



Universidade Federal do Ceará

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Transecção meniscal mais que a resecção promove dor
articular e lesão em camundongos**

Orientador: Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Aluna: Maria Aline Alves Teotonio

Fortaleza-Ceará

2013



Universidade Federal do Ceará

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Transecção meniscal mais que a resecção promove dor
articular e lesão em camundongos**

Maria Aline Alves Teotonio

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Fortaleza-Ceará

2013

Universidade Federal do Ceará

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Título do trabalho: Transecção meniscal mais que a resecção promove dor articular e lesão em camundongos

MARIA ALINE ALVES TEOTONIO

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

Universidade Federal do Ceará

Orientador

Prf^a Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

Universidade Federal do Ceará

Examinador

Prof. Dr. Francisco Saraiva da Silva Junior

Universidade Federal do Ceará

Examinador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que nunca mediram esforços para me proporcionar uma formação profissional adequada, além de toda confiança depositada em mim quanto as minha escolhas, as minhas irmãs , pelo apoio e momentos de alegria, ao meu noivo que mesmo longe sempre me deu forças e nunca me deixou desistir dos meus objetivos, mesmo que eles custassem os nossos momentos de individualidade e felicidade, ao meu orientador e aos meus amigos do Laboratório de Investigação em Osteoartropatias – LIO – UFC pelo acolhimento, aprendizado e companherismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador do universo, por me dar forças em todos os momentos principalmente nos mais difíceis.

Aos meus pais, Alvani e Teotonio, que mesmo longe, estiveram sempre presentes, pelo incentivo e imensa colaboração na minha formação.

As minhas irmãs Alana e Ariele, pelo companheirismo e preocupação.

As minhas avós Francisca e Nilda, por sempre me colocarem em suas orações.

Ao meu noivo Cleomarcos pela compreensão, amor e paciência.

A minha prima Suynara, que esteve durante esses anos comigo, compartilhando todos os momentos.

A minha tia Aldenir, pelo acolhimento.

A minha prima Sara e amigas Kamila, Carol e Thayane pelo companheirismo.

Ao meu orientador, Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelo exemplo de pessoa, de pesquisador, pelas lições e orientações dadas por ele.

Aos amigos do LIO: Carolina Dinelly, Carolina Melo, Natália Gomes dos Santos, Tânia Valeska, Rodolfo de Melo Nunes, Fernando Alencar, Aryana Feitosa, pelo apoio e aprendizado.

As minha amigas Anita Oliveira, Vanesca Jales, Vanesca Farias, Natália Márcia, que sempre mantiveram contato e me ajudaram de alguma maneira.

A Charllyanny Custódio, pela amizade.

À professora Virginia Girão e Margarida Pompeu pela disponibilidade e ajuda nas avaliações histopatológica.

As técnicas do NEMPI Joseane e Socorro pela ajuda.

À professora Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, pela constante preocupação com meu trabalho.

A todos os professores, por terem compartilhado seus conhecimentos e pela colaboração na minha formação científica.

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

Ao Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, pela gentileza e agilidade na doação dos animais pra execução deste trabalho.

Aos profissionais da Biomedicina, José Amadeus Souza, Michelle e Aldenora, pela colaboração.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Resumo

A Osteoartrite (OA) é uma doença articular crônica degenerativa, caracterizada pela perda da função e incapacitação, interferindo na qualidade de vida. Em humanos, a inexistência de métodos objetivos e confiáveis para avaliar a evolução da OA limita o seu estudo clínico. Assim, modelos animais são amplamente utilizados na tentativa de se compreender os aspectos fisiopatológicos da doença e investigar novas terapias. Considerado como um dos modelos experimentais de OA mais utilizado, o de instabilidade mecânica induzida por cirurgia reproduz experimentalmente o trauma crônico observado na OA humana. Utilizando os modelos cirúrgicos de meniscectomia (retirada do menisco) e desestabilização do menisco (corte do menisco) objetivou-se avaliar a diferença do desenvolvimento da OA nesses modelos experimentais e sua resposta a diferentes drogas anti-inflamatórias. Camundongos Swiss foram submetidos à cirurgia e sacrificados após 7 semanas, com avaliação diária da dor articular (hipernocicepção). Após o sacrifício, o lavado articular foi coletado e o sobrenadante armazenado para a dosagem de citocinas e óxido nítrico (NO). Avaliação histopatológica das articulações foi feita segundo os escores Osteoartrite Research Society International (OARSI). Grupos falso-operados (Sham) foram utilizados para comparação. Grupo de animais meniscotomizados receberam morfina (2 mg/kg; i.p.), naloxona (1 mg/kg; i.p.), indometacina (2 mg/kg; s.c.), 1400W (0,5 mg/kg; s.c.), HOE-140 (1 mg/kg; s.c.) ou anti-TNF (25-50 µL) intra-articular. A hipernocicepção foi registrada 1 e 3 horas após a administração das drogas. Grupo não tratado recebeu apenas veículo. Os dados foram expressos como média ± e.p.m, seguidos por ANOVA e teste de Tukey. Os escores histopatológicos foram expressos como mediana, seguidos por teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância foi de $P < 0,05$. Na meniscectomia e meniscotomia, a hiperalgesia articular aumentou significativamente nos 16 dias após o procedimento cirúrgico, comparada ao grupo sham (animais falso-operados). Essa hiperalgesia persistiu no grupo meniscotomia até o 49º dia de observação ($P < 0,05$). O influxo celular foi maior e as lesões articulares foram mais graves, particularmente na porção tibial, no grupo meniscotomia ($P < 0,05$). Indometacina, 1400W, HOE e morfina reduziram significativamente a hipernocicepção, com reversão do efeito da morfina pelo naloxona. O efeito analgésico de anti-TNF persistiu por 7 dias após a administração. Os níveis de IL-1, TNF- α , IFN- γ e NO foram indetectáveis. A meniscotomia é um modelo mais grave de OA, envolvendo a participação de cicloxigenase, óxido nítrico sintase indutível, bradicinina, opioides e TNF.

Palavras chave: Osteoartrite, meniscectomia, meniscotomia, hipernocicepção, camundongos

Abstract

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative joint disease characterized by loss of joint of function and disability, reduced with the quality of life. In humans, the lack of reliable and objective methods to evaluate the progression of OA limits their clinical study. Thus, animals are commonly used as model in an attempt to understand the pathophysiology of the disease and investigate new therapies. Considered one of the most experimental models of OA used, the mechanical instability of surgically induced experimentally reproduce the chronic trauma observed in human OA. Using models of surgical meniscectomy (meniscus removal) and destabilization of the medial meniscus (DMM) aimed to evaluate the difference in the development of OA in these experimental models and their response to different anti-inflammatory drugs. Swiss mice underwent surgery and the animals were sacrificed after 7 weeks, with daily assessment of joint pain (hypernociception). After sacrifice, the intra-articular lavage was collected. The supernatant stored for evaluate cytokine-induced nitric oxide (NO). Histopathologic evaluation of the joints was performed according to the OARSI scores. Groups false-operated (Sham) were used for comparison. Meniscotomizados groups of animals receiving morphine (2 mg/kg, ip), naloxone (1 mg/kg, ip), indomethacin (2 mg/kg, sc), 1400W (0.5 mg/kg, sc), HOE-140 (1 mg/kg, sc) or anti-TNF (25-50 μ l) intraarticular. The hypernociception was recorded first and third hours after drug administration. Untreated group received vehicle only. Data were expressed as mean \pm SEM, and ANOVA followed by Tukey test. The histopathological scores were expressed as median followed by Kruskal-Wallis. Statistical significance was set at $P < 0.05$. In destabilization of the medial meniscus and meniscectomy, articular hyperalgesia increased significantly in the 16 days after surgery, compared to the sham group (false-operated animals). This hyperalgesia persisted in group destabilization of the medial meniscus until the 49th day of observation ($P < 0.05$). The cellular influx was higher and articular lesions were more severe, particularly in tibial portion, destabilization of the medial meniscus group ($P < 0.05$). Indomethacin, 1400W, HOE and morphine significantly reduced hypernociception, with reversal of the effect of morphine by naloxone. The analgesic effect of anti-TNF persisted for 7 days after administration. The levels of IL-1, TNF- α , IFN- γ and NO were undetectable. The destabilization of the medial meniscus is a more severe OA, involving the participation of cyclooxygenase, inducible nitric oxide synthase, bradykinin, opioids and TNF.

Keywords: Osteoarthritis, meniscectomy, destabilization of the medial meniscus hypernociception, mice

Sumário

Lista de figuras	11
Lista de abreviaturas	12
1.Introdução	13
1.1.Menisco	13
1.2 Osteoartrite	15
1.3 Modelos experimentais de Osteoartrite	17
1.4 Osteoartrite e inflamação	19
1.5 Osteoartrite e dor	21
1.6 Tratamento da Osteoartrite	22
2. Justificativa	25
3. Objetivos	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. Materiais e métodos	27
4.1 Animais	27
4.2 Indução da osteoartrite experimental - Desestabilização do menisco e Meniscectomia com Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA)	27
4.3. Avaliação da hipernocicepção articular	27
4.4 Coleta do lavado articular	28
4.5 Determinação dos níveis de citocinas	29

4.6 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)	29
4.7 Histopatologia	29
4.8 Drogas	30
4.9 Análise estatística	30
5. Resultados	31
5.1 Cinética da hiperalgesia articular em camundongos submetidos à remoção ou transecção do menisco medial por 7 semanas	31
5.2 Análise do influxo celular articular de camundongos submetidos à meniscectomia ou meniscotomia	32
5.3 . Avaliação histopatológica das articulações do joelho de camundongos submetidos à meniscectomia ou meniscotomia	33
5.4 Efeito terapêutico e dose-dependente de morfina na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia	35
5.5. . Efeito terapêutico da indometacina, 1400W e HOE-140 na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia	36
5.6 Efeito terapêutico do remicade na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia	37
5.7 Dosagem de IL-1, TNF- α , IFN- γ e NO em camundongos submetidos à meniscotomia	38
6. Discussão	39
7. Conclusão	45
8. Referências	47

Lista de figuras

- Figura 1. Meniscos e ligamentos da articulação do joelho. 13**
- Figura 2- Avaliação da hipernocicepção articular por analgesímetro digital (von Frey em camundongos. 28**
- Figura 3- Cinética da hiperalgesia articular em camundongos submetidos à remoção (meniscectomia) ou transecção (meniscotomia) do menisco medial por 7 semanas. 31**
- Figura 4 – Análise do influxo celular articular de camundongos submetidos à meniscectomia ou meniscotomia. 32**
- Figura 5 - Avaliação histopatológica das articulações do joelho de camundongos submetidos à meniscectomia ou meniscotomia 33**
- Figura 6 - Efeito terapêutico e dose-dependente de morfina na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia 35**
- Figura 7 - Efeito terapêutico da indometacina, 1400W e HOE-140 na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia 36**
- Figura 8 - Efeito terapêutico do remicade na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia 37**
- Figura 9 - Dosagem de IL-1, TNF- α , IFN- γ e NO em camundongos submetidos à meniscotomia 38**

LISTA DE ABREVIATURAS

OA	Osteoartrite
DMM	Desestabilização do menisco medial
TLCA	Transecção do ligamento cruzado anterior
MMx	Meniscectomia
ECM	Matriz extracelular
DMOAs	Drogas modificadoras da Osteoartrite
AINES	Anti inflamatórios não esteroidais
EROS	Espécie reativa de oxigênio
IL-1	Interleucina 1
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
NO	Oxido Nítrico
PGE2	Prostaglandina 2
COX 2	Cicloxigenase 2
NOSi	Oxido nítrico síntase
HA	Acido Hialurônico
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme- linked immunosorbent assay)
i.m.	intramuscular
i.p.	intraperitoneal
s.c.	subcutâneo
EDTA	Sal sódico do ácido etilenodiamino- tetra- acético
PBS	Salina tampona em fosfato

1. Introdução

1.1. Menisco

Os meniscos são estruturas fibrocartilagosas, localizadas entre a superfície articular do fêmur e tíbia, nos compartimentos medial e lateral do joelho, desempenhando papéis importantes na transmissão de carga, absorção de choques e manutenção da estabilidade articular (KOHN & MORENO, 1995; WOJTYS & CHAN, 2005). Ao contrário da cartilagem articular, que contém principalmente colágeno tipo II e muitos proteoglicanos, 98% da matriz meniscal contém colágeno tipo I e menos de 1% de proteoglicanos (MARTIN, 2008).

Os meniscos medial e lateral têm aparência de cunha e aspecto semilunar, porém o lateral exibe uma maior variedade de tamanho, forma, espessura e mobilidade (GREIS et al., 2002).

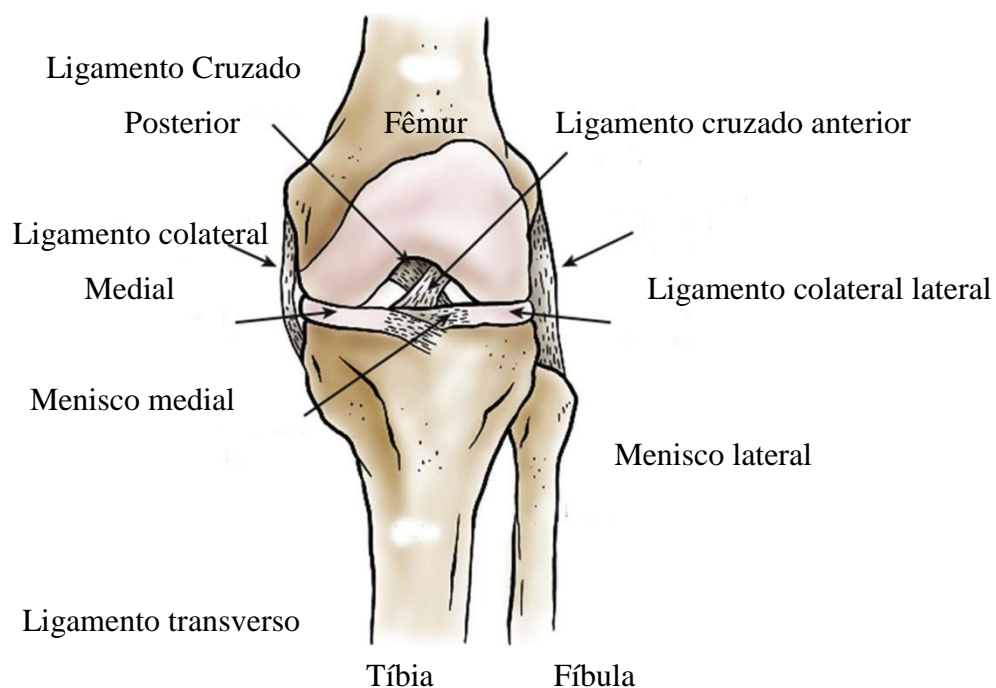


Figura 1. Meniscos e ligamentos da articulação do joelho. Visão anterior do joelho mostra os meniscos medial e lateral entre as superfícies articulares femoral e tibial, incluindo os ligamentos que colaboram na estabilização do joelho. (Modificado de ELEFTHERIOS et al., 2011).

O menisco é altamente hidratado composto por aproximadamente 72% de água e 28% de matriz extracelular e células (HERWING, 1984). Em geral, o colágeno constitui a maioria da matéria orgânica, seguido por ácido desoxiribonucleico (DNA) e glicosaminoglicanos, particularmente condroitin-6-sulfato, condroitin-4-sulfato, dermatan-sulfato e queratina, glicoproteínas de adesão e elastina (McDEVITT & WEBBER,1992; SWEIGART & ATHANASIOU, 2001). Sua vascularização diminui com a idade, com uma redução de 10-25% na fase adulta.(CLARK & OGDEN, 1983; SCOTT et al., 1997).

Quanto à injúria meniscal, essa pode ocorrer em pessoas com idade inferior a 40 anos, desencadeada por fatores como trauma, ou pessoas mais velhas, particularmente acima de 65 anos, promovida por degeneração (BAKER & YOUNG, 2011). Com o decorrer da idade, os meniscos se tornam mais propensos ao rompimento e degeneração, perdem a elasticidade e são mais facilmente agredidos (BETHAN et al,2012; IAN MCDERMOTT, 2011). O rompimento pode causar dor e inchaço, levando à incapacitação articular (ENGLUND et al., 2008).

A prevalência das lesões meniscais em pacientes com achados clínicos e radiográficos de osteoartrite (OA) é de 68 a 90% (ENGLUND et al., 2008; BHATTACHARYYA et al.,2003). Nos Estados Unidos, as lesões do menisco representam a maioria das lesões no joelho e são as mais frequentes causas de procedimentos cirúrgicos realizados por cirurgias ortopédicas. Em 80% dos casos de lesões traumáticas em jovens pela prática de esportes, ocorre o rompimento do ligamento cruzado anterior (SALATA et al., 2010; RUBMAN et al., 1998; STONE et al., 1990).

As lesões dos meniscos, independente do tipo de lesão, tempo de duração, atividade física e idade dos pacientes, são tratadas pela retirada total ou parcial do menisco (BRONSTEIN,2002; CARDOSO,2002). Várias abordagens para reparar ou substituir o menisco tem sido testadas, porém com sucesso limitado. Por vários anos, a meniscectomia (retirada do menisco) total ou parcial foi um procedimento muito comum para alívio imediato dos sintomas. Entretanto, inúmeros estudos mostraram uma associação entre meniscectomia e aumento da frequência de OA radiográfica e redução na função do joelho (BETHAN et al., 2012; GEAR, 1967; JORGENSEN et al., 1987). A meniscectomia total ou parcial no joelho humano, a médio e longo prazo, apresenta importantes efeitos deletérios sobre a articulação, especialmente no que diz respeito à distribuição de forças na superfície articular. A área de contato articular após a retirada desse menisco diminui em até 50%, produzindo aumento de até 350% da concentração das forças de contato nessa área. Esse fato acelera a degradação da

cartilagem articular, resultando em osteoartrite precoce, principalmente ocasionada pelas lesões dos meniscos mediais (FELIX & PAULOS,2003; BOSS et al., 2000; WIRTH et al., 2002; KLIMKIEWICZ &, SHARFFER, 2002; JOHN, 2004).

Estudos relatam piores resultados após meniscectomia lateral, uma vez que o menisco lateral transporta cargas mais pesadas. As geometrias do compartimento medial e lateral tibiais diferem significativamente. O platô tibial medial é ligeiramente côncavo, dando um grau de congruência natural entre essa superfície e o côndilo femoral medial convexo. Entretanto, o platô tibial lateral é convexo. Na ausência do menisco lateral, essa convexidade agindo contra a convexidade do côndilo femoral lateral aumenta significativamente a pressão de contato. Assim, as consequências da meniscectomia lateral são significativamente maiores do que a da medial (McDERMOTT, 2006).

Na impossibilidade de reparar o menisco lesado e/ou quando se impõe a necessidade de sua remoção, surgem como opções o transplante de menisco e a utilização de próteses meniscais, ainda em fase de experimentação (MORA & ALVAREZ, 2003; VAN ARKEL & BOER,1995). Há 20 anos, realizou-se o primeiro transplante de meniscos em humanos. Ao longo desse período, cerca de 4.500 cirurgias já foram relatadas em todo o mundo, mostrando ser um procedimento potencialmente eficaz na prevenção da osteoartrite após meniscectomia (BRONSTEIN,2002; WIRTH et al.,2002; KLIMKIEWICZ & SHAFFER, 2002; PETERS & WIRTH, 2003; McDERMOT,2006). Uma revisão de literatura mostrou índices de 86% a 91% de resultados satisfatórios, em pacientes submetidos a transplante meniscal, após meniscectomia (ELLINGSON & SEKIJA, 2004), Entretanto, estudos são ainda necessários considerando-se as características biológicas, estruturais e funcionais do menisco nativo.

1.2. Osteoartrite (OA)

A OA é uma doença articular crônica degenerativa, muito comum em pessoas idosas, decorrente do uso e desgaste da articulação, embora possa acometer jovens após lesões articulares (ANTHONY et al., 2000, American College of Reumathology, 2012). Acreditava-se tratar de uma doença progressiva de evolução lenta, sem perspectiva de tratamento, encarada por muitos como um processo natural do envelhecimento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA,2003). Porém, com o passar dos anos, a OA passou a ser vista como uma enfermidade em que é possível modificar o seu curso evolutivo, tanto em relação ao tratamento quanto ao prognóstico (BIJLSMA E KNAHR,2007).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Reumatologia, “a osteoartrite é uma das doenças mais frequentes do conjunto de doenças agrupadas sob designação de reumatismo, representando cerca de 30 a 40% das consultas ambulatoriais de Reumatologia”. No Brasil, sua importância pode ser demonstrada através dos seguintes dados da Previdência Social: - responsável por 7,5% de todos os afastamentos do trabalho; - segunda doença entre as que justificam o auxílio-inicial; - segunda em relação ao auxílio-doença (em prorrogação); - quarta a determinar aposentadoria. Sua incidência é maior em mulheres, aumentando com a idade, sendo menos comum antes dos 40 anos e mais frequente após os 60 anos.

Análise anatômica e aplicação de técnicas histopatológicas de imagens ajudaram a definir a história da doença em relação às alterações estruturais na cartilagem articular. Foi demonstrado por Brandt et al. (2006) que a OA não é exclusivamente uma doença da cartilagem articular, mas da articulação como um todo, incluindo osso subcondral, ligamentos, músculos, sinóvia, meniscos e cápsula articular (FELSON et al.,2006; DING et al., 2008, POOLE,2010;HEDBOM & HAUSELMANN, 2002).

A OA resulta tanto de eventos mecânicos quanto biológicos que desequilibram o acoplamento entre os processos de degradação e síntese da matriz extracelular cartilaginosa e osso subcondral. Considerada uma doença multifatorial, em que uma variedade de causas resulta em uma patogenia comum (Brandt et al 2006), múltiplos fatores bem definidos se relacionam à OA, tais com envelhecimento, obesidade, sexo e lesões articulares (NIGG & HERZOG,2002). As pessoas com maior sobrepeso apresentam maior incidência de OA. A obesidade está associada à progressão mais rápida da lesão, com achados mostrando diminuição dos sintomas da OA pela perda de peso (BIJLSMA & KNAHR,2007). Lesões de ligamento ou meniscos são fatores de risco para o desenvolvimento de OA prematura (ENGLUND, 2010; ANDRIACCHI & MUNDERMANN, 2006). Após lesão traumática, há aumento de mediadores pró-inflamatórios e catabólicos associado a alterações na carga e metabolismo de condrócitos. Essas alterações iniciam um ciclo crônico que leva à destruição da superfície articular e promove o desenvolvimento dos sintomas da OA (GOLDRING & OTERO,2011; LOTZ & KRAUS 2010).

Sinovite leve e persistente, fibrose da cápsula articular, “frouxidão” dos ligamentos e atrofia da musculatura periarticular ocorrem na OA, considerada como um estado de insuficiência de toda a articulação diartrodial. Quando clinicamente manifesta, caracteriza-se por dor articular, limitação dos movimentos, crepitações e deformidades sem manifestações sistêmicas. Embora possa afetar qualquer articulação sinovial, acomete principalmente

joelhos, quadris, mãos e coluna, podendo ocorrer em uma ou mais articulações (tese Saraiva). Na fase clínica da doença, uma reação inflamatória que envolve a membrana sinovial está muitas vezes presente. Esse processo favorece a síntese de mediadores inflamatórios e citocinas que têm um impacto sobre a homeostase da cartilagem, alterando o metabolismo dos condrócitos (JOHANNE et al., 2000).

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

1.3. Modelos experimentais de OA

Diversos modelos têm sido utilizados para o estudo da OA, classificando-os em espontâneos, geneticamente modificados e induzidos químico, enzimático ou cirurgicamente (BENDELE, 2001; VAN DEN BERG, 2001; LITTLE & ZAKI, 2012). Atualmente não existe um modelo ideal que englobe de forma precisa todos os aspectos da doença humana (AMEYE & YOUNG, 2006)

Esses modelos têm desempenhado papel fundamental na compreensão dos eventos iniciais ocorridos na OA e incluem: ovariectomia (modelo descrito recentemente induzido por deficiência de estrogênio em que há erosões leves da cartilagem articular do joelho 9 semanas após a cirurgia e importante para o esclarecimento do papel do osso na patologia da AO); - injeção de iodoacetato (modelo utilizado para validação da dor); - ranhura articular (modelo em que OA é induzida por defeitos da cartilagem); - indução de colagenase (modelo em que há formação de osteófitos por macrófagos sinoviais); - impacto transarticular (modelo de trauma em que a OA é induzida por um defeito ósseo) (LAURENT et al., 2006; ANDERST et al., 2005).

Animas que desenvolvem OA espontaneamente são provavelmente os que melhor expressam a evolução lenta da doença. Contudo exige um tempo muito longo de observação e apresentam progressão variável, dificultando seu uso para comparação de tratamentos. Os geneticamente modificados são bastante utilizados, já que alguns permitem avaliar o papel de moléculas específicas na fisiopatologia da doença, embora provavelmente não sejam

adequados para avaliação pré-clínica de Drogas Modificadoras da Osteoartrite (DMOAs). Em modelos de OA induzidos cirúrgico ou quimicamente, o dano articular se desenvolve de forma mais rápida e previsível. Esses modelos desempenham um papel fundamental na compreensão dos eventos iniciais da OA, porém são mais compatíveis com a OA secundária (ANDERST et al., 2005).

Atualmente, inúmeros modelos murinos cirúrgicos de OA são estudados, incluindo a desestabilização do menisco medial (DMM), transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) e remoção (meniscectomia) do menisco medial com ou sem transecção de ligamentos. Modelos cirúrgicos de instabilidade mecânica são os mais utilizados por reproduzirem experimentalmente o trauma crônico observado na OA. Essa instabilidade leva ao desenvolvimento das lesões na cartilagem e remodelação óssea. Dentre os modelos, a TLCA é o mais utilizado (HAYAMI et al., 2006), com alterações compatíveis com OA humana, edema de matriz, perda de condrócitos e fibrilação da cartilagem. Além das alterações da cartilagem, esse modelo apresenta remodelação óssea caracterizada pela perda inicial do osso subcondral após 2 semanas da cirurgia, com posterior aumento do volume (HAYAMI et al., 2004; HAYAMI et al., 2006).

A meniscectomia do menisco medial produz uma doença degenerativa articular e lesões consistentes em camundongos. Pequenas alterações degenerativas foram observadas 4 semanas após a cirurgia e modificações estruturais progressivas foram visualizadas após 8 e 12 semanas (CHANCIE et al., 2012). Em um estudo realizado por Tadashi et al., 2006 foram avaliados os modelos de TLCA e combinação da TLCA com meniscectomia. O autor observou uma progressão mais lenta da doença na TLCA. Na combinação, ocorreu dano agressivo à cartilagem após 2 semanas da cirurgia, bem como formação de osteófitos e fibrilação. Essa gravidade foi associada ao maior grau de instabilidade articular.

A transecção do menisco medial é estudada em várias espécies, como ratos e coelhos. Histologicamente, o início da lesão em ratos é definido pela fibrilação e perda de proteoglicanos e, em estágios mais avançados, ocorre exposição do osso subcondral e formação de osteófitos. Alterações no osso subcondral podem ser observadas cerca de 7 dias após a cirurgia, prosseguindo até o final do estudo. A semelhança das lesões observadas na transecção do menisco medial em ratos para as mencionadas na condição humana fornece fundamentos para examinar as respostas comportamentais. Essas semelhanças histológicas, juntamente com a possibilidade de induzir respostas pelo uso de analgésicos nesse modelo, sugerem que este pode ser utilizado na identificação de novas abordagens destinadas a

diminuir os sinais e sintomas associados à OA, bem como identificar possíveis alvos que alterem os eventos associados à degradação da cartilagem e osso subcondral (BOVE, 2006).

No método de avaliação da dor pela distribuição do peso, foi observado que animais submetidos à desestabilização do menisco medial apresentaram menor distribuição do peso comparado aos animais naive, o que não ocorreu com os animais submetidos à meniscectomia parcial medial (INGLIS et al., 2008; McNamee et al., 2010). Essa diferença pode ser atribuída à hipernocicepção causada pela contínua instabilidade do menisco medial na desestabilização. Comportamentos de dor decorrentes da OA em camundongos C57BL/6 foram previamente relatados em dois estudos usando o modelo cirúrgico de DMM. Nesses estudos, os animais desenvolveram doença articular degenerativa, acompanhada de déficits de distribuição do peso, diminuição da atividade espontânea (INGLIS et al., 2008) e alodínia mecânica (MALFAIT et al., 2010). Estudos mostraram que o modelo de TMM induz uma desordem articular progressiva lenta e bem definida durante 16 semanas, com o surgimento de dor potencial na fase inicial. Assim, a natureza prolongada desse modelo permite estudar as fases iniciais da patologia da OA, incluindo os eventos associados à dor (BOVE et al., 2006; INGLIS et al., 2008; MALFAIT et al., 2010).

Assim, o modelo de TMM é um modelo que imita tanto alterações estruturais como sintomáticas, associadas à OA humana. A possibilidade de se estudar ambas as alterações em um modelo, associada ao fato de que elas estão presentes na condição humana e à habilidade do modelo em responder à terapia convencional de alívio da dor, indica que o modelo de TMM pode ser usado para a compreensão dos mecanismos envolvidos na OA, através da modulação farmacológica e outras ferramentas (BOVE et al., 2006).

1.4. Osteoartrite e inflamação

O processo inflamatório ocorre como resposta do tecido à injúria celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, envolvendo componentes vasculares e celulares, bem como uma variedade de substâncias solúveis. Esse processo se manifesta pelo rubor, calor, edema, dor e incapacidade funcional frente a agentes lesivos, como: - físico (queimadura, radiação, trauma); - biológico (microrganismo, reações imunológicas); - químico (substância cáustica). Esse processo envolve uma complexa cascata de eventos, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento do influxo celular, produção de mediadores inflamatórios, alterações nos parâmetros hemodinâmicos e permeabilidade vascular (BECKER., 1983; MOORE et al., 2001; CRUVINEL et al., 2010).

Por muito tempo, a OA foi considerada uma doença não inflamatória. Entretanto, evidências crescentes mostram reação inflamatória no tecido sinovial de pacientes com OA (FELSON,2006; OGDIE et al.,2010), sugerindo a participação ativa da sinovite e sistema imune no desenvolvimento e progressão da doença (BROKAAR et al.,2012). Algum grau de sinovite está presente desde as fases iniciais da OA, sendo caracterizada por hiperplasia, hipertrofia e angiogênese. Estudos mostram que, em exames histológicos da sinóvia, observa-se infiltrado de células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos T e B (PELLETIER, 2004; HAYWOOD et al.,2003; OEHLER et al., 2002).

Em situações inflamatórias, linfócitos e macrófagos são fontes importantes de citocinas, assim como condrócitos. Elas estão intimamente associadas a alterações funcionais da sinóvia, cartilagem e osso subcondral, sendo produzidas tanto espontaneamente quanto por estimulação celular (ATTUR et al., 2002; JULIO et al.,2002). Estudos mostram produção abundante de citocinas tais como IL-1 α , IL-8, IL-6, TNF – α e IFN – γ na articulação acometida por OA e sugerem uma associação entre esses mediadores e a destruição da cartilagem. Apontam ainda interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) como principais mediadores envolvidos na patogênese da OA, assim como na inflamação sinovial e ativação dos condrócitos (SILVESTRE et al., 2006; BONDESON et al., 2006).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram participação de IL-1 e TNF- α na destruição da cartilagem, com IL-1 agindo via ativação da síntese de metaloproteinases, redução da síntese dos inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) e inibição da síntese de colágeno e proteoglicanos. Essas citocinas podem induzir a produção de outras citocinas (IL-8 e IL-6) pelas células articulares comuns, tais como condrócitos e células sinoviais. Elas podem provocar ainda a produção de prostaglandina E2 (PGE2) que, além de promover aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, estimula a reabsorção óssea e aumenta a expressão do receptor de IL-1. A IL-1 age em sinergismo com TNF- α , que induz a liberação de PGE2 e IL-6, com esse potencializando os efeitos da IL-1(GOLDRING 2001, JULIO, 2002; PELLETIR et al.,2001).

A produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias observada na OA contribui ainda para a síntese de espécies reativas de oxigênio (RUIZ-ROMERO et al., 2009). Segundo Henrotin et al (2003), essas espécies colaboram para a disfunção e degradação da cartilagem. Em concordância, óxido nítrico (NO) degrada a cartilagem articular através da ativação de metaloproteinases, inibição da síntese de colágeno e indução da morte de condrócitos (YORIMITSU et al., 2008).

1.5. Osteoartrite e dor

Dor é a principal manifestação clínica da OA e o principal motivo pelo qual os pacientes procuram assistência médica. Porém, uma das dificuldades na interpretação do fenômeno doloroso na OA é a falta de correlação observada entre lesão estrutural e sintomas. Sabe-se que pessoas com alterações radiográficas compatíveis com OA apresentam maior chance de desenvolver dor do que indivíduos sem esse tipo de alteração. Contudo, nem todos aqueles com alterações radiográficas desenvolvem dor (DAVIS et al., 2002; KIDD, 2006).

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

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

Dor na OA geralmente é vista como uma dor nociceptiva periféricamente mediada, que causa percepções emocionais desagradáveis. No entanto, foi demonstrado que, quando são liberados mediadores inflamatórios intra-articular a partir de tecido danificado, esses modulam tanto nociceptores periféricos quanto centrais (HOCHMAN et al., 2011; IYENGAR et al., 2004). Embora o mecanismo exato da dor no joelho ainda não esteja esclarecido, acredita-se estar relacionado à inflamação através da produção de citocinas inflamatórias (SUMIHISA et al., 2011). A capacidade da inflamação provocar dor depende da inervação sensorial da articulação (BONNET & WALSH, 2005). A cartilagem não é inervada e, portanto, não pode ser a fonte de dor. Contudo, osso subcondral, membrana sinovial, ligamentos e cápsula articular são ricamente inervados e contêm fibras nervosas que podem ser fonte de estímulos nociceptivos na OA (KIDD et al., 2004). Durante a inflamação, os

produtos químicos como, prostaglandinas, leucotrienos, bradicinina e citocinas (particularmente TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, histamina e serotonina) são liberados na articulação e parecem aumentar a sensibilidade dos nociceptores, presentes nos tecidos adjacentes à articulação, aos estímulos mecânicos e químicos, aumentando a dor (DRAY, 1995; KIDD & URBAN, 2001; BONNET & WALSH, 2005).

Cunha et al. (2007), estudando o papel das citocinas na hipernocicepção, observaram a liberação de prostanoídes por IL-1 β e mediação de IL-8 ou CINC-1 na participação dos componentes simpáticos da hipernocicepção inflamatória. O possível envolvimento do TNF na fase inicial da hipernocicepção foi sugerido por se tratar de uma molécula-chave na iniciação do processo inflamatório, estimulando a liberação de IL-1 e quimioquinas. Das et al. (2010), estudando a dor no modelo de desestabilização do menisco medial em camundongos C57BL/6, demonstraram um início rápido de alodínia mecânica em duas semanas, permanecendo ao longo de oito semanas após a cirurgia.

1.6. Tratamentos da OA

O tratamento clínico para OA ainda permanece paliativo e pouco eficaz. Nenhuma terapêutica produz benefícios semelhantes ao da prótese articular (BRANDT, 2004, TOWHEED et al., 2006; CEPEDA et al., 2006). Entretanto, Drogas Modificadoras da Osteoartrite (DMOA), capazes de modificar a evolução da doença, são alvo da comunidade acadêmica e indústria farmacêutica como forma de compreender as diversas vias etiopatogênicas envolvidas na iniciação e progressão da OA. Para ser reconhecida como uma DMOA, ela deve modular a perda do espaço articular e demonstrar benefícios em desfechos clínicos relevantes (ABADIE et al., 2004)

Na ausência de fármacos modificadores da doença, o tratamento de pacientes com OA é muitas vezes dirigido a aliviar a dor e restaurar a função através da utilização de terapias farmacológicas (TOOD & CLISSOLD, 1990; WILDY & WASKON, 2001). Essas incluem o paracetamol, antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e analgésicos opioides. Entretanto, elas são associadas a efeitos colaterais significativos (ALTMAN et al, 2000; WIELAND et al., 2005; MALEMUD, 2010). Os AINEs especificamente agem na inflamação associada à OA por meio da inibição da ciclooxigenase (COX). (WIELAND et al., 2005). Essas drogas apresentam efeitos secundários indesejáveis potenciais e eficácia variável. Assim, permanece a necessidade de novas abordagens farmacológicas para o tratamento da dor na OA ou administração de drogas existentes.

Uma opção alternativa de tratamento aos AINEs inclui a utilização de ácido hialurônico (HA) e corticosteroides (HARVEY & HUNTER, 2010). O HA fornece propriedades viscoelásticas e lubrificação adequada para manter a homeostase da articulação. Injeções intra-articulares do HA inibem a degradação da cartilagem, induzem a síntese da matriz e reduzem os sintomas da dor (GIGANTE & CALLEGARI, 2011; CURRAN, 2010; PLAAS et al., 2011). A administração de corticosteroides em baixas doses reduz tanto a expressão de mediadores pró-inflamatórios quanto diminui o edema articular (PEKAREK et al., 2011; SNIBBE & GAMBARDELLA, 2005).

Os sulfatos de condroitina e glicosamina também são utilizados para alívio da dor, porém essa analgesia é atribuída particularmente a possíveis propriedades modificadoras da doença e não ao efeito analgésico direto desses compostos. Ainda, a aplicação tópica de um creme contendo glicosamina reduziu a dor em pacientes com OA de joelho (TALLARIDA et al., 2003; COHEN et al., 2003). Em estudos realizados pelo nosso grupo, foi mostrado que a combinação de sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina reduz a hipernocicepção em um modelo experimental de OA. O tempo de suspensão da pata foi reduzido em 18,5% nos animais que receberam a combinação dos sulfatos e em 13,5% no grupo que recebeu apenas sulfato de glicosamina, mostrando que ele isoladamente também reduz a dor, porém em menor proporção do que a combinação.

Em 2010, a “Food and Drug Administration” (FDA) aprovou o uso de duloxetina para dor músculo esquelética crônica, incluindo a dor na OA. Suzan et al., 2012 mostraram que pacientes que foram tratados com duloxetina durante 16 semanas obtiveram uma melhora significativa da dor, uma vez que, além de antidepressiva, ela tem um efeito analgésico de ação central (WONG & BYMASTER, 2002).

O ibuprofeno também é utilizado em doentes com OA para tratar estados de dor e inflamação. Porém, os dados são ainda limitados quanto ao seu efeito clínico. Em um estudo, a administração de ibuprofeno por 7 dias reduziu a dor e melhorou o estado de saúde de pacientes programados para artroplastia do joelho (GALLELLI et al., 2012).

O bloqueio de citocinas começou a ser proposto como terapia na OA. Como citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel significativo, mediando a degradação da cartilagem, a sua inibição, particularmente de IL-1 β e TNF- α , pode ser viável para diminuir a progressão da OA. Antagonistas do receptor de IL-1 β mostraram efeito promissor na inibição

das alterações estruturais em modelos de OA em coelhos, cães e cavalos (HUNTER,2011; BITTON,2009).

2. Justificativa

A lesão do menisco por injúria ou degeneração, e a retirada promovem a desestabilização articular e dor, e encontram-se frequentemente associados ao desenvolvimento e progressão da OA em seres humanos. Devido às funções que o menisco exerce na manutenção da função articular, a conduta adotada é a preservação ou substituição, jamais a remoção meramente, mesmo que os benefícios dos procedimentos de preservação não estejam claros.

Considerando esses aspectos acima exposto, pretendemos investigar o efeito de um modelo de meniscectomia (retirada) comparado a um de meniscotomia (secção sem retirada do menisco) no desenvolvimento de hipernocicepção e lesão histológica de OA em camundongos, enfocando ainda a modulação da hipernocicepção por mediadores inflamatórios ou analgésicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar o desenvolvimento da OA em modelos de meniscotomia (desestabilização do menisco) e meniscectomia (remoção do menisco) e sua resposta a diferentes drogas antiinflamatórias.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a hipernocicepção articular em camundongos submetidos à meniscotomia ou meniscectomia, durante 7 semanas;

- Quantificar o influxo celular em camundongos submetidos à meniscotomia ou meniscectomia, após 7 semanas do ato cirúrgico;

- Analisar a resposta a antiinflamatórios na hipernocicepção articular em camundongos submetidos à meniscotomia;

- Analisar o dano histológico às articulações de camundongos submetidos à meniscotomia ou meniscectomia, após 7 semanas do ato cirúrgico;

- Determinar os níveis de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO) e citocinas, no lavado articular de camundongos submetidos à meniscotomia ou meniscectomia, após 7 semanas do ato cirúrgico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (20-25 g) machos fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará - UFC. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum* e foram submetidos a condições controladas de temperatura (21° C), com 12h de ciclo claro/escuro. Todos os procedimentos cirúrgicos e tratamentos foram realizados seguindo as diretrizes preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), buscando minimizar o número e o sofrimento dos animais. O referente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará – UFC, sob o número n° 113/07.

4.2. Indução da osteoartrite experimental - Desestabilização do menisco e Meniscectomia com Transecção do Ligamento Cruzado Anterior (TLCA)

Camundongos (n = 8) foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intramuscular (i.m.). O joelho direito foi depilado e submetido à assepsia, seguida por uma incisão longitudinal da pele. A cápsula articular medial foi exposta, através de uma incisão perpendicular ao ligamento colateral medial, após o que o ligamento cruzado anterior foi seccionado. Em seguida, o menisco medial foi transeccionado (menisctomia) ou removido (meniscectomia). Depois da transecção ou remoção do menisco medial, a cápsula articular e a pele foram suturadas com Vycril 5-0 e Nylon 4-0, respectivamente. O grupo sham (falso-operado) foi submetido apenas à incisão da pele e ruptura da cápsula articular medial, seguidas pela sutura dos tecidos. Animais naive não foram submetidos a qualquer manipulação cirúrgica. Os animais foram sacrificados com 15, 28 e 49 dias após o procedimento cirúrgico (KAMEKURA et al., 2005; KAY et al, 2010).

4.3. Avaliação da hipernocicepção articular

Para avaliação da hipernocicepção articular pelo método do von Frey eletrônico, camundongos foram colocados em caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura), sobre uma grade de arame, 20 a 30 min antes da avaliação, para ambientação. Estimulações foram feitas apenas quando os animais estavam quietos, sem realizar movimentos exploratórios e não defecando e repousando sobre as patas. Nesses experimentos, um quantificador de pressão

eletrônico foi utilizado, consistindo de um transdutor de força manual equipado com uma ponta de polipropileno (Insight Equipamentos Científicos Ltda). Essa era aplicada perpendicularmente à área central da pata traseira direita, com aumento gradual da pressão. A intensidade da força aplicada era registrada pelo equipamento quando a pata era retirada. O teste foi repetido até que três medidas similares fossem obtidas (isto é, a variação entre essas medições fosse inferior a 1 g). O limiar mecânico da flexão foi expresso em gramas (CUNHA et al., 2004; GUERRERO et al., 2008). O período de avaliação dos animais foi de até 7 semanas.

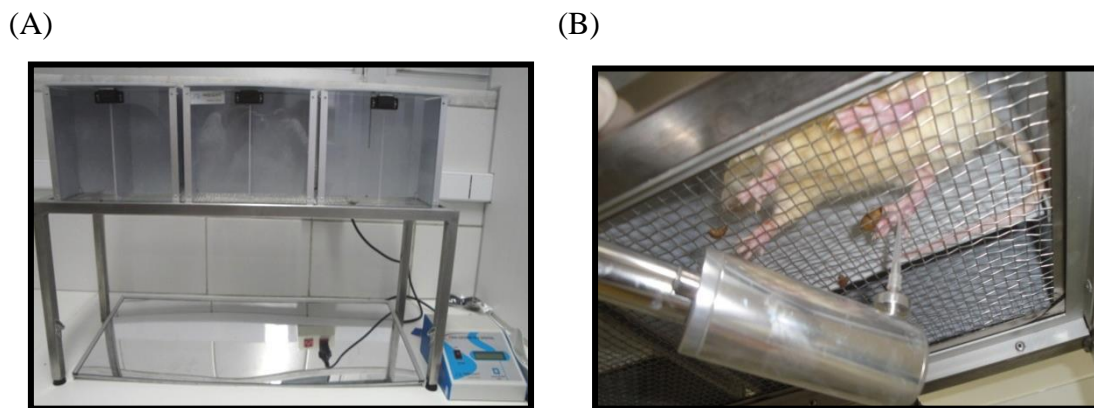


Figura 2- Avaliação da hipernocicepção articular por analgesímetro digital (von Frey em camundongos. (A) Caixas de contenção de acrílico, com espelho refletor de posicionamento, para ambientação dos animais e posterior registro da hipernocicepção. (B) Registro da hipernocicepção articular por analgesímetro digital (von Frey). Animais foram postos nas caixas de contenção e uma ponta de polipropileno, acoplada a um transdutor de força manual, foi aplicada perpendicularmente à área central da pata traseira direita dos camundongos, com aumento gradual da pressão. A intensidade da força aplicada foi registrada pelo equipamento quando da retirada da pata e expressa em gramas (g).

4.4. Coleta do lavado articular

Os animais foram sacrificados após 7 semanas da cirurgia, por deslocamento cervical. Após o sacrifício, as cavidades articulares foram lavadas através de 2 injeções intra-articulares, seguidas de aspiração, de 50 μ L de 10 mM de EDTA diluído em PBS. A contagem celular no lavado articular foi realizada em câmara de Neubauer e, em seguida, o lavado foi centrifugado (500g/10min), os sobrenadantes foram aliquotados e conservados a -80°C para posterior dosagem de citocinas (IL-1, TNF- α , INF gama) e NO (ROCHA, 1999).

4.5. Determinação dos níveis de citocinas

A determinação dos níveis de citocinas foi realizada nos sobrenadantes articulares coletados por ELISA. Microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos policlonais e incubadas *overnight* a 4°C. Após bloqueio das placas, os padrões de citocinas e as amostras foram adicionados em duplicata por 2h (22°C). Um anticorpo secundário biotinizado foi adicionado, seguindo-se de incubação por 1h (22°C). Por último, 100 µL de avidina-peroxidase (diluída a 1:5000; DAKO A/S, Dinamarca) foram adicionados a cada poço. Após 30 min, as placas foram lavadas e o reagente O-fenilenodiamina e H₂O₂ foram adicionados. A reação foi interrompida com H₂SO₄ e a leitura da D.O. realizada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL (CUNHA, 2008).

4.6. Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)

A quantidade de NO no lavado articular foi avaliada indiretamente pela medida da concentração total de nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) através de kit comercial baseada na reação de Griess. O nitrato foi convertido a nitrito por incubação com a enzima nitrato redutase. Quarenta microlitros de cada amostra foram incubados com 40 µL de nitrato redutase (0,4 U/mL) e 40 µL de NADPH (1 mM) por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, 80 µL do reagente de Griess (um volume de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% para um volume de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1%) foram adicionados, e a absorbância foi medida por espectrofotometria. A concentração de nitrito foi obtida por comparação da absorbância com a de soluções com concentração conhecida de nitrito (1-100µM). Os dados (em µM) foram expressos como média ± EPM para cada grupo (ROCHA, 2006).

4.7. Histopatologia

Após o sacrifício dos animais, as membranas sinoviais e articulações fêmur-tibiais foram retiradas cirurgicamente. As membranas sinoviais foram fixadas em formol 10%, armazenadas em álcool 70% e incluídas em parafina. Quanto às articulações, essas foram fixadas em formol 10%, descalcificadas em solução de EDTA 10% e incluídas em parafina. Cortes histológicos seriados (5 µm), da porção mais externa para a porção mais interna, foram realizados em triplicata e corados por safranina O.

As articulações foram analisadas atribuindo-se escores, segundo padrões definidos pelo Osteoartrite Research Society International (OARSI). Segundo esse sistema, grau,

variando de 0 a 6, avalia a gravidade da lesão da cartilagem articular, enquanto estágio, variando de 1 a 4, avalia a extensão das lesões compatíveis com OA na articulação. O grau é fornecido pela lesão mais grave observada na lâmina, independente da extensão da lesão. O estágio é definido pela extensão horizontal do acometimento da cartilagem, independente da gravidade das lesões. Ao final, um escore é calculado pelo grau X estágio, o qual fornece uma avaliação combinada de gravidade e extensão do dano estrutural articular. O escore variou de 0 a 24 (ROCHA, 1999; PRITZKER, 2006).

4.8. Drogas

Morfina, naloxona, indometacina, 1400W e HOE-140 foram administrados a partir do 16º dia após a cirurgia. Para a morfina, um agonista opioide clássico, foi realizada uma curva dose-resposta (1- 4 mg/kg), via intraperitoneal (i.p.), com a dose de 2 mg/kg selecionada para os demais experimentos. Naloxona, um antagonista μ -opioide, foi administrado i.p na dose de 1 mg/kg. Indometacina, um inibidor não seletivo de COX, foi administrada na dose de 2 mg/kg, via subcutânea (s.c). 1400W, um inibidor seletivo da óxido nítrico sintase indutível (NOSi), foi administrado na dose de 0,5 mg/kg s.c.. HOE-140, um antagonista seletivo de receptor B2 da bradicinina, foi administrado na dose de 1 mg/kg s.c. Todas as drogas foram diluídas em salina, exceto a indometacina que foi dissolvida em 5% de bicarbonato.

4.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. Para comparações múltiplas entre as médias, foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA). Em seguida, aplicou-se o teste de Tukey, considerando-se significativo $P < 0,05$. Para a análise histopatológica, os resultados foram expressos em mediana e comparados usando o teste de Kruskal-Wallis, considerando-se significativo $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Cinética da hiperalgesia articular em camundongos submetidos à remoção (meniscectomia) ou transecção (meniscotomia) do menisco medial por 7 semanas

A figura 3 mostra a cinética da hiperalgesia articular em camundongos submetidos à remoção (meniscectomia) ou transecção (meniscotomia) do menisco medial por 7 semanas. A hiperalgesia articular é representada pela diminuição do limiar mecânico quando comparado ao grupo sham (animais falso-operados). A dor aumentou significativamente em ambos os grupos submetidos à manipulação cirúrgica do menisco durante os primeiros 16 dias de avaliação. Entretanto, a hiperalgesia persistiu somente no grupo meniscotomizado até a 7ª semana de observação (49º dia).

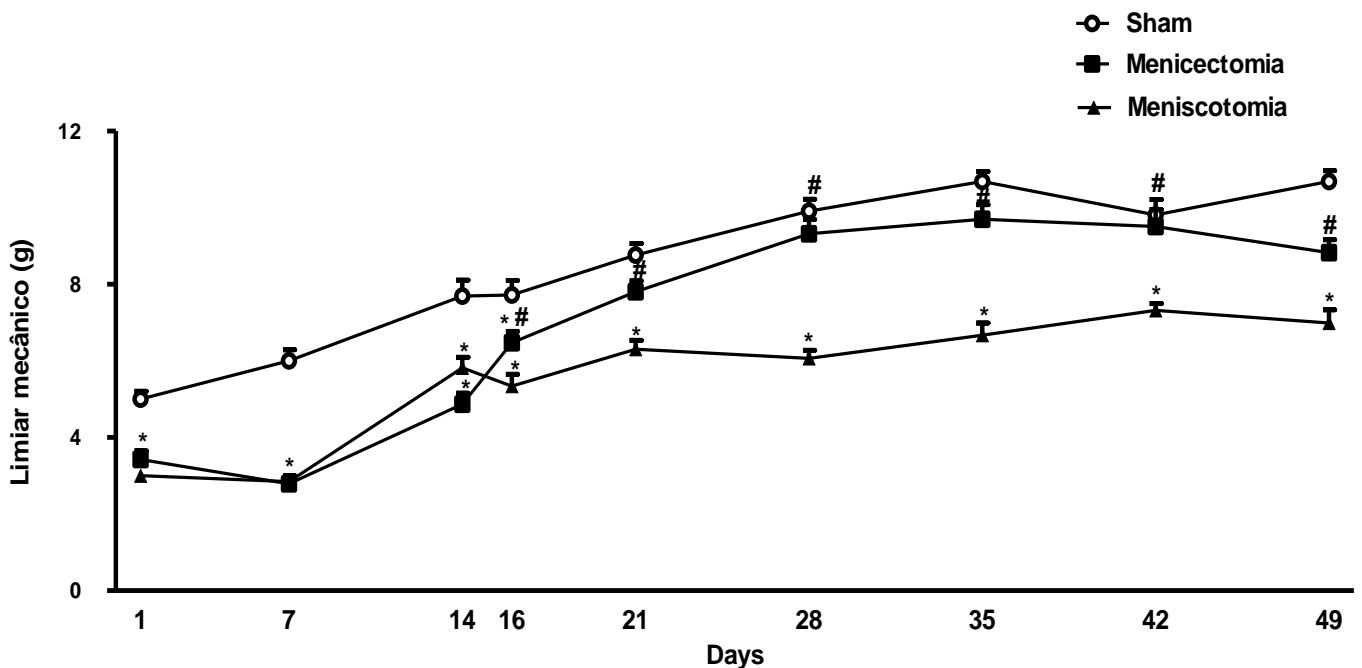


Figura 3- Cinética da hiperalgesia articular em camundongos submetidos à remoção (meniscectomia) ou transecção (meniscotomia) do menisco medial por 7 semanas. Grupo de camundongos foi submetido à meniscectomia (■) ou meniscotomia (▲) do menisco medial. Grupo sham (falso-operado) (○) foi submetido apenas à incisão da pele e ruptura da cápsula articular medial, seguida pela sutura dos tecidos. A hiperalgesia foi avaliada diariamente durante 7 semanas. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m.. *P<0,05

comparado ao grupo sham; #P<0,05 comparado ao grupo meniscotomia (ANOVA seguida de teste de Tukey). Gráfico em inglês (Days).

5.2. Análise do influxo celular articular de camundongos submetidos à meniscectomia ou meniscotomia

A figura 4 mostra o influxo celular em camundongos submetidos à meniscectomia e meniscotomia após 7 semanas do procedimento cirúrgico. Após 7 semanas, apenas a meniscotomia aumentou significativamente o influxo celular para a cavidade articular (P<0,05).

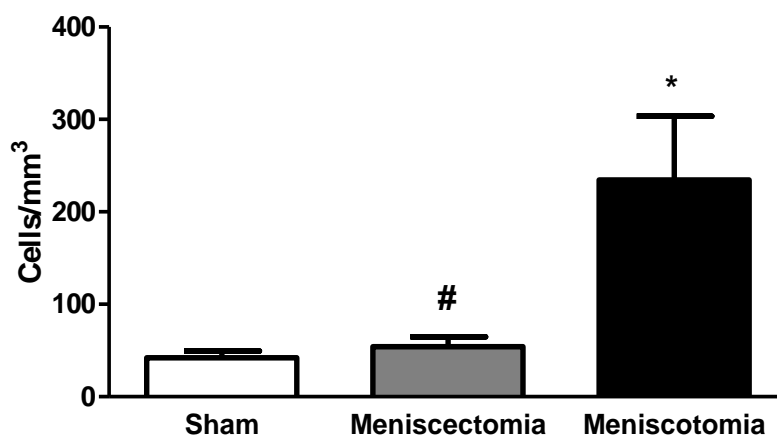
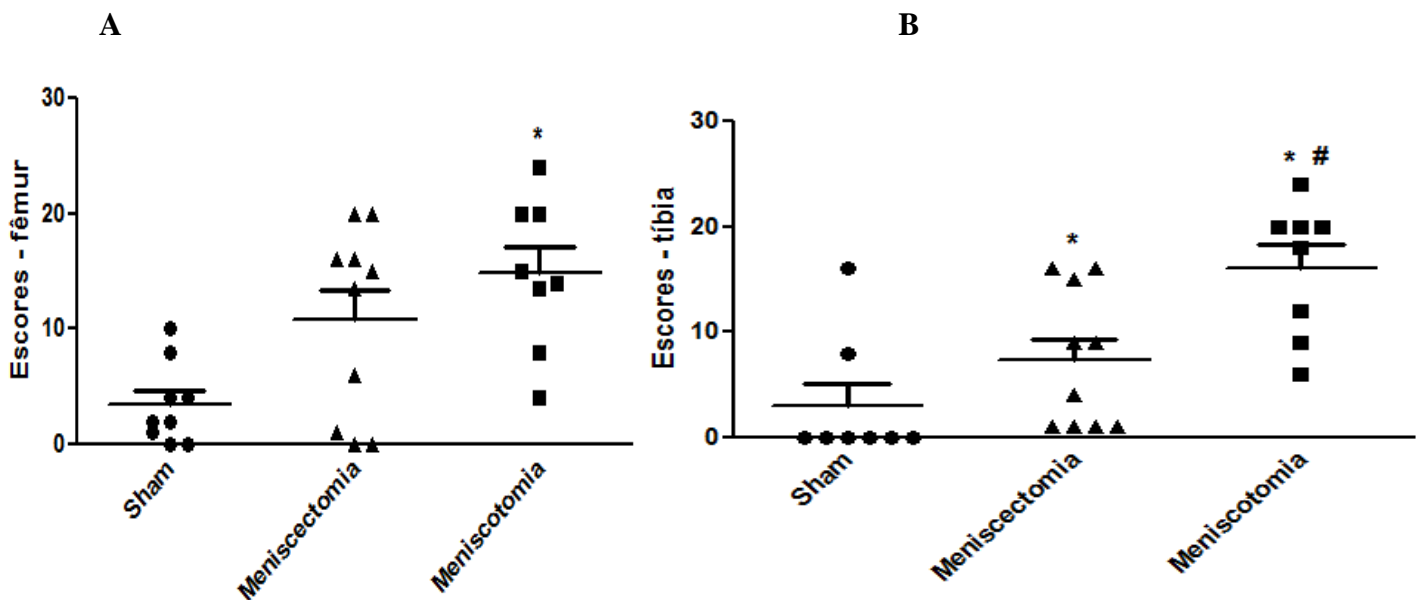


Figura 4 – Análise do influxo celular articular de camundongos submetidos à meniscectomia ou meniscotomia. Grupo de camundongos foi submetido à meniscectomia ou meniscotomia do menisco medial. Grupo sham foi submetido apenas à incisão da pele e ruptura da cápsula articular medial, seguida pela sutura dos tecidos. O influxo celular foi avaliado no lavado articular após 7 semanas do procedimento cirúrgico. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. do número células/mm³. *P<0,05 comparado ao grupo sham; #P<0,05 comparado ao grupo meniscotomia (ANOVA seguida de teste de Tukey). Gráfico em inglês Cells.

5.3. Avaliação histopatológica das articulações do joelho de camundongos submetidos à meniscectomia ou meniscotomia

A figura 5 mostra a avaliação histopatológica das articulações removidas 7 semanas após a cirurgia, coradas com safranina O (Gráficos A e B, figuras C-E). Na coloração pela safranina O, houve aumento significativo dos escores totais femorais no grupo meniscotomia, comparado ao grupo sham (Figura 3A). Na avaliação das tibias, animais meniscectomizados ou meniscotomizados mostraram aumento significativo nos escores totais quando comparado ao grupo sham ($P < 0,05$). Ainda, a meniscotomia aumentou significativamente os escores tibiais totais quando comparada à meniscectomia ($P < 0,05$) (Figura 3B).

Na microscopia óptica, o grupo sham mostrou integridade das cartilagens articulares femorais e tibiais (Figura 3C). Nos animais submetidos à meniscectomia ou meniscotomia, houve uma perda extensa e profunda de ambas as cartilagens (Figura 3D e E, respectivamente).



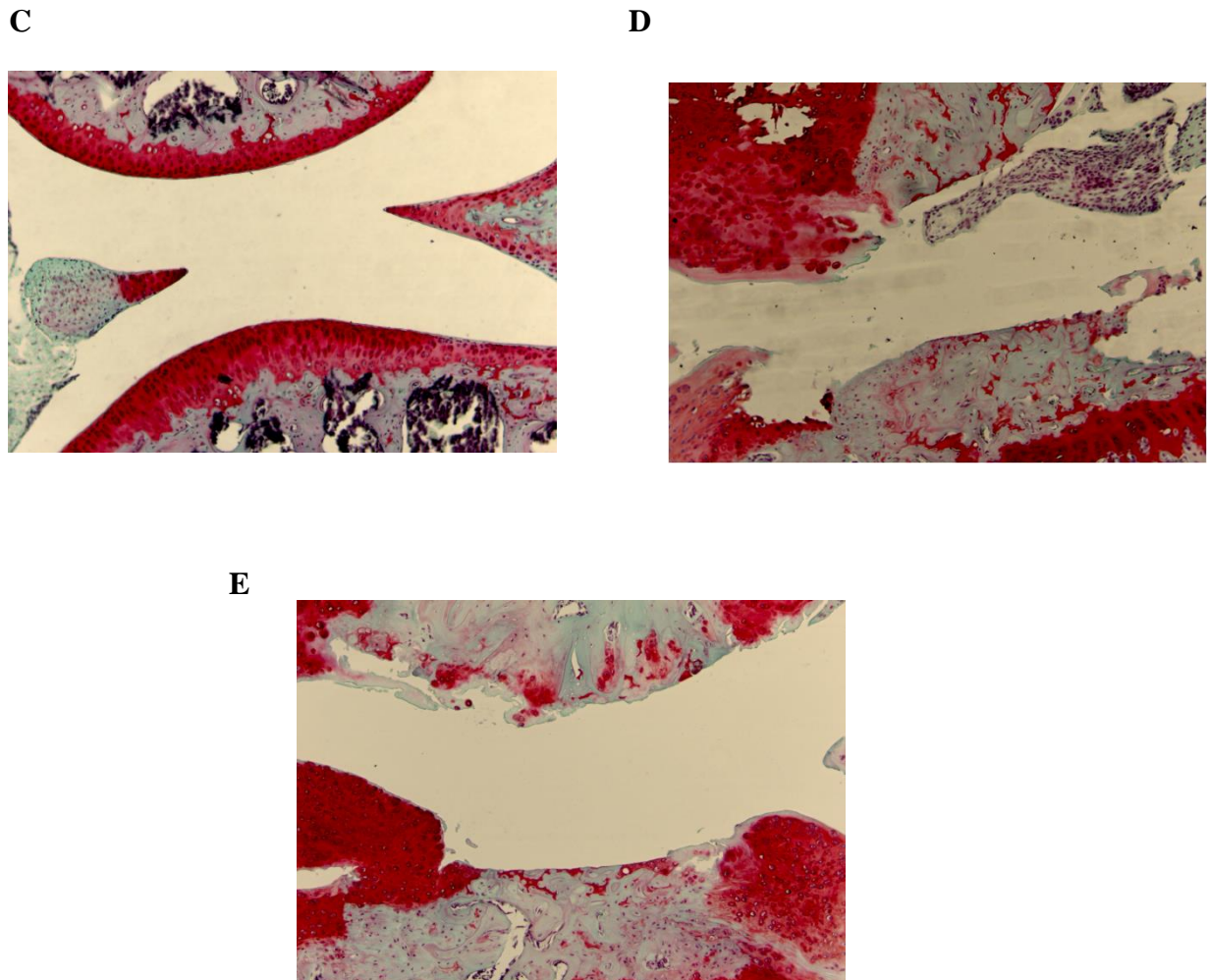
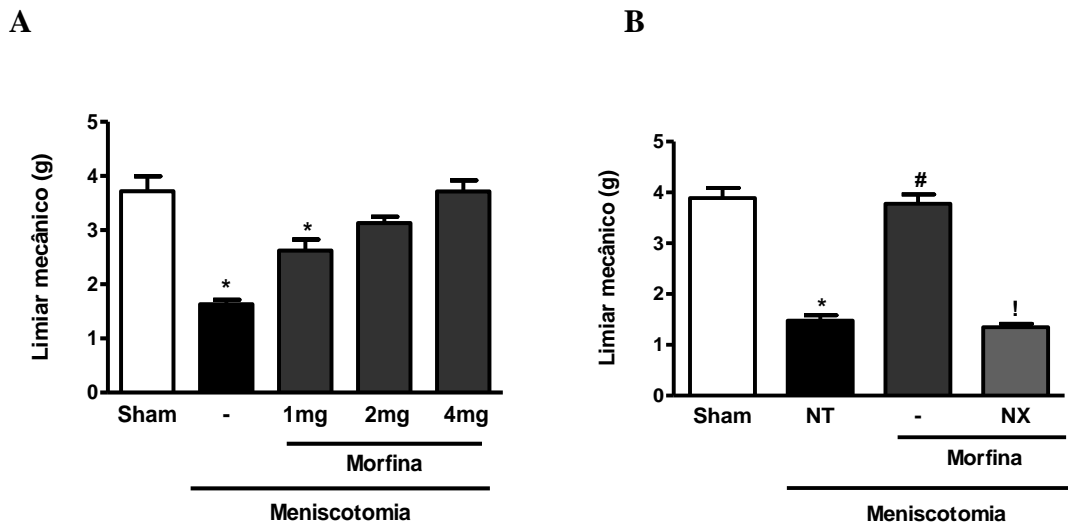


Figura 5 - Avaliação histopatológica das articulações do joelho de camundongos submetidos à meniscectomia ou meniscotomia. Grupo de camundongos foi submetido à meniscectomia ou meniscotomia do menisco medial. Grupo sham foi submetido apenas à incisão da pele e ruptura da cápsula articular medial, seguida pela sutura dos tecidos. Os resultados foram expressos como mediana dos escores totais femorais e tibiais * $P < 0,05$ comparado ao grupo sham. # $P < 0,05$ comparado ao grupo meniscectomia (teste de Kruskal-Wallis) (Coloração safranina O – 100x).

5.4. Efeito terapêutico e dose-dependente de morfina na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia

A figura 6 representa o efeito da administração terapêutica de sulfato de morfina em camundongos submetidos à meniscotomia. A injeção intraperitoneal de morfina (1, 2 e 4 mg/kg) reduziu de forma dose-dependente a hiperalgesia articular dos animais meniscotomizados comparado ao grupo meniscotomia que recebeu apenas salina i.p. (NT) ($P < 0,05$) (figura A). Esse efeito foi revertido pela administração de naloxona (1 mg/kg), 30 min antes da morfina (2mg/kg) (figura B).



(A administração de salina é representado por NT e ---)

Figura 6 - Efeito terapêutico e dose-dependente de morfina na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia. Grupo de camundongos foi submetido à meniscotomia do menisco medial. Grupo de animais recebeu morfina (1, 2 ou 4 mg/kg; i.p.) ou naloxona (1 mg/kg; i.p.), 30 min antes da morfina, no 16º dia após a meniscotomia. Grupo sham foi submetido apenas à incisão da pele e ruptura da cápsula articular medial, seguida pela sutura dos tecidos. A hiperalgesia foi avaliada após 30 min da administração. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m.. * $P < 0,05$ comparado ao grupo sham; # $P < 0,05$ comparado ao grupo meniscotomia;! $P < 0,05$ comparado ao grupo meniscotomia + morfina (ANOVA seguida de teste de Tukey)

5.5. Efeito terapêutico da indometacina, 1400W e HOE-140 na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia

A administração terapêutica de indometacina ou HOE-140 em camundongos meniscotomizados diminuiu a hiperalgesia articular de forma tempo-dependente, com redução significativa na 3ª hora após a injeção. De forma semelhante, embora mais eficiente, a administração de 1400W reduziu significativamente a hiperalgesia de forma tempo-dependente, com diminuição significativa na 1 e 3ª horas após a injeção (Figura 7).

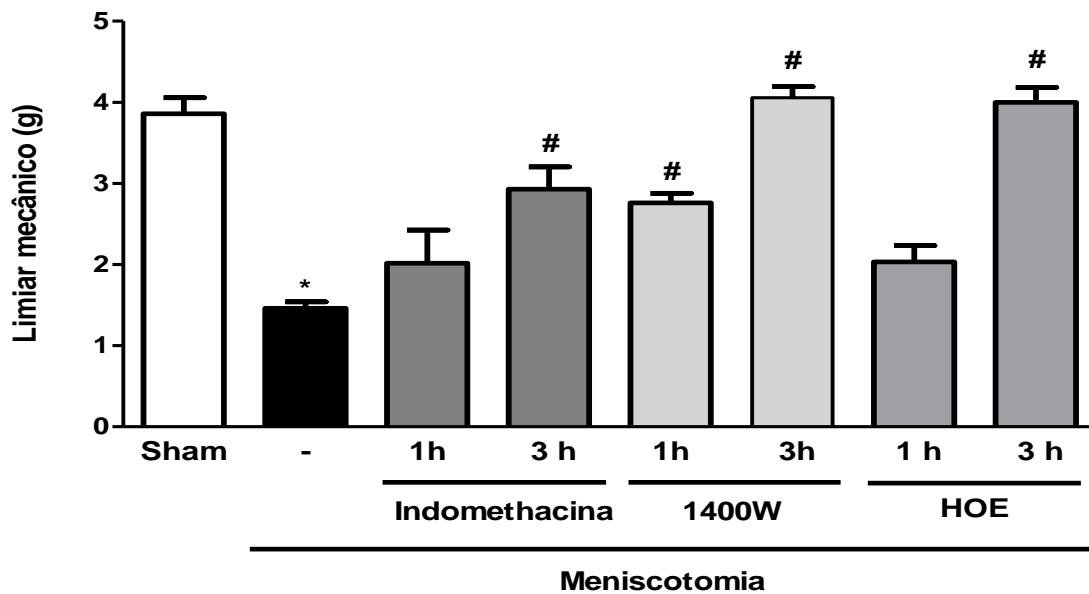


Figura 7 - Efeito terapêutico da indometacina, 1400W e HOE-140 na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia. Grupo de camundongos foi submetido à meniscotomia do menisco medial. Grupo de animais recebeu indometacina (2 mg/kg; i.p.), 1400W (0,5 mg/kg; s.c.) ou **naloxona HOE-140** (1 mg/kg; s.c.) **após o 16º da meniscotomia e não no 16º dia após a meniscotomia.** Grupo sham foi submetido apenas à incisão da pele e ruptura da cápsula articular medial, seguida pela sutura dos tecidos. A hiperalgesia foi avaliada 1 e 3 horas após a administração. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m.. * $P < 0,05$ comparado ao grupo sham; # $P < 0,05$ comparado ao grupo meniscotomia (ANOVA seguida de teste de Tukey).

5.6. Efeito terapêutico do remicade na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia

A administração terapêutica intra-articular ou intraperitoneal de remicade diminuiu significativamente a hiperalgesia articular em camundongos meniscotomizados, comparado ao grupo meniscotomia que recebeu apenas salina (NT) ($P < 0,05$).

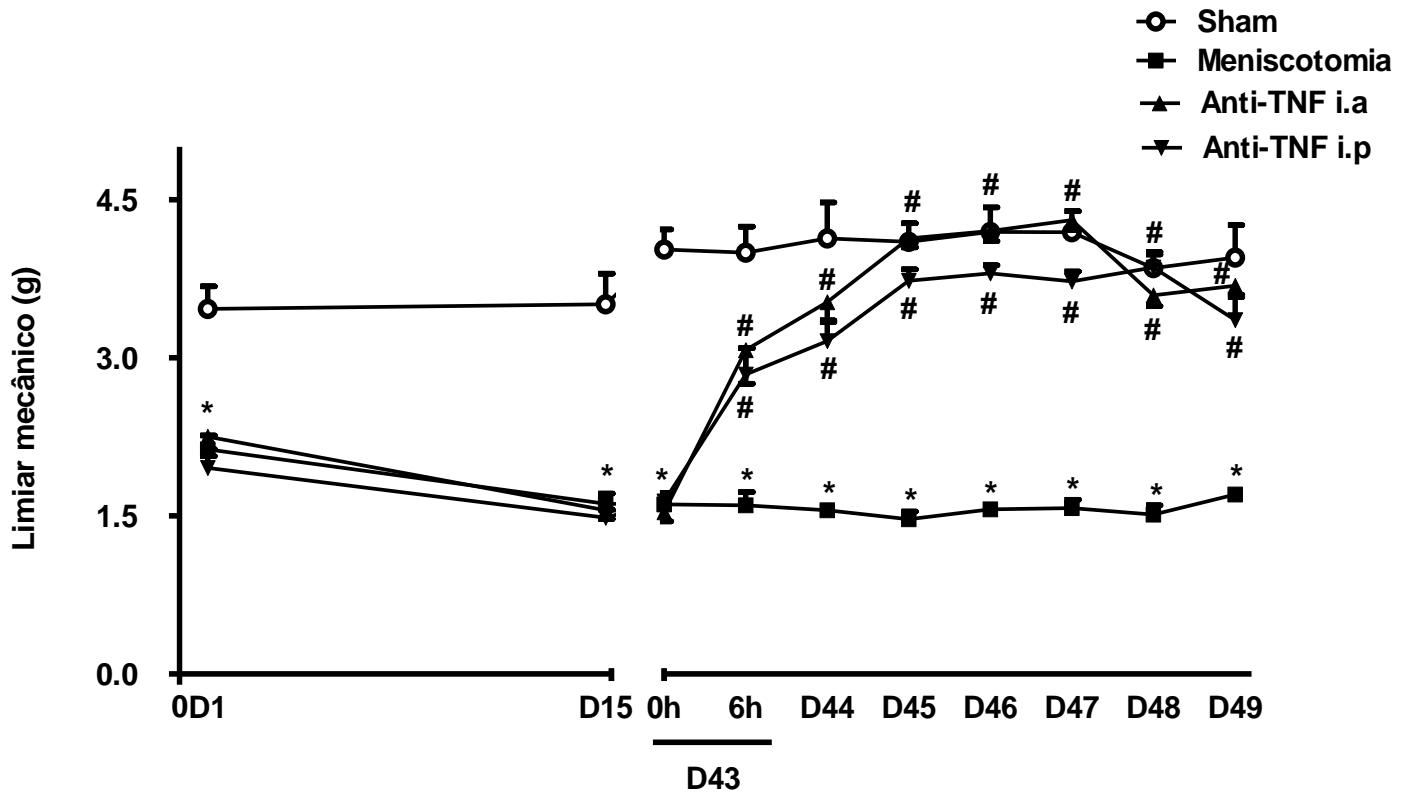


Figura 8 - Efeito terapêutico do remicade na hiperalgesia articular em camundongos submetidos à meniscotomia. Grupo de camundongos foi submetido à meniscotomia do menisco medial. Grupo de animais recebeu remicade 25 μ L i.a. ou 50 μ L i.p. no 43º dia após a meniscotomia (Volume não é concentração). Grupo sham foi submetido apenas à incisão da pele e ruptura da cápsula articular medial, seguida pela sutura dos tecidos. A hiperalgesia foi avaliada 6 horas depois da administração e diariamente do 44º a 49º dia. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m.. * $P < 0,05$ comparado ao grupo sham; # $P < 0,05$ comparado ao grupo meniscotomia (NT) (ANOVA seguida de teste de Tukey).

5.7. Dosagem de IL-1, TNF- α , IFN- γ e NO em camundongos submetidos à meniscotomia

A quantificação dos mediadores inflamatórios IL-1, TNF- α , IFN- γ e NO em camundongos sham, meniscectomizados ou meniscotomizados foi indetectável após 7 semanas do procedimento cirúrgico, contudo uma pequena quantidade de TNF- α foi detectado com 15 e 28 dias sem diferença significativa do sham.

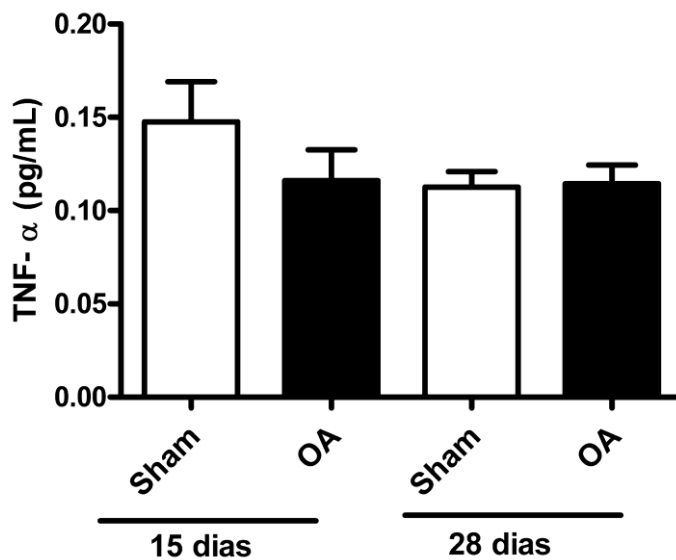


Figura 9- Níveis de TNF- α no lavado articular de camundongos submetidos à meniscotomia. Grupo de camundongos foi submetido à meniscotomia do menisco medial. Grupo sham foi submetido apenas à incisão da pele e ruptura da cápsula articular medial, seguida pela sutura dos tecidos. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m (ANOVA seguida de teste de Tukey).

6 Discussão

A visão dos meniscos como componentes articulares supérfluos e desprovidos de função influenciou o estudo da osteoartrite, pois apesar da doença acometer a articulação como um todo, os meniscos ficavam com papel secundário na patogenia e os estudos concentravam-se na relação membrana sinovial, cartilagem e osso subcondral. Hoje, o menisco tem um papel de destaque na articulação, uma vez que ele é essencial para a estabilidade e integridade da articulação do joelho, além de desempenhar papel importante na transmissão de carga, absorção de choques, manutenção da estabilidade, propriocepção e lubrificação articular (KOHN & MORENO, 1995; WOJTYS & CHAN, 2005; LEVY et al., 1982; ASSIMAKOPOULOS et al., 1992). Esses são alguns dos motivos que subsidiam a manutenção do menisco como conduta cirúrgica diante de seu comprometimento. Por outro lado, a conduta adotada passa por estratégias escassas de preservação ou substituição dos meniscos acometidos. Ademais, a lesão do menisco por injúria, degeneração e retirada dos meniscos promovem a desestabilização articular e dor, e encontram-se frequentemente associados ao desenvolvimento e progressão da OA em seres humanos (POEHLING et al., 1990; SMILLIE, 1962; BHATTACHARYYA et al., 2003).

No intuito de compreender como a manutenção do menisco mesmo após acometimento ou sua remoção contribuem para dor e dano articular. O estudo adotou modelos experimentais a partir da desestabilização do menisco e remoção (GLASSON et al., 2007; CLEMENTS et al., 2003; CARLSON et al., 2002). O modelo de meniscotomia (transecção do ligamento cruzado anterior e menisco) e meniscectomia (transecção do ligamento cruzado anterior e remoção do menisco medial), utilizados como modelos de OA experimental se assemelham à OA humana, mostrando alterações bioquímicas e histológicas (CHANCIE et al., 2012; BOVE, 2006).

O objetivo primeiramente era saber se existia diferença entre os grupos com relação à dor, isto é, se a preservação do menisco mesmo seccionado promovia menor hipernocicepção, quando comparado ao grupo submetido à remoção (meniscectomizado). A resposta hipernociceptiva de ambos os grupos revelou um aumento estatisticamente significativo quando comparado com o grupo sham. Todavia, no 16 dias após a cirurgia, uma diferença na intensidade da resposta hipernociceptiva apareceu entre os grupos submetidos à meniscotomia e meniscectomia, de modo que o grupo submetido à meniscectomia exibiu uma redução progressiva na intensidade da dor, quando comparado com os valores basais do mesmo. O grupo meniscotomia manteve-se estável com dor significativamente maior quando comparado com o grupo meniscectomia durante os 49 dias após a cirurgia. Resaltando o papel do

menisco, em experimentos preliminares do nosso grupo, observou-se que a transecção do ligamento cruzado anterior em ratos usando o teste de von Frey eletrônico, não provocou aumento da dor nas articulações. Por conseguinte, conclui-se que os danos ao menisco é a principal razão para o desenvolvimento de dor neste modelo de OA, e que deixando o menisco rompido no interior da articulação provoca um comportamento de dor prolongada mais do que removê-lo completamente. Curiosamente pacientes com meniscos rompidos submetidos à remoção do mesmo na maioria das vezes recuperam-se da dor após a cirurgia, porém leva a uma progressão para OA (BETHAN et al., 2012).

As razões para a diferença observada em ambos os grupos não são simples, porém especula-se que deixando o fragmento do menisco no interior da articulação provocaria mais instabilidade articular resultando assim em mais dor. Entre os mecanismos possíveis, podemos propor a estimulação das fibras de nociceptores presentes na borda do menisco danificado e a pressão aplicada ao osso subcondral (TAKATOMO, 2000).

Levando em consideração a dor prolongada no grupo meniscotomia e a possibilidade da utilização de compostos anti-inflamatórios e/ou analgésicos na caracterização da dor crônica. Nós administramos indometacina, um potente inibidor não-seletivo da enzima ciclo-oxigenase (COX), que inibiu significativamente a dor articular nos animais submetidos à meniscotomia, em comparação ao grupo tratado com o veículo apenas. Este dado revela a participação dos prostanoídeos na nocicepção induzida pelo modelo, e o resultado não é inesperado, visto que a transecção do menisco e/ou do ligamento promovem nocicepção nos animais com conseguinte redução da mesma após a administração de inibidores seletivo ou não das isoformas da ciclooxigenase (BOVE et al., 2006; CASTRO et al., 2006; BRAZA-BOÏLS et al., 2011; ASHRAF et al., 2011).

Inibição semelhante foi observada quando administramos um inibidor do receptor B2 da bradicinina, HOE-140. Lembrado que o objetivo do nosso estudo não é investigar o mecanismo inflamatório ou hipernociceptivo das cininas, mas revelar o seu envolvimento na dor crônica em OA. Para tal finalidade, nós avaliamos o possível efeito analgésico do HOE 140 (antagonista seletivo do receptor B2 (WIRTH et al., 1991) no modelo de desestabilização do menisco medial. Nós administramos a droga após o 16º dia da cirurgia e diminuiu significativamente a hiperalgesia na 3ª hora após a injeção. Avigorando com o nosso dado em modelos experimentais em OA, encontram-se a redução da dor após administração dos inibidores de receptor B, nos respectivos modelos, OA por monoiodo acetato de sódio (MIA) e TLCA (CIALDAI et al., 2009; KAUFMAN et al., 2011). Nosso estudo é o primeiro a

demonstrar a participação da bradicinina na dor articular quando existe acometimento do menisco. Além disso, contribui com outros estudos para esclarecer o envolvimento das cininas na dor e dano articular em OA (BIANCHI et al., 2007; MEINI et al., 2011; MEINI et al., 2012).

Semelhante aos prostanoídes, o NO e TNF- α podem ser encontrados no líquido sinovial de pacientes com OA (MELCHIORRI et al., 1998; ATTUR et al., 1998; KARAN et al., 2003; FARRELL et al., 1992; KAPOOR et al., 2011). No entanto, a escolha do NO foi pautada em estudo do nosso grupo (CASTRO et al., 2006) e MOON et al., 2012, que demonstraram, que o NO exercia efeito nociceptivo em modelos experimentais em OA. Para esclarecer o possível envolvimento do NO na nocicepção do grupo meniscotomizado. Nós administramos um inibidor altamente seletivo para a NOSi, o 1400W após o 16^o dia da cirurgia e observamos um aumento do limiar mecânico na 1^a e 3^a hora após a administração. Fortalecendo ainda mais o nosso dado, a transecção do menisco é um evento traumático que pode desencadear o estresse mecânico, e consequente liberação de NO e expressão da isoforma da óxido nítrico sintase induzível (NOSi) nos sinoviócitos, condrócitos e meniscos (GOOCH et al., 1997; JOHNSON et al., 1996; CLANCY & ABRAMSON, 1995; STEAFANOVIC, 1993; CAO et al., 1998; HASHIINOTO et al., 1999; KOBAYASHI et al., 2001; AMIN et al., 1995; KOBAYASHI et al., 2001; CHENG et al., 2011; EL MANSOURI et al., 2011; MOON et al., 2012; SALERMO et al., 2002; GRABOWSKI et al., 1997).

Com relação ao TNF- α , é produzido por células e tecidos articulares. O papel do TNF- α na inflamação em OA tem sido explorado embora controverso (GRUNKE et al., 2006; MAGNANO et al., 2007; VERBRUGGEN et al., 2012; (BERENBAUM, 2012; GÜLER-YÜKSEL, 2012). O envolvimento desta citocina na hiperalgesia não está claro. Ainda que a expressão enzimática e a síntese de mediadores hiperalgésicos e alterações neuronais nociceptivas tenham sido associadas a citocina (KIM et al., 2012; WESTACOTT et al., 2000; OHTORI et al., 2004; HAYASHI et al., 2008). No menisco, nosso foco do estudo, a citocina promove diminuição da proliferação e reparo das células, ativação das metaloproteinases, produção de NO e inibe a síntese de proteoglicanos (CAO et al., 1998; LeGRAND et al., 2001; FEMOR et al., 2004; HENNERBICHLER et al., 2007; McNULTY & GUILAK, 2008; McNULTY et al., 2007; McNULTY et al., 2009). No caso do nosso trabalho, nós investigamos o papel do TNF- α na nocicepção nos animais submetidos à meniscotomia. Nós revelamos uma diminuição na hiperalgesia diante da administração de anti-TNF- α intra-peritoneal (i.p) sugerindo um feito sistêmico. Para dirimir um efeito sistêmico, nós resolvemos administrar intra-articular (i.a) e conseguimos um efeito

anti-nociceptivo semelhante. Demonstramos de modo inédito a participação do TNF- α na hiperalgesia crônica em modelo de OA. Corroborando com outros dados da literatura referente a participação da citocina em modelos de desestabilização do menisco (CHEN et al., 2008; McNAMEE et al., 2010). Para ratificar a participação da citocina, o estudo investigou alterações na concentração da citocina no fluido sinovial e expressão de receptores para TNF por imuno-histoquímica em tecidos articulares ao longo do experimento. Os dados revelaram a inexistência de alterações na concentração e expressão (KYLE et al., 2012)

Validando ainda a dor articular, nós avaliamos a participação de agonistas endógenos do receptor opioide na manutenção da dor. Posto que a literatura relata o uso de moduladores opioides na dor crônica em várias doenças (KALSO et al., 2004; FURLAN et al., 2006). Entre elas, podemos destacar o uso dos agonistas dos receptores opioides no alívio da dor crônica nos pacientes com OA (AVOUAC et al., 2007). Todavia, o uso nos pacientes exige cuidado (MANCHIKANTI et al., 2011). No caso específico dos animais, os problemas são sedação e comprometimento locomotor. Para diminuir tais inconvenientes, nós administramos morfina nas doses de 1,2 e 4mg/kg i.p., de acordo com o estudo de (GUERRERO et al., 2006), no qual, administraram morfina nas doses de 2,4 e 8 mg/kg i.p no modelo de hipernocicepção tíbio-tarsal induzida por zymosan e observaram apenas efeito anti-nociceptivo, quando avaliado pelo von Frey. Nossos resultados revelaram que a morfina promove analgesia dose-dependente nos animais e este efeito é revertido pela administração combinada de morfina e naloxona (agonista parcial do receptor μ -opioide). Dessa forma, confirmamos a participação de agonistas endógenos do receptor μ -opioide na modulação da dor articular. Este dado fortalece outros achados descritos na literatura envolvendo a participação de opioides endógenos na hiperalgesia nos modelos em OA (CASTRO et al., 2006; FERNIHOUGH et al., 2004; KNIGHTS et al., 2012; BEYREUTHER et al., 2007; MALFAIT et al., 2010).

Ao identificarmos a participação de mediadores inflamatórios na manutenção da dor no grupo meniscotomizado e a literatura apresentava ampla abordagem do envolvimento destes componentes no influxo celular na articulação. Nosso intento era investigar se existia diferença no influxo celular entre os grupos. O resultado do experimento revelou a existência de diferença no influxo celular entre os grupos no 49º dia. Todavia, NO e TNF- α não eram responsáveis pela diferença do influxo celular entre os grupos. Por conseguinte, o influxo celular foi submetido à contagem diferencial revelando a presença de linfócitos e células mononucleares. Aditando com os trabalhos realizados em pacientes e animais (ISHII et al., 2002; SAITO et al., 2002; CASTRO et al., 2006; BRANDT et al., 1991). A presença de

linfócitos e células mononucleares apontava para o possível envolvimento de IL-1 e INF- γ no influxo celular no grupo meniscotomizado. Entretanto, a análise por ELIZA não revelou a presença destas citocinas no lavado.

Finalmente, os dados histológicos também revelaram uma diferença entre os grupos no dano articular, sendo o grupo submetido à meniscotomia mais grave tanto na extremidade do fêmur quanto na tíbia, embora sejam mais intensas no platô tibial (GLASSON et al., 2007). A análise do dano articular ocorreu segundo os critérios adotados pela OARSI, nos quais, escores são obtidos a partir do produto entre gravidade e extensão das alterações. A escala referente aos escores podem variar de 0 a 24, sendo que 24 é o valor máximo obtido e consequentemente maior dano articular (PRITZKER et al., 2006). Especulamos, isto posto, que o dano articular maior no grupo meniscotomizado encontra-se além da alteração mecânica meramente, mas poderia dispor da contribuição das ações dos mediadores identificados. Isto é, poderiam desencadear e potencializar as alterações articulares justificando em parte a maior gravidade no dano articular observada no grupo meniscotomizados. (KAPOOR et al., 2011; LAUFER, 2003; ABRAMSON, 2008; MEINI & MAGGI, 2008). Se o maior influxo celular contribuiria para o maior dano articular no grupo meniscotomizado, não podemos inferir ainda.

Brandt KD, Myers SL, Burr D, Albrecht M. Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum*

1991;34:1560e70.

Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:2165–2174.

Attur MG, Patel IR, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110:65–72.

Farrell AJ, Blake DR, Palmer RMJ, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1219e22.

Karan A, Karan MA, Vural P, Erten N, Tascioglu C, Aksoy C, et al. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2003;22:397e9.

7 Conclusões

A Partir dos resultados, as seguintes conclusões podem ser obtidas:

-O modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior e meniscectomia parcial do menisco medial (meniscotomia) em camundongos apresenta um fenômeno contínuo de desestabilização e hiperalgisia articular.

-O modelo de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior e meniscectomia total do menisco medial (meniscectomia) em camundongos apresenta um fenômeno contínuo de desestabilização articular, porém efêmero em relação à hiperalgisia articular, presente apenas em sua fase inicial.

-A hipernocicepção crônica nos animais submetidos à meniscotomia pode ser reduzida pela administração terapêutica de anti-inflamatório não-esteroidal, inibidor seletivo da óxido nítrico sintase induzível, inibidor seletivo do receptor B2, anti-TNF- α e morfina.

-Na fase crônica dos dois modelos, em que surgem alterações histopatológicas importantes, a meniscotomia apresentou alterações de maior grau e extensão no platô tibial e femoral segundo os escores da OARSI, quando comparado ao grupo submetido à meniscectomia.

-O influxo celular nos animais meniscotomizados foi significativamente maior quando comparado aos grupos meniscectomizados e sham.

-Os mediadores, tais como: IL-1, TNF- α , IFN- γ e NO não são responsáveis pela diferença no influxo celular observado no grupo submetido à meniscotomia.

8. REFERÊNCIAS

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

ACR. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. **Arthritis Rheum** 2000 Sep;43(9):1905e15.

ALTMAN RD, HOCHBERG MC, MOSKOWITZ RW, SCHNITZER TJ. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update . **Arthritis Rheum** 2000;43: 1905–15.

ALVAREZ-SORIA MA, HERRERO-BEAUMONT G, MORENO-RUBIO J, CALVO E, SANTILLANA J, EGIDO J, LARGO R. Long-term NSAID treatment directly decreases COX-2 and mPGES-1 production in the articular cartilage of patients with osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage.** 2008 ;16(12):1484-93.

American College of Rheumatology <www.rheumatology.org> **Updated February 2012;** 2012 American College of Rheumatology; acesso 30.10.12

AMEYE LG, YOUNG MF. Animal models of osteoarthritis lessons learned while seeking the ‘Holy Grail’. **Curr Opin Rheumatol.**, 2006; 18:537-47.

AMIN AR, DI CESARE PE, VYAS P, ATTUR M, TZENG E, BILLIAR TR, et al. The expression and regulation of nitric oxide synthase in human osteoarthritis affected

chondrocyte: evidence for up-regulated neuronal nitric oxide synthase. **J Exp Med.**, 1995; 182:2097-102.

ANDERST, W.J. et al. In vivo serial joint space measurements during dynamic loading in a canine model of osteoarthritis. **Osteoarthritis cartilage**, 2005 v.13, p.808-816.

ANDRIACCHI TP, MUNDERMANN A: The role of ambulatory mechanics in the initiation and progression of knee osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol.**,2006; 18:514-518.

ASHRAF S, MAPP PI, WALSH DA. Contributions of angiogenesis to inflammation, joint damage, and pain in a rat model of osteoarthritis. **Arthritis Rheum.** 2011 ;63(9):2700-10.

ASSIMAKOPOULOS AP, KATONIS PG, AGAPITOS MV, et al. The innervation of the human meniscus. **Clin Orthop Relat Res.**, 1992;275:232–6.

ATTUR MG, DVE M, AKAMATSU M, KATOH M, AMIN AR. Osteoarthritis or Osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2002;10:1-4.

AVOUAC J, GOSSEC L, DOUGADOS M. Efficacy and safety of opioids for osteoarthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2007;15:957-65.

B.J.E. DE LANGE-BROKAAR Y, A. IOAN-FACSINAY Y, G.J.V.M. VAN OSCH Z, A.-M. ZUURMOND X, J. SCHOONES K, R.E.M. TOES Y, T.W.J. HUIZINGA Y, M. KLOPPENBURG Y. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage.**, 2012, 1-16.

BAKER B, YOUNG C. Meniscus Injures. Medscape Reference 2011. Ref Type: Online Source. Available from : emedicine.medscape.com/article/90661-overview.

BECKER EL - Chemotactic factors of inflammation. **Trends Pharmacol Sci.**, 1983; 4(5):223-225.

BENDELE A.M. Animal models of osteoarthritis. **J Musculoskel Neuron Interact.**, 2001;1 (4):363-376

BERENBAUM F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis). **Osteoarthritis Cartilage.**, 2012: S1063-4584(12) 01025-4.

BETHAN TUCKER, WASIM KHAN, MAMUN AL-RASHID AND HESHAM AL-KHATEEB. Tissue Engineering for the Meniscus: A Review of the Literature. **The Open Orthopaedics Journal.**, 2012,6,348-351.

BEYAZ S.G. Comparison of efficacy of intra-articular morphine and steroid in patients with knee osteoarthritis. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol.**, 2012;28(4):496-500.

BEYREUTHER B, CALLIZOT N, STÖHR T. Antinociceptive efficacy of lacosamide in the monosodium iodoacetate rat model for osteoarthritis pain. **Arthritis Res Ther.** 2007;9(1):R14.

BHATTACHARYYA T, GALE D, DEWIRE P, TOTTERMAN S, GALE ME, MCLAUGHLIN S, et al. The clinical importance of meniscal tears demonstrated by magnetic resonance imaging in osteoarthritis of the knee. **J Bone Joint Surg Am.**, 2003;85-A:4-9.

BIANCHI M, BROGGINI M, BALZARINI P, FRANCHI S, SACERDOTE P. Effects of nimesulide on pain and on synovial fluid concentrations of substance P, interleukin-6 and interleukin-8 in patients with knee osteoarthritis: comparison with celecoxib. **Int J Clin Pract.** 2007;61(8):1270-7.

BIJLSMA J.W, KNAHR K. Strategies for the prevention and management of osteoarthritis of the hip and knee. **Best practice and research Clinical Rheumatology**, 2007 v.21, p.59-76.

BITTON R., The economic burden of osteoarthritis., **The American Journal of Managed Care.**, 2009; vol. 15, no. 8, supplement, pp. 230–235.

BONDESON J, WAINWRIGHT SD, LAUDR S, AMOS N, HUGHES C. The role of sinovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy.**, 2006;8(6):187.

BONNET S., WALSH D.A., Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. **Rheumatology.**, 2005;44:7–16 .

BOSS A, KLIMKIEWICZ J, FU FH. Technical innovation: creation of a peripheral vascularized trough to enhance healing in cryopreserved meniscal allograft reconstruction. **Knee.**, 2000; 8:159-162.

BOVE S.E., LAEMONT K.D., BROOKER R.M., OSBORN M.N., SANCHEZ B.M., GUZMAN R.E. *et al.* Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia **Osteoarthritis Cartilage.**, 2006; 14 (10) :1041–1048.

BRANDT K.D., RADIN E.L., DIEPPE PA, VAN DE PUTTE L. Yet more evidence that osteoarthritis is not a cartilage disease. **Ann Rheum Dis.**, 2006; 65:1261–1264.

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

BRAZA-BOÏLS A, ALCARAZ MJ, FERRÁNDIZ ML. Regulation of the inflammatory response by tin protoporphyrin IX in the rat anterior cruciate ligament transaction model of osteoarthritis. **J Orthop Res.** 2011 Sep;29(9):1375-82.

BRONSTEIN RD. Meniscal tears: current treatment options. **Curr Opin Orthop.**, 2002;13:143-150.

CALICH AL, DOMICIANO DS, FULLER R.Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? **Clin Rheumatol.**, 2010; 29(5):451-5.

CALIXTO J.B., CABRINI D.A., FERREIRA J., CAMPOS M.M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr Opin Anaesthesiol.**, 2001, 14:519-26.

CALIXTO J.B., MEDEIROS R., FERNANDES E.S., FERREIRA J., CABRINI DA, CAMPOS M.M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **Br J Pharmacol.**, 2004, 143:803-18.

CAO M, STEFANOVIC-RACIC M, GEORGESCU HI, MILLER LA, EVANS CH. Generation of nitric oxide by lapine meniscal cells and its effect on matrix metabolism: stimulation of collagen production by arginine. **J Orthop Res.**, 1998;16:104–111.

CARDOSO TP. Prótese meniscal de polímero bioabsorvível: estudo em coelhos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo – USP; 2002.

CARLSON CS, GUILAK F, VAIL TP, GARDIN JF, KRAUS VB. Synovial fluid biomarker levels predict articular cartilage damage following complete medial meniscectomy in the canine knee. **J Orthop Res.** 2002 ;20(1):92-100.

CAROL A. ROUZER, LAWRENCE J. MARNETT Cyclooxygenases: structural and functional insights. **J Lipid Res.**, 2009; 50:S29–S34.

CASSIM B., NAIDOO S., RAMSAROOP R., BHOOLA K.D. Immunolocalization of bradykinin receptors on human synovial tissue. **Immunopharmacology.**, 1997; 36(2-3):121-5.

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

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

CHANCIE BAYER KNIGHTS A, CLIVE GENTRY A, STUART BEVAN. Partial medial meniscectomy produces osteoarthritis pain-related behavior in female C57BL/6 mice. **Pain**, 2012; 153: 281–292.

CHEN L.X., LIN L., WANG H.J., WEI X.L., FU X., ZHANG J.Y., YU C.L. Suppression of early experimental osteoarthritis by in vivo delivery of the adenoviral vector-mediated NF-kappaBp65-specific siRNA. **Osteoarthritis Cartilage.** 2008 Feb;16(2):174-84.

CHENG AW, STABLER TV, BOLOGNESI M, KRAUS VB. Selenomethionine inhibits IL-1 β inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase 2 (COX2) expression in primary human chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2011;19(1):118-25.

CIALDAI C, GIULIANI S, VALENTI C, TRAMONTANA M, MAGGI CA. Effect of Intra-articular 4-(S)-amino-5-(4-{4-[2,4-dichloro-3-(2,4-dimethyl-8 quinolyloxymethyl) phenylsulfonamido] -tetrahydro-2H-4-pyranilcarbonyl} piperazino)-5 oxopentyl] (trimethyl)ammonium chloride hydrochloride (MEN16132), a kinin B2 receptor antagonist, on nociceptive response in monosodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis in rats. **J Pharmacol Exp Ther.** 2009;331(3):1025-32.

CLANCY RM, ABRAMSON SB. Nitric oxide: A novel mediator of inflammation. **Soc Exp Biol Med** 1995; 210:93–101.

CLARK CR, OGDEN JA. Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury. **J Bone Joint Surg Am.**, 1983;65:538-547.

CLEMENTS KM, PRICE JS, CHAMBERS MG, VISCO DM, POOLE AR, MASON RM. Gene deletion of either interleukin-1beta, interleukin-1beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy. **Arthritis Rheum.** 2003;48(12):3452-63.

COHEN M et al. A randomized, double-blind placebo controlled trial of a tropical cream containing glucosamine sulfate, chondroitin sulfate, and camphor for osteoarthritis of knee. **J Rheumatol.** 2003; 30:523-28.

CRUVINEL, W.M. et al. Immune system – Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia.**, 2010; v.50, n.4, p.434-461.

CUNHA, F.Q. et al. Cytokine Inhibitors and Pain Control. **Rev Bras Reumatol.**, 2007, v.47, n.5, p.341-353.

CUNHA, T.M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol.**, 2004; v.37, p.401-407.

CURRAN M.P., Hyaluronic acid (Supartz): a review of its use in osteoarthritis of the knee, **Drugs and Aging.**, 2010; vol. 27, no. 11, pp. 925–941.

DAVIS M, ETTINGER W, NEUHAUS I.M., BARCLAY I.D., DEGAL M.R. Correlates of knee pain among US adults with and without radiographic knee osteoarthritis. **J Rheumatol.**, 2002; 19: 1943-49.

DING C, PARAMESWARAN V, CICUTTINI F, BURGESS J, ZHAI G, QUINN S, et al. Association between leptin, body composition, sex and knee cartilage morphology in older adults: the Tasmanian Older Adult Cohort (TASOAC) study. **Ann Rheum Dis.**, 2008;67:1256-1261.

DRAY A. Inflammatory mediators of pain. **BrJ Anaesth.**, 1995;75:125-131.

EL MANSOURI FE, CHABANE N, ZAYED N, KAPOOR M, BENDERDOUR M, MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER JP, DUVAL N, FAHMI H. Contribution of H3K4 methylation by SET-1A to interleukin-1-induced cyclooxygenase 2 and inducible nitric oxide synthase expression in human osteoarthritis chondrocytes. **Arthritis Rheum.** 2011;63(1):168-79.

ELEFThERIOS A. MAKRIS, PASHA HADIDI, KYRIACOS A. ATHANASIOU The knee meniscus: Structure function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. **Biomaterials.**, 2011;32. 7411-7431.

ELLINGSON CI, SEKIJA JK. Current opinion in meniscal allograft transplantation. **Curr Opin Orthop.** 2004;15(2):79-85.

ENGLUND M, GUERMAZI A, GALE D, HUNTER DJ, ALIABADI P, CLANCY M, et al. Incidental meniscal findings on knee MRI in middle-aged and elderly persons. **N Engl J Med.**, 2008;359: 1108-15.

ENGLUND M: The role of biomechanics in the initiation and progression of OA of the knee. **Best Pract Res Clin Rheumatol.**, 2010; 24:39-46.

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

FELIX NA, PAULO LE. Current status of meniscal transplantation. **Knee.**, 2003; 10:13-17.

FELSON DT. Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. **N Engl J Med.**, 2006; 354:841-8.

FERMOR B, JEFFCOAT D, HENNERBICHLER A, PISETSKY DS, WEINBERG JB, GUILAK F. The effects of cyclic mechanical strain and tumor necrosis factor alpha on the response of cells of the meniscus. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2004;12:956–962.

FERNIHOUGH J, GENTRY C, MALCANGIO M, FOX A, REDISKE J, PELLAS T, KIDD B, BEVAN S, WINTER J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. **Pain.**, 2004 ;112(1-2):83-93.

FLECHTENMACHER J, TALKE M, VEITH D, HEIL K, GEBAUER A, SCHOENHARTING M. Bradykinin-receptor-inhibition – a therapeutic option in osteoarthritis? **Osteoarthr Cartil** 2004; 12(S137): P332.

FURLAN AD, SANDOVAL JA, MAILIS-GAGNON A, TUNKS E. Opioids for chronic non-cancer pain: a meta-analysis of effectiveness and side effects. **CMAJ.**, 2006;174:1589-94.

GALLELLI L, GALASSO O, URZINO A, SACCÀ S, FALCONE D, PALLERIA C, LONGO P, CORIGLIANO A, TERRACCIANO R, SAVINO R, GASPARINI G, DE SARRO G, SOUTHWORTH SR. Characteristics and Clinical Implications of the Pharmacokinetic Profile of Ibuprofen in Patients with Knee Osteoarthritis. **Clin Drug Investig.**, 2012.

GEAR MW. The late results of meniscectomy. **Br J Surg.**, 1967;54(4):270-2.

GIGANTE A, CALLEGARI L, The role of intra-articular hyaluronan (Sinovial) in the treatment of osteoarthritis, **Rheumatology International.**, 2011; vol. 31, no. 4, pp. 427–444.

GLASSON SS, BLANCHET TJ, MORRIS EA. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. **Osteoarthritis Cartilage.** 2007 ;15(9):1061-9.

GOLDRING MB, OTERO M: Inflammation in osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol** 2011; 23:471-478.

GOLDRING, M.B. Anticytokine therapy for osteoarthritis. **Expert Opin Biol Ther.**, 2001; 1: 817-829.

GOOCH KJ, DANGLER CA, FRANGOS JA. Exogenous, basal, and flow-induced nitric oxide production and endothelial cell proliferation. **J Cell Physiol.**, 1997;171: 252–8.

GRABOWSKI PS, WRIGHT PK, VAN 'T HOF RJ, HELFRICH MH, OHSHIMA H, RALSTON SH. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Br J Rheumatol.**, 1997 ;36(6):651-5.

GREIS PE, BARDANA DD, HOLMSTROM MC, BURKS RT. Meniscal injury : I. Basic science and evaluation. **J Am acad Orthop Surg.**, 2002.10.168-76.

GRUNKE M, SCHULZE-KOOPS H. Successful treatment of inflammatory knee osteoarthritis with tumor necrosis factor blockade. **Ann Rheum.**, 2006 ; 65:555–556

GUERRERO, A.T. Hypernociception elicited by tibio–tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacol Biochem Behav.**, 2006 ;84:244–51.

GÜLER-YÜKSEL M, ALLAART CF, WATT I, GOEKOOP-RUITERMAN YP, DE VRIES-BOUWSTRA JK, VAN SCHAARDENBURG D, VAN KRUGTEN MV, DIJKMANS BA, HUIZINGA TW, LEMS WF, KLOPPENBURG M. Treatment with TNF- α inhibitor infliximab might reduce hand osteoarthritis in patients with rheumatoid arthritis. **Osteoarthritis Cartilage** 2010; Oct;18(10):1256-62. doi: 10.1016/j.joca.2010.07.011. Epub 2010 Aug 5.

HALL J.M., Bradykinin receptors. **Gen Pharmacol** 1997, 28:1-6.

HARVEY W.F., HUNTER D.J., Pharmacologic intervention for osteoarthritis in older adults, **Clinics in Geriatric Medicine.**, 2010; vol. 26, no. 3, pp. 503–515.

HASHIINOTO S. TAKAHASHI K. OCHS RL. KOBAYASHI K. COUTTS RD, AMIEL D. LOTZ M. Nitric oxide production and apoptosis in meniscus during experimental osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, 1999;42(10):2123-13.

HAYAMI T , et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transaction and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone** 2006; 38:234-43.

HAYAMI T, et al. The Role of subchondral Bone Remodeling in Osteoarthritis: Reduction of cartilage Degeneration and Prevention of Osteophyte Formation by Aledronate in the Rat Anterior Cruciate Ligament Transaction Model. **Arthritis Rheum.** 2004,50: 1193-1206.

HAYWOOD L, MCWILLIAMS DF, PEARSON CI et al. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, 2003;48:2173–7.

HEDBOM E., HAUSELMANN H.J. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. **Cell Mol Life Sci.**, 2002;59: 45–53.

HENNERBICHLER A, MOUTOS FT, HENNERBICHLER D, WEINBERG JB, GUILAK F: Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha inhibit repair of the porcine meniscus in vitro. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2007, 15:1053-1060.

HENROTIN, Y.E., BRUCKNER, P., PUJOL, J.P. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage.**, 2003; v. 11, n. 10, p. 747–755.

HERWIG J, EGNER E, BUDDECKE E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. **Ann Rheum Dis.**, 1984.43.635-640.

HOCHMAN J.R., GAGLIESE L., DAVIS A.M., HAWKER G.A.. Neuropathic pain symptoms in a community knee OA cohort. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2011; 19: 647–54.

HUNTER D.J., Pharmacologic therapy for osteoarthritis-the era of disease modification, **Nature Reviews Rheumatology.**, 2011; vol. 7, no. 1, pp. 13–22.

IAN MCDERMOTT. Meniscal tears, repairs and replacement: their relevance to osteoarthritis of the Knee. **Br J Sports Med.**, 2011; 45:292-297.

INGLIS J.J, MCNAMEE K.E., CHIA S.L., ESSEX D., FELDMANN M., WILLIAMS R.O. et al. Regulation of pain sensitivity in experimental osteoarthritis by the endogenous peripheral opioid system **Arthritis Rheum.**, 2008; 58 (10): 3110–3119.

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

IYENGAR S., WEBSTER A. A., HENRICK-LUCKE S.K., XU JY, SIMMONS R.M.A. Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine inhibitor in persistent pain models in rats. **J Pharmacol Exp Ther** 2004; 311: 576–84.

JOHANNE et al Cartilage in normal and osteoarthritis **Conditions Best Practice & Research Clinical Rheumatology.**, 2000, Vol. 22, No. 2, pp. 351–384.

JOHN R. Future directions in meniscus surgery: new horizons in fixation, healing, and replacement. **Sports Med Arth Rev.**, 2004;12(1):1-7.

JOHNSON DL, MCALLISTER TN, FRANGOS JA. Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts. **Am J Physiol.**, 1996;271:205–8.

JORGENSEN U, SONNE-HOLM S, LAURIDSEN F, et al. Long-term follow-up of meniscectomy in athletes. A prospective longitudinal study. **J Bone Joint Surg Br.**, 1987;69(1):80-3.

JULIO C. FERNANDES , JOHANNE MARTEL-PELLETIER AND JEAN-PIERRE PELLETIER. The role of cytokines in osteoarthritis .Pathophysiology. **Biorheology.**, 2002; 39: 237–246.

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

KALSO E, EDWARDS J.E., MOORE R.A., MCQUAY H. Opioids in chronic noncancer pain: systematic review of efficacy and safety. **Pain.**, 2004; 112:372-380.

KAMEKURA, M.D.S. et al. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2005 v.13, p.632-641.

KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEUNESSE D, PELLETIER JP, FAHMI H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nat Rev Rheumatol.**, 2011 7(1):33–42.

KARAN A, KARAN MA, VURAL P, ERTEN N, TASCIOGLU C, AKSOY C, et al. Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. **Clin Rheumatol** 2003; 22:397-9.

KAUFMAN GN, ZAOUTER C, VALTEAU B, SIROIS P, MOLDOVAN F. Nociceptive tolerance is improved by bradykinin receptor B1 antagonism and joint morphology is protected by both endothelin type A and bradykinin receptor B1 antagonism in a surgical model of osteoarthritis. **Arthritis Res Ther.** 2011 16; 13 (3) : R76.

KAY, E. et al. Treatment of murine osteoarthritis with TrkAd5 reveals a pivotal role for nerve growth factor in non-inflammatory joint pain. **Pain.**, 2010; 149, p. 386–392.

KIDD B.L., URBAN, L.A. Mechanism of inflammatory pain. **Br. J Anaesth.**, 2001; 87: 3-11.

KIDD BL, PHOTIOU A, INGLIS JJ. The role of inflammatory mediators on nociception and pain in arthritis. **Novartis Found Symp** 2004; 260: 122–33; discussion 133–38, 277–79.

KIDD BL. Osteoarthritis and joint pain [review]. **Pain.**, 2006;123:6–9.

KIM H.A., YEO Y., JUNG H.A., JUNG Y.O., PARK S.J., KIM S.J. Phase 2 enzyme inducer sulphoraphane blocks prostaglandin and nitric oxide synthesis in human articular chondrocytes and inhibits cartilage matrix degradation. **Rheumatology** 2012 51(6):1006-16.

KLIMKIEWICZ JJ, SHAFFER B. Meniscal surgery 2002 updates: Indications and techniques for resection, repair, regeneration, and replacement. **Arthroscopy.**, 2002; 18(9):14-25.

KNIGHTS C.B., GENTRY C., BEVAN S. Partial medial meniscectomy produces osteoarthritis pain-related behaviour in female C57BL/6 mice. **Pain.**, 2012;153(2):281-92.

KOBAYASHI K, MISHIMA H, HASHIMOTO S, GOOMER RS, HARWOOD FL, LOTZ M, MORIYA H, AMIEL D. Chondrocyte apoptosis and regional differential expression of nitric oxide in the medial meniscus following partial meniscectomy. **J Orthop Res.** 2001;19(5):802-8.

KOHN D, MORENO B. Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement : a morphological cadaveric study. **Arthroscopy.**, 1995,11 p.96-103.

LAUFER S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol.** 2003 Sep;15(5):623-7.

LAURENT G. AMEYE , MARIAN F. YOUNG Animal models of osteoarthritis: lessons learned while seeking the 'Holy Grail' **Current Opinion in Rheumatology** 2006, 18:537–547.

LEGRAND A, FERMOR B, FINK C, PISETSKY DS, WEINBERG JB, VAIL TP, GUILAK F. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. **Arthritis Rheum.** 2001;44:2078–2083.

LEVY I.M., TORZILLI P.A., WARREN R.F. The effect of medial meniscectomy on anterior-posterior motion of the knee. **J Bone Joint Surg Am.**, 1982;64(6):883–8.

LIKAR R, SCHÄFER M, PAULAK F, SITTL R, PIPAM W, SCHALK H, GEISSLER D, BERNATZKY G. Intraarticular morphine analgesia in chronic pain patients with osteoarthritis. **Anesth Analg.**, 1997;;84(6):1313-7.

LITTLE C.B, ZAKI S. What Constitutes an “animal model of osteoarthritis” – The Nedd for Consensus? **Osteoarthritis and cartilage.**, 2012; 20: 261-267.

LOTZ MK, KRAUS VB: New developments in osteoarthritis: posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. **Arthritis Res Ther.**, 2010; 12:211.

MAGNANO MD, CHAKRAVARTY EF, BROUDY C, CHUNG L, KELMAN A, HILLYGUS J, GENOVESE MC. A pilot study of tumor necrosis factor inhibition in erosive/inflammatory osteoarthritis of the hands. **J Rheumatol.**, 2007; 34:1323–1327.

MALEMUD C.J., Anticytokine therapy for osteoarthritis: evidence to date, **Drugs and Aging.**, 2010; vol. 27, no. 2, pp. 95–115.

MALFAIT A.M., RITCHIE J., GIL A.S., AUSTIN JS, HARTKE J, QIN W, TORTORELLA MD, MOGIL JS. ADAMTS-5 deficient mice do not develop mechanical allodynia associated with osteoarthritis following medial meniscal destabilization. **Osteoarthritis Cartilage.** 2010;18(4):572-580.

MALFAIT AM, RITCHIE J, GIL AS, AUSTIN JS, HARTKE J, QIN W, TORTORELLA MD, MOGIL JS. ADAMTS-5 deficient mice do not develop mechanical allodynia associated with osteoarthritis following medial meniscal destabilization. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2010;18:572–80.

MANCHIKANTI L, AILINANI H, KOYYALAGUNTA D, DATTA S, SINGH V, ERIATOR I, SEHGAL N, SHAH R, BENYAMIN R, VALLEJO R, FELLOWS B, CHRISTO PJ. A systematic review of randomized trials of long-term opioid management for chronic non-cancer pain. **Pain Physician.** 2011;14(2):91-121.

MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER JP, FAHMI H: Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. **Semin Arthritis Rheum.**, 2003, 33:155-167.

MARTEL-PELLETIER J. Pathophysiology of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, 2004;12:531-33.

MARTIN ENGLUND, MD. The Role of the Meniscus in Osteoarthritis Genesis. **Rheumatic Disease Clinics of North America.**, 2008: 34: 573-579.

MCDERMOTT ID, AMIS AA. The consequences of meniscectomy. **J Bone Joint Surg Br.**, 2006;88:1549-56.

MCDEVITT CA, WEBBER RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. **Clin Orthop Relat Res.**, 1992;252:8-18.

MCNAMEE KE, BURLEIGH A, GOMPELS LL, FELDMANN M, ALLEN SJ, WILLIAMS RO, DAWBARN D, VINCENT TL, INGLIS JJ. Treatment of murine osteoarthritis with TrkAd5 reveals a pivotal role for nerve growth factor in non-inflammatory joint pain. **Pain.**, 2010;149:386–92.

MCNULTY A.L., MOUTOS F.T., WEINBERG J.B., GUILAK F. Enhanced integrative repair of the porcine meniscus in vitro by inhibition of interleukin-1 or tumor necrosis factor alpha. **Arthritis Rheum.**, 2007, 56:3033-3042.

MCNULTY A.L., WEINBERG J.B., GUILAK F. Inhibition of matrix metalloproteinases enhances in vitro repair of the meniscus. **Clin Orthop Relat Res** 2009;467:1557-1567.

MCNULTY AL, GUILAK F: Integrative repair of the meniscus: lessons from in vitro studies. **Biorheology** 2008, 45:487-500.

MEINI S., CUCCHI P., CATALANI C., BELLUCCI F., GIULIANI S., MAGGI C.A. Bradykinin and B2 receptor antagonism in rat and human articular chondrocytes. **British Journal of Pharmacology.**,2011; 162 611–622.

MOON SJ, WOO YJ, JEONG JH, PARK MK, OH HJ, PARK JS, KIM EK, CHO ML, PARK SH, KIM HY, MIN JK. Rebamipide attenuates pain severity and cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by downregulating oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2012;20(11):1426-38.

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin – 10 receptor. **Annual Review of Immunology.**, 2001 v.19, p.683-765.

MORA G, ALVAREZ E. Articular cartilage degeneration after frozen meniscus and achilles tendon allograft transplantation: experimental study in sheep. **Arthroscopy.**, 2003;19(8):833-41.

MOREAU ME, GARBACKI N, MOLINARO G, BROWN NJ, MARCEAU F, ADAM A: The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J Pharmacol Sci.**, 2005, 99:6-38.

NIGGB, HERZOG W. Biomechanics of the musculo-skeletal system. Toronto: John wiley & Sons, 2002.

OEHLER S, NEUREITER D, MEYER-SCHOLTEN C, AIGNER T. Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. **Clin Exp Rheumatol.**, 2002;20:633–640.

OGDIE A, LI J, DAI L, PAESSLER ME, YU X, DIAZ-TORNE C, et al. Identification of broadly discriminatory tissue biomarkers of synovitis with binary and multicategory receiver operating characteristic analysis. **Biomarkers.**, 2010;15:183-190.

PAPACHRISTOU DJ, PAPADAKOU E, BASDRA EK, BALTOPOULOS P, PANAGIOTOPOULOS E, PAPAVASSILIOU AG. Involvement of the p38 MAPK-NF-kappaB signal transduction pathway and COX-2 in the pathobiology of meniscus degeneration in humans. **Mol Med.**, 2007;14(3-4):160-6.

PEKAREK B., OSHER L., BUCK S., BOWEN M., Intra-articular corticosteroid injections: a critical literature review with upto- date findings, **Foot.**, 2011; vol. 21, no. 2, pp. 66–70.

PELLETIER JP, MARTRIL-PELLETIER J, ABRAMSON SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implications for the selection of new therapeutic targets. **Arthritis Rheum.**, 2001;44:1237-47.

PETERS G, WIRTH CJ. The current state of meniscal allograft transplantation and replacement. **Knee.** 2003;10:19-31.

PLAAS A., RIESCO J., DAS R., SANDY J.D., HARRISON A., Intraarticular injection of hyaluronan prevents cartilage erosion, periarticular fibrosis and mechanical allodynia and normalizes stance time in murine knee osteoarthritis, **Arthritis Research and Therapy.**, 2011, vol. 13, no. 2, article no. R46.

POEHLING GG, RUCH DS, CHABON SJ. The landscape of meniscal injuries. **Clin Sports Med.**, 1990;9(3):539–49.

POOLE R et al. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage.**, 18 (2010) S10-S16.

PRITZKER, K.P. et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthr Cartil.**, 2006;14:13–29.

ROCHA, F.A.C. et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats, **Inflamm. Res.** V.48, p. 485–490, 1999.

ROCHA F. A. C., LEITE A. K. R. M. , POMPEU M. M. L., et al., Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models, **Infection and Immunity**, 2008; vol. 76, no. 6, pp. 2736–2745.

ROMAN-BLAS JA, CONTRERAS-BLASCO MA, LARGO R, ALVAREZ-SORIA MA, CASTAÑEDA S, HERRERO-BEAUMONT G. Differential effects of the antioxidant n-acetylcysteine on the production of catabolic mediators in IL-1beta-stimulated human osteoarthritic synoviocytes and chondrocytes. **EUR J PHARMACOL.**, 2009 ;25;623(1-3):125-31.

RUBMAN MH, NOYES FR, BARBER-WESTIN SD. Arthroscopic repair of meniscal tears that extend into the avascular zone. A review of 198 single and complex tears. **Am J Sports Med.**, 1998;26:87-95.

RUIZ-ROMERO, C., CALAMIA, V., MATEOS, J., CARRIERA, V., MARTINEZ-GOMARIZ, M., FERNANDEZ, M., BLANCO, F.J. Mitochondrial dysregulation of osteoarthritic human articular chondrocytes analyzed by proteomics: a decrease in mitochondrial superoxide dismutase points to a redox imbalance. **Molecular & Cellular Proteomics.**, 2009; v. 8, p. 171-189.

SAITO I, KOSHINO T, NAKASHIMA K, UESUG IM, SAITO T. Increased cellular infiltrate in inflammatory synovia of osteoarthritic knees. **Osteoarthritis Cartilage** 2002;10: 156e62.

SALATA MJ, GIBBS AE, SEKIYA JK. A systematic review of clinical outcomes in patients undergoing meniscectomy. **Am J Sports Med.**, 2010;38:1907-16.

SALERNO L, SORRENTI V, DI GIACOMO C, ROMEO G, SIRACUSA MA. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. **Curr Pharm Des.**, 2002;8:177–200.

SCOTT PG, NAKANO T, DODD CM. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. **Biochim Biophys Acta.**,1997.1336.254-262.

SEEDHOM BB, HARGREAVES DJ. Transmission of the load in the knee joint with special reference to the role of the meniscus. Part IþII. **Eng Med.**, 1979;4:207–28.

SILVESTRI T, PULSATELLI L, DOLZANI P, FRIZZIEROL L, FACCHINI A, MELICONI R. In vivo expression of inflammatory cytokine receptors in the joint compartments of patients with arthritis. **Rheumatol. Int.**, 2006;6(4):360-368.

SMILLIE I.S. Surgical pathology of the menisci. Injuries of the knee joint. 3rd edition. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.; 1962. p. 51–90.

SNIBBE J.C., GAMBARDELLA R.A., Use of injections for osteoarthritis in joints and sports activity, **Clinics in Sports Medicine**, 2005; vol. 24, no. 1, pp. 83–91.

SO J.S., SONG M.K., KWON H.K., LEE C.G., CHAE C.S., SAHOO A., JASH A., LEE S.H., PARK Z.Y., IM S.H. Lactobacillus casei enhances type II collagen/ glucosamine-mediated suppression of inflammatory responses in experimental osteoarthritis. **Life Sci.** 2011 14;88(7-8):358-66.

SORBERA LA, FERNANDEZ-FORNER D, BAYES M. Icatibant acetate. **Drugs Fut** 2006; 31: 101–6.

STEFANOVIC-RACIC M, STADLER J, EVANS CH. Nitric oxide and arthritis. **Arthritis Rheum** 1993;36:1038-44.

STEIN A, YASSOURIDIS A, SZOPKO C, HELMKE K, STEIN C. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. **Pain.**, 1999;83(3):525-32.

STONE RG, FREWIN PR, GONZALES S. Long-term assessment of arthroscopic meniscus repair: a two- to six-year follow-up study. **Arthroscopy.**, 1990;6:73-78.

SUMIHISA ORITA, TAKANA KOSHI, TAKESHI MITSUKA, MASAYUKI MIYAGI, GEN INOUE, GEN ARAI, TETSUHIRO ISHIKAWA, EIJI HANAOKA, KEISHI YAMASHITA, MASAOMI YAMASHITA, YAWARA EGUCHI, TOMOAKI TOYONE, KAZUHISA TAKAHASHI, SEIJI OHTORI . Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee **BMC Musculoskeletal Disorders.**, 2011, 12:144.

SUZAN ABOU-RAYA1, ANNA ABOU-RAYA2, MADIIHAH HELMII3, Duloxetine for the management of pain in older adults with knee osteoarthritis: randomized placebo-controlled Trial, **Age and Ageing** 2012; 41: 646–652

SWEIGART MA, ATHANASIOU KA. Toward tissue engineering of the knee meniscus. **Tissue Eng.**, 2001.7:111-129.

TADASHI HAYAMI, MAUREEN PICKARSKI, YA ZHUO, GREGG A. WESOLOWSKI, GIDEON A. RODAN, LE T. DUONG. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone.**, 2006; 38: 234–243.

TAKATOMO M, MITUHIRO K, AKIHITO S, SHINYA K. Innervation of nociceptors in the menisci of the knee joint: an immunohistochemical study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000; 120 :201–204 .

TALLARIDA R.J et al. Antinociceptive synergy, additivity and subadditivity with combinations of oral glucosamine plus nonopioid analgesics in mice. **J. Pharmacol Exp Ther.**, 2003; 307: 699-704.

TODD PA, CLISSOLD SP. Naproxen: a reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in rheumatic diseases and pain states. **Drugs.**, 1990;40:91-137.

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

VAN ARKEL ERA, DE BOER HH. Human meniscal transplantation: preliminary results at 2 to 5-year follow-up. **J Bone Joint Surg.**, 1995;77(4):589-95.

VAN DEN BERG WB. Lessons from animal models of osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol** 2001; 13:452–456.

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

VERBRUGGEN G., WITTOEK R., VANDER CRUYSSSEN B., ELEWAUT D. Tumour necrosis factor blockade for the treatment of erosive osteoarthritis of the interphalangeal finger joints: a double blind, randomised trial on structure modification. **Ann Rheum Dis.**, 2012;71 (6) 891–898.

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

WALKER PS, ERKMAN MJ. The role of the menisci in force transmission across the knee. **Clin Orthop Relat Res.**, 1975;109:184–92.

WB STAM, JP JANSEN, SD TAYLOR. Efficacy of Etoricoxib, Celecoxib, Lumiracoxib, Non-Selective NSAIDs, and Acetaminophen in Osteoarthritis: A Mixed Treatment Comparison. **Open Rheumatol J.** 2012; 6: 6–20.

WESTACOTT CI, BARAKAT AF, WOOD L, PERRY MJ, NEISON P, BISBINAS I, ARMSTRONG L, MILLAR AB, ELSON CJ. Tumor necrosis factor alpha can contribute to focal loss of cartilage in osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage.** 2000; 8(3):213-21.

WIELAND H.A., MICHAELIS M., KIRSCHBAUM B.J., RUDOLPHI K.A., Osteoarthritis—an untreatable disease? **Nature Reviews Drug Discovery.**, 2005; vol. 4, no. 4, pp. 331–344.

WILDY KS, WASKO MC. Current concepts regarding pharmacologic treatment of rheumatoid and osteoarthritis. **Hand Clin.**, 2001;17:321-38.

WIRTH CJ, PETERS G, MILACHOWSKI KA, WEISMEIER KG, KOHN D. Long term results of meniscal allograft transplantation. **Am J Sports Med.**, 2002;30(2):174-81.

WIRTH K, HOCK FJ, ALBUS U, LINZ W, ALPERMANN HG, ANAGNOSTOPOULOS H, HENK S, BREIPOHL G, KÖNIG W, KNOLLE J, et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. **Br J Pharmacol.** 1991;102(3):774-7.

WOJTYS EM, CHAN DB. Meniscus structure and function. **Instr Course Lect.**, 2005.54.323-330.

WONG DT, BYMASTER FP. Dual serotonin and noradrenaline uptake inhibitor class of antidepressants-potential for greater efficacy or just hype? **Prog Drug Res.**, 2002; 58: 169–222.

YORIMITSU, M. NISHIDA, K., SHIMIZU, A., DOI, H., MIYAZAWA, S., KOMIYAMA, T., NASU, Y., YOSHIDA, A., WATANABE, S., OZAKI, T. Intra-articular injection of interleukin-4 decreases nitric oxide production by chondrocytes and ameliorates subsequent destruction of cartilage in instability-induced osteoarthritis in rat knee joints. **Osteoarthritis Cartilage.**, 2008; v. 16, n. 7, p. 764-771.

ZWEERS MC, DE BOER TN, VAN ROON J, BIJLSMA JW, LAFEBER FP, MASTBERGEN SC. Celecoxib: considerations regarding its potential disease-modifying properties in osteoarthritis. **Arthritis Res Ther.** 2011;13(5):239.

