degradation after injurious compression of bovine and human articular cartilage in vitro: interaction with exogenous cytokines. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 5, p. 1292-1301, may. 2003.

PAVELKA, K. *et al.* Glucosamine sulphate use and delay of progression of knee osteoarthritis. **Arch. Intern. Med.**, v. 162, n. 18, p. 2113-2123, oct. 2002.

PELLETIER, J. M. Pathophysiology of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 12, p. 31-33, 2004. Supplement 1.

PELLETIER, J. P. *et al.* Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Arthritis Rheum.**, v. 41, n. 7, p. 275-286, jul. 1998.

PERTERS, T. J. *et al.* Factors associated with change in pain and disability over time: a community-based prospective observational study of hip and knee osteoarthritis. **Br. J. Gen. Pract.**, v. 55, n. 512, p. 205-211, mar. 2005.

PINALS, R.S. Mechanisms of joint destruction, pain and disability in osteoarthritis. **Drugs**, v. 52, p. 14-20, 1996. Supplement 3.

POMONIS, J. D. *et al.* Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. **Pain**, v. 114, n. 3, p. 339-346, apr. 2005.

POOLE, A. R. *et al.* Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 94, n. 1, p. 25-33, jul. 1994.

PRICE, F. M.; LEVICK, J. R.; MASON, R. M. Glycosaminoglycan concentration in synovium and other tissues of rabbit knee in relation to synovial hydraulic resistance. **J. Physiol.**, v. 495, n. 3, p. 803-820, sep. 1996.

PRITZKER, K. P. H. *et al.* Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, n. 1, p. 13-29, jan. 2006.

RABINOVICH, G. A. *et al.* Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 17, n. 5, p. 513-520, oct. 2007.

RAISZ, L. G. Prostaglandins and bone: physiology and pathophysiology. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 7, n. 4, p. 83-84, ju. 1999.

RAMOS, A. M. O. *et al.* Artrite induzida por zymosan em ratos: estudo histopatológico, histoquímico e bioquímico dos glicoconjugados da cartilagem articular. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 41, n. 4, p. 205-212, jul. 2001.

RASBAND, W. S. **Image J**. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/i1997-2006>>. Acesso em: 25 out. 2006.

REGINSTER, J. Y. *et al.* Long-terms effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomized, placebo-controlled clinical trial. **Lancet**, v. 357, n. 9252, p. 251-256, jan. 2001.

ROCHA, J. C. S. *et al.* Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, n. 4, p. 588-596, jun. 2002.

SAHA, N. *et al.* Interleukin-1beta-converting enzyme in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. **Arthritis Rheum.**, v. 42, n. 8, p. 1577-1587, aug. 1999.

SAITO, I. *et al.* Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, n. 2, p. 156-162, feb. 2002.

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

SCHARSTUHL, A. *et al.* Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression in transforming growth beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 48, n. 12, p. 3442-34521, dec. 2003.

SCHARSTUHL, A. *et al.* Loss of transforming growth factor counteraction on interleukin 1 mediated effects in cartilage of old mice. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 61, n. 12, p. 1095-1098, dec. 2002.

SCOTT, D. *et al.* Action of polysaccharides of similar average mass but differing molecular volume and charge on fluid drainage through synovial interstitium in rabbit knees **J. Physiol.**, v. 528, n. 3, p. 609-618, nov. 2000.

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

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

SHARMA, L.; KAPOOR, D.; ISSA, S. Epidemiology of osteoarthritis: an update. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 18, n. 2, p. 147-156, mar. 2006.

SILVA Jr., F. S. *et al.* Glucosamine sulfate and chondroitin sulfate reduce joint pain and articular cartilage damage after anterior cruciate ligament transection (ACLT) in rats. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 66, p. 284, 2007. Supplement II.

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

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

SMITH, M.D. *et al.* Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. **J. Rheumatol.**, v. 24, n. 2, p. 365-371, feb. 1997.

SPRENG, D. *et al.* Endogenous nitric oxide production in canine osteoarthritis: detection in urine, serum, and synovial fluid specimens. **Vet. Surg.**, v. 30, n. 2, p. 191-199, mar-apr. 2001.

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

STEFANOVIC-RACIC, M.; STADLER, J.; EVANS, C.H. Nitric oxide and arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 36, n. 8, p. 1038-1044, aug. 1993.

STEPHENS, R. W. *et al.* The origins and relative distribution of polysaccharidases in rheumatoid and osteoarthritic fluids. **J. Rheumatol.**, v. 2, n. 4, p. 393-400, dec. 1975.

STOOP, R. *et al.* Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat knee joints after cranial cruciate ligament transection. **Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 9, p. 2121-2131, sep. 2000.

STOOP, R. *et al.* Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 9, n. 4, p. 308-315, may. 2001.

STOVE, J. *et al.* Gene expression of stromelysin and aggrecan in osteoarthritic cartilage. **Pathobiology**, v. 69, n. 6., p. 333-338, 2001.

STUDER, R. K. *et al.* Nitric oxide inhibition of IGF-1 stimulated proteoglycan synthesis: role of cGMP. **J. Orthop. Res.**, v. 21, n. 5, p. 914-921, sep. 2003.

SUTER, E. *et al.* One-year changes in hind limb kinematics, ground reaction forces and knee stability in an experimental model of osteoarthritis. **J. Biomechanics**, v. 31, n. 12, p. 511-517, dec. 1998.

TASKIRAN, D. *et al.* Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 200, n. 1, p. 142-148, apr. 1994.

TETLOW L. C.; ADLAM D. J.; WOOLLEY, D. E. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. **Arthritis Rheum.**, v. 44, n. 3, p. 585-594, mar. 2001.

TONUSSI C. A., FERREIRA S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: An objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, n. 3, p. 147, mar.1992.

TORRENT, A.; RUHI, R.; ÁLAEZ, C.; ALCARAZ, M.; van EL, B.; DeGOOT, J.; PLAAS, A. Chondroprotective and anti-inflammatory effects of inulin polysulfate in vitro. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 66, p. 284, 2007. Supplement II.

TORTORELLA, M. *et al.* The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 33, p. 25791-25797, aug. 2000.

TOWHEED, T. E. *et al.* Acetaminophen for osteoarthritis. **Cochrane Database Syst. Rev.**, v. 1: CD004257, jan. 2006.

VANE, J. *et al.* **Clinician's manual on COX-2 inhibition and arthritis.** 1st ed. London: Science Press Ltd., 2000.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 45, n. 3, p. 160-166, mai. 2003.

VERMEIRSCH, H.; BIERMANS, R.; SALMON, P. L.; MEERT, T. F. Evaluation of pain behavior and bone destruction in two arthritic models in guinea pig and rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 87, n. 3, p. 349-359, aug-sep.2007.

VILENSKY, J. A. *et al.* Serial analysis of the trunk and limb joints after anterior cruciate ligament transection: temporal, spatial, and angular changes in a canine model of osteoarthritis. **J. Electromyogr. Kinesiol.**, v. 4, n.3, p. 181-192, 1994.

WANG, L. *et al.* Evaluation of chondrocyte cell-associated matrix by flow cytometry. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 9, n. 5, p. 454-462, jul. 2001.

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

WILKINSON, L. S.; EDWARDS, J. C. W. Microvascular distribution in normal human synovium. **J. Anat.**, v. 167, p. 129-136, dec. 1989.

WILLIAMS, J. M. *et al.* Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. **J. Anat.**, v. 134, n. 1, p. 103-109, jan. 1982.

WOBIG, M. *et al.* The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan G-F 20 and a lower-molecular-weight hyaluronan. **Clin. Ther.**, v. 21, n. 9., p. 1549-1562, sep. 1999.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **FASEB J.**, v. 5, n. 8, p. 2145-2154, may. 1991.

WOODIEL, F. N.; FALL, P. M.; RAISZ, L. G. Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae: structure-activity relations and signal transduction pathway. **J. Bone Miner. Res.**, v. 11, n. 9, p. 1249-1255, sep. 1996.

WOOLF, C.J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 88, n. 5472, p 1765-1769, jun. 2000.

World Health Organization and the Bone and Joint Decade, 2000-2010. **The global economic and healthcare burden of musculoskeletal disease.** 2001. Disponível em: <<http://www.ota.org/downloads/bjdExecSum.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2008.

WU, W. *et al.* Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. **Arthritis Rheum.**, v. 46, n 8, p. 2087-2094, aug. 2002.

Apêndice

1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA (2004-2008)

1.1. Artigos científicos em revistas internacionais indexadas

CUNHA, P. L. R. *et al.* Hydrogel of guar gum in experimental osteoarthritis in rats. **Macromolecular Symposia**, 2008 (in press).

ROCHA, F. A. C. *et al.* Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. **Infect. Immun.**, 2008 (in press).

CASTRO, R. R. *et al.* Analgesic activity of a polysaccharide in experimental osteoarthritis in rats. **Clin. Reumatol.**, v. 26, n. 8, p. 1312-1319, aug. 2007.

CASTRO, R. R. *et al.* A quantitative approach to measure joint pain in experimental osteoarthritis – a evidence of a role for nitric oxide. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 14, n. 8, p. 769-776, aug. 2006.

CUNHA, P. L. R. *et al.* Low viscosity hydrogel of guar gum: Preparation and physicochemical characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 37, n. 1-2, p. 99-104, oct. 2005.

1.2. Propriedade Intelectual (Patente)

UFC. Cunha, P. L. R. *et al.* Hidrogel de goma guar purificada e desproteínada como agente viscoelástico aplicado na viscosuplementação de articulações com osteoartrite. BR n. PI0502198-7, 16 jun. 2005.

1.3. Trabalho completo em congresso internacional

CUNHA, P. L. R. *et al.* Viscosupplementation in the Osteoarthritis Knee with Guar Gum. In: International Symposium on Natural Polymers and Composites, 5th, 2004, São Pedro.

1.4. Resumos em congressos

A. Congressos internacionais

SILVA Jr., F. S. *et al.* Glucosamine sulfate and chondroitin sulfate reduce joint pain and articular cartilage damage after anterior cruciate ligament transection (ACLT) in rats. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 66, p. 284, 2007. Supplement II.

CUNHA, P. L. R. *et al.* Hydrogel of Guar Gum in Experimental Osteoarthritis in Rats. In: International Congress on Biohydrogels, 2007, Viareggio - Italy.

CUNHA, P. L. R. *et al.* Analgesic activity of a polysaccharide in experimental osteoarthritis is independent on the gel state. In: World Polymer Congress Macro 2006, 2006, Rio de Janeiro - Brazil.

ROCHA, F. A. C. *et al.* Antinociceptive activity of a polysaccharide in the anterior cruciate ligament transection model is independent on the gel state. In: World Congress on Osteoarthritis, 2006, Prague - Czech Republic.

ROCHA, F. A. C.; *et al.* Hyperalgesia in an osteoarthritis model in rats – Role of nitric oxide and the effect of a viscosupplementation agent. In: Annual European Congress of Rheumatology, 2005, Viena – Austria.

CASTRO, R. R.; MENEZES, M. G. C.; ROCHA, F. A. C. Nitric oxide synthase inhibition is analgesic in experimental osteoarthritis in rats. In: Nitric oxide, cytokines and inflammation. An international symposium, 2004, Rio de Janeiro – Brazil.

B. Congressos nacionais

GIRÃO, V. C. C. *et al.* Participação do óxido nítrico (NO) na modulação central da hiperalgesia na artrite induzida por zymosan. In: Congresso Brasileiro de Reumatologia, XXVI, 2006, Campinas.

SILVA JR., F. S. *et al.* Efeito de glicosamina e condroitina na dor e degradação da cartilagem em um modelo de osteoartrite (OA) em ratos. In: Congresso Brasileiro de Reumatologia, XXVI, 2006, Campinas.

CUNHA, P. L. R. *et al.* Efeito da viscosidade e da modificação estrutural da goma guar sobre a sua ação em joelho com osteoartrite. In: Congresso Brasileiro de Polímeros, 8º, 2005, Águas de Lindóia.

SILVA JR., F. S. *et al.* Tadalafil promove analgesia e inibe o influxo celular na artrite por zymosan em ratos. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, XX, 2005, Águas de Lindóia.

LEITE, A. C. M. *et al.* Efeito paradoxal do óxido nítrico (NO) no influxo celular (IC) em artrite e peritonite. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, XX, 2005, Águas de Lindóia.

CASTRO, R. R. *et al.* Inibição profilática da síntese de óxido nítrico é analgésica na Osteoartrite (OA) experimental em ratos. In: Congresso Brasileiro de Reumatologia, XXV, 2004, Rio de Janeiro.

CASTRO, R. R. *et al.* Efeito de um polissacarídeo de goma guar (GG) na hiperálgia articular em um modelo experimental de Osteoartrite (OA) em ratos. In: Congresso Brasileiro de Reumatologia, XXV, 2004, Rio de Janeiro.

CASTRO, R. R.; MENEZES, M. G. C.; ROCHA, F. A. C. Inibição profilática da síntese de óxido nítrico é analgésica na Osteoartrite (OA) experimental em ratos. In: Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, XXXVI, 2004, Águas de Lindóia.

CASTRO, R. R. *et al.* Efeito de um polissacarídeo de goma guar (GG) na hiperálgia articular em um modelo experimental de Osteoartrite (OA) em ratos. In: Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, XXXVI, 2004, Águas de Lindóia.

2. PRÊMIO

Prêmio Luiz Vertzman, promovido pela Sociedade Brasileira de Reumatologia. 2004

3. CONFERÊNCIA

CASTRO, R. R. Efeito de um polissacarídeo na osteoartrite experimental. In: Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), VIII, 2006, Natal.

1. DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO PELO CEPA-UFC

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS EM REVISTAS INTERNACIONAIS INDEXADAS