

EDGARD DOS SANTOS PEREIRA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CONDROPROTETOR DA
MOLÉCULA rLOSAC EM MODELO INFLAMATÓRIO, *IN VITRO*,
INDUZIDO PELA INTERLEUCINA 1 β**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.**

SÃO PAULO

2016

EDGARD DOS SANTOS PEREIRA JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CONDROPROTETOR DA
MOLÉCULA rLOSAC EM MODELO INFLAMATÓRIO, *IN VITRO*,
INDUZIDO PELA INTERLEUCINA 1 β**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.**

**Orientador: Prof. Dr. MOISÉS COHEN
Coorientadores: Prof^a. ANA MARISA CHUDZINSKI-TAVASSI
Prof. MARIO FERRETTI FILHO**

SÃO PAULO

2016

Pereira Junior, Edgard dos Santos

Avaliação do potencial condroprotetor da molécula rLosac em modelo inflamatório, in vitro, induzido pela interleucina 1 β / Edgard dos Santos

Pereira Junior. -- São Paulo, 2016.

xiv, 77f., il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Evaluation of the chondroprotective potential of the molecule rLosac in an inflammatory model, *in vitro*, induced by interleukin 1 β .

1. Animais venenosos. 2. Meniscos tibiais/efeitos de drogas. 3. Interleucina-1beta. 4. Técnicas in vitro. 5. Metaloproteases. 6. Matriz extracelular

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

Dedicatória

Aos meus pais, Edgard e Sandra, pelo apoio incondicional em todos os momentos e pelo exemplo de vida.

À minha esposa, Ana Paula, pelo incentivo e dedicação que me confortaram e deram serenidade para concluir este árduo trabalho.

Aos meus filhos, Frederico e Guilherme, pelo amor e ternura que nos aproxima.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. **MOISES COHEN**, Professor Titular do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo, pela oportunidade, confiança e exemplo de liderança e determinação que nós, mais jovens, devemos seguir.

Aos meus coorientadores, Prof^a. **ANA MARISA CHUDZINSKI-TAVASSI**, Diretora do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan e Professora credenciada no curso de Pós-graduação em Biologia Molecular pela Unifesp e Prof. **MARIO FERRETTI FILHO**, Professor Adjunto do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo, pelo incentivo, ensinamentos, paciência e pela oportunidade de entrar em um campo da pesquisa em ciências básicas; muito difícil de ser compreendido por nós médicos.

Ao meu pai, Prof. Dr. **EDGARD DOS SANTOS PEREIRA**, meu professor e incentivador que me ensinou os verdadeiros caminhos a serem seguidos.

Aos professores, colegas e residentes do grupo de joelho, Prof. Dr. **RICARDO DIZIOLI NAVARRO** (*in memoriam*), Prof. **LUIZ AURELIO MESTRINER**, Prof. **MARCUS VINÍCIUS MALHEIROS LUZO**, Prof. **MARIO CARNEIRO FILHO**, pelos ensinamentos e convívio no grupo desde o início da minha formação em cirurgia do joelho.

Ao amigo, Dr. **GERALDO SÉRGIO DE MELLO GRANATA JÚNIOR**, por me acompanhar desde os tempos de graduação e presenciar a nossa evolução e amadurecimento como cirurgiões de joelho.

Aos meus sogros, Dr. **AGER DE LORENZO** e Sra. **REGINA STELLA DE LORENZO** pelo apoio em todos os meus projetos de vida.

Aos pesquisadores do Instituto Butantan, Dra. **MIRYAM PAOLA ALVAREZ FLORES** e MSc. **JEAN GABRIEL DE SOUZA**, e à pesquisadora do Hospital Israelita Albert Einstein, Dra. **ELIANE ANTONIOLI**, pela paciência, ensinamentos, discussões e correções deste trabalho que tornaram possíveis a sua conclusão.

Às secretarias da Pós-Graduação, **ROSELI DE NAZARÉ PEREIRA PASCHOA** e **SANDRA DA SILVA** pelo apoio e orientação em todos os momentos até a conclusão deste trabalho.

“Quem elege a busca não pode recusar a travessia.”

(Guimarães Rosa)

Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Lista de figuras	x
Lista de abreviaturas e símbolos	xi
Resumo	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	6
3 LITERATURA	8
4 MÉTODOS	35
4.1 Obtenção da proteína recombinante Losac	36
4.2 Obtenção dos fibrocondrócitos de rato	36
4.2.1 Procedimento cirúrgico	36
4.2.2 Isolamento dos fibrocondrócitos	37
4.2.3 Manutenção das culturas primárias	38
4.3 Caracterização celular da cultura primária de fibrocondrócitos por RT-qPCR	38
4.4 Ensaio biológicos	40
4.4.1 Tratamento dos fibrocondrócitos	40
4.4.2 Ensaio de viabilidade celular	40
4.4.3 Ciclo celular por citometria de fluxo	41
4.4.4 Avaliação da atividade apoptótica por citometria de fluxo	42
4.4.5 Quantificação de óxido nítrico (ensaio de Griess)	43
4.4.6 Liberação de metaloproteinases por zimografia	44
4.4.7 Efeito do rLosac na produção de moléculas de matriz extracelular por imunocitoquímica	44
4.4.8 Efeito do rLosac na produção de moléculas de matriz extracelular por Western blot	45

4.5 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Obtenção do rLosac	48
5.2 Caracterização dos fibrocondrócitos	48
5.3 Efeito citoprotetor do rLosac em fibrocondrócitos de rato	51
5.4 Alterações na distribuição das fases do ciclo celular frente ao tratamento com a rLosac	55
5.5 Efeito do rLosac na morte celular por apoptose	56
5.6 Efeito do rLosac na liberação de óxido nítrico	57
5.7 Efeito do rLosac na liberação de metaloproteinases por zimografia	59
5.8 Efeito do rLosac na expressão de moléculas da matriz extracelular	59
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÃO	69
8 REFERÊNCIAS	71
NORMAS ADOTADAS	
ABSTRACT	
ANEXOS	

Lista de figuras

Figura 1. Exemplar da larva de <i>Lonomia obliqua</i> no sexto instar.	36
Figura 2. Fases do ciclo celular por citometria de fluxo.	42
Figura 3. Diagrama de citometria de fluxo de células marcadas com Anexina V-FITC/PI.	43
Figura 4. Produção do rLosac em bactéria BL21 (DE3).	48
Figura 5. Curva de eficiência do colágeno tipo I.	49
Figura 6. Curva de eficiência do colágeno tipo II.	49
Figura 7. Curva de eficiência do SOX-9.	50
Figura 8. Curva de eficiência do GAPDH.	50
Figura 9. Expressão dos mRNA (qPCR).	51
Figura 10. Padronização da concentração de IL-1 β	52
Figura 11. Efeito do rLosac na viabilidade celular pelo método do brometo de dimetiltiazil difeniltetrazolio.	53
Figura 12. Efeito do rLosac na viabilidade celular pela contagem de células.	53
Figura 13. Fotomicrografia de monocamadas de culturas celulares.	54
Figura 14. Distribuição das fases do ciclo celular de fibrocondrócitos	56
Figura 15. Efeito do rLosac no processo de apoptose de fibrocondrócitos de rato induzido pela IL-1 β	57
Figura 16. Efeito do rLosac na liberação de óxido nítrico em condições normais de cultivo	58
Figura 17. Efeito do rLosac na liberação de óxido nítrico em condições pró-inflamatórias	58
Figura 18. Imagens de géis de zimografia de gelatina.	59
Figura 19. Imunocitoquímica de fibrocondrócitos marcados com anticorpo anti-colágeno do tipo II	60
Figura 20. Imunocitoquímica de fibrocondrócitos marcados com anticorpo anti-fibronectina.	60
Figura 21. Imunocitoquímica de fibrocondrócitos marcados com anticorpo anti-laminina.	61
Figura 22. Análise das moléculas de matriz extracelular dos extratos celulares por Western blot.	61

Lista de abreviaturas e símbolos

ACAN	Agrecan
ADAMTS	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs</i> – Proteínas Desintegrinas com Motivos de Trombospondina
AH	Ácido Hialurônico
APO	Baixa Massa Molecular
ATJ	Artroplastia total de joelho
BSA	Albumina Sérica Bovina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEUAIB	Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto Butantan
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COL1A1	Colágeno I
COL2A1	Colágeno II
COX-2	Ciclooxigenase 2
CS	<i>Chondroitin sulfate</i> - Sulfato de Condroitina
CTS	<i>Compact Tension Specimen</i> - Tensão de Tração Cíclico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> - Meio Dulbecco
DMDOA	<i>Disease-Modifying Drugs for Osteoarthritis</i> - Drogas Modificadoras da Doença Osteoartrite
DRG	<i>Dorsal Root Ganglion</i> - Gânglio Dorsal
DTF	<i>Dynamic Tension Filter</i> - Forças de Tensão Dinâmica
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ER	Ranelato de Estrôncio
ESCEO	<i>European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis</i>
<i>et al.</i>	et alia(e outros)
EUA	Estados Unidos da América
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
Fg	Fibrinogênio
FnF	Fragmentos de Fibronectina
g	Grama
GAG	Glicosaminoglicanos

GS	<i>Glucosamine sulfate</i> - Sulfato de glicosamina
h	horas
HDF	<i>Human Dermal Fibroblasts</i> – Fibroblastos Dérmicos Humanos
HLM	Herbal-Leucine Mixture
HNE	4-hidroxinonenal
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HUVECS	<i>Human Umbilic Vein Endothelial Cells</i> - Células Endoteliais do Cordão Umbilical
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1 β	Interleucina 1 β
IMC	Índice De Massa Corporal
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
kDa	kilo Dalton
L1-NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
Losac	<i>Lonomia obliqua Stuart-factor activator</i>
MEC	Matriz Extracelular
MEPS	<i>Medical Expenditure Panel Survey</i>
mRNA	RNA mensageiro
MMPs	Metaloproteinases
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> - Células-Tronco Mesenquimais
MTT	Brometo De Dimetiltiazil Difeniltetrazolio
NF- κ B	<i>Fator Nuclear Kappa β</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OA	Osteoartrite
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society Internacional</i> - Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite
ON	Óxido Nítrico
OOP	<i>Out-Of-Pocket</i>
OPG	Osteoprotegerina
PAI-1	Inibidor 1 do Ativador de Plasminogênio
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PBS	Salina Tamponada Por Fosfato

PCR	<i>Real Time Quantitative</i> - Reação da Polimerase em Cadeia
PI	Iodeto de propídeo
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> - Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPT	Limiar de Dor por Pressão
PS	Fosfatidilserina
PVDF	<i>Olyvinylidene Difluoride</i> - Fluoreto de Polivinilideno
p/v	Peso por volume
qPCR	reação da polimerase em cadeia em tempo real
RANK	<i>Activator of Nuclear Fator $\kappa\beta$</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear Fator $\kappa\beta$</i>
rLosac	Losac recombinante
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> - Transcrição Reversa da Reação de Polimerização em Cadeia
RT-qPCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RVV-X	metaloprotease extraída do veneno da serpente <i>Vipera russelli</i> .
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
sy-SADOA	<i>Slow-Acting Drugs for Osteoarthritis</i>
TNF- α	Fator De Necrose Tumoral- α .
t-PA	<i>Tecidual Plasminogen Activator</i> - Ativador de Plasminogênio Tecidual
VAS	<i>Visual Analogue Scale</i> - Escala Visual Analógica
WOMAC	<i>The Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index</i>

Resumo

Introdução: A Osteoartrite é a doença articular mais prevalente que resulta na degradação progressiva da cartilagem articular mediada por vias pró-inflamatórias de imunidade inata e a produção de citocinas. O uso de drogas condroprotetoras pode retardar o processo de degradação articular, embora a sua eficácia seja questionável. O rLosac é uma molécula de adesão citoprotetora proveniente da taturana *Lonomia obliqua*. **Objetivo:** Estudar o potencial condroprotetor do rLosac em fibrocondrócitos articulares de rato e analisar a capacidade de estimular a produção de moléculas da matriz extracelular. **Métodos:** A cultura primária de fibrocondrócitos foi obtida de meniscos de joelho de ratos, cultivadas em condições de deprivação de soro ou na presença de 10ng/mL de Interleucina 1 β e tratadas com o rLosac. Vários parâmetros foram avaliados: viabilidade celular, ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo, liberação de óxido nítrico, atividade das metaloproteinases 2 e 9 e a expressão protéica de moléculas de matriz extracelular. **Resultados:** O rLosac foi capaz de aumentar a proliferação celular de fibrocondrócitos e inibir a apoptose induzida por falta de nutrientes. Na presença de 10ng/mL de IL-1 β , o rLosac promoveu a redução da liberação de óxido nítrico, a redução da atividade das metaloproteinases 2 e 9 e a preservação da expressão de moléculas da matriz extracelular tais como colágeno tipo II, fibronectina e laminina. **Conclusões:** O rLosac é capaz de induzir proliferação celular de fibrocondrócitos e evitar a morte celular induzida por deprivação de soro ou pela presença de IL-1 β , modulando o ciclo celular e aumentando a sobrevivência celular, reduzindo a liberação de óxido nítrico e a atividade das metaloproteinases 2 e 9, além de induzir a expressão e preservação da matriz extracelular.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Osteoartrite (OA) é a doença articular mais prevalente sendo a articulação do joelho uma das mais acometidas nos indivíduos com mais de 50 anos (Fibel *et al.*, 2015).

De acordo com a Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite – (*OA Research Society International - OARSI*), a OA é uma das principais causas de dor e incapacidade motora em todo o mundo (McAlindon *et al.*, 2014). Atualmente a OA é definida como uma desordem que envolve as articulações móveis, caracterizada por estresse celular e degradação da matriz extracelular (MEC) iniciada por micro e macro lesões que ativam respostas de reparação adaptativas, incluindo as vias pró-inflamatórias de imunidade inata. A doença manifesta-se inicialmente como um desarranjo molecular seguido de alterações anatômicas e ou fisiológicas que podem culminar na doença (Kapoor *et al.*, 2011; Sharma, 2016).

Nos Estados Unidos da América (EUA) houve um aumento na prevalência de OA de mão, joelho ou quadril passando de 21 milhões de adultos em 1995 para 27 milhões em 2005 (Lawrence *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2011). O envelhecimento da população e a obesidade contribuem para elevar esses casos (Alvarez-Garcia *et al.*, 2014). Estima-se que os gastos com pacientes portadores de OA maiores de 60 anos nos EUA sejam de 47,8 bilhões de dólares anuais (Kotlarz *et al.*, 2009; Puig-Junoy, Ruiz Zamora, 2015). Apesar de não termos o número atual de pacientes acometidos com OA no Brasil, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) estimam que 9,9 milhões de brasileiros sofrem com OA, sendo que 4,2 milhões destes pacientes têm 60 anos ou mais (IBGE, 2008; Burgos-Vargas *et al.*, 2014).

Apesar de a OA ser um processo degenerativo que afeta a articulação de um modo geral, a cartilagem provavelmente é uma das estruturas onde se inicia o processo osteoartítico e se perpetua a doença (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Outras estruturas tais como tecidos sinoviais e periarticulares também estão envolvidas na OA (Wieland *et al.*, 2005; Cooper *et al.*, 2013; Kulkarni *et al.*, 2014).

Entre as estruturas envolvidas na degeneração articular temos os meniscos, que são estruturas fibrocartilagíneas elásticas com um papel fundamental na transmissão e distribuição de cargas na articulação do joelho (Sanchez-Adams, Athanasiou, 2012; McNulty, Guilak, 2015). As propriedades dos meniscos são

determinadas pela complexidade da sua estrutura e composição, que consistem de uma MEC hidratada composta por colágeno I e II (COL1A1 e COL2A1), proteoglicanos, proteínas e glicoproteínas (McNulty, Guilak, 2015). A composição e a estrutura dos meniscos são mantidas pela homeostase articular dos processos anabólicos e catabólicos das células meniscais, com predomínio dos fibrocondrócitos. A atividade destas células é controlada por fatores biomecânicos, genéticos e bioquímicos como os fatores de crescimento e citocinas (Shin *et al.*, 2003; Deschner *et al.*, 2006; Ferretti *et al.*, 2006a; Kulkarni *et al.*, 2014; McNulty, Guilak, 2015).

A OA resulta na degradação progressiva da cartilagem articular mediada por vários fatores, tais como fatores mecânicos, a produção de metaloproteinases (MMPs) que clivam os componentes da MEC, especialmente o colágeno e a produção de mediadores pró-inflamatórios que desencadeiam uma série de eventos que levam a mudanças na forma celular que induzem a morte celular através da ativação de caspase-3, inibição da via de sinalização ERK1/2 MAPK e fosforilação da p38 MAPK (Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Ferretti *et al.*, 2006a; El-Bikai *et al.*, 2010; Akkiraju, Nohe, 2015).

A inflamação tem sido descrita como um fator importante no desenvolvimento e progressão da OA (Kapoor *et al.*, 2011; Rezende *et al.*, 2013; Akkiraju, Nohe, 2015; Imamura *et al.*, 2015). As principais citocinas pró-inflamatórias descritas na fisiopatologia da OA são a interleucina-1beta (IL-1 β), o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6), e também a interleucina 8 (IL-8) (Kapoor *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2015; Imamura *et al.*, 2015). Estas citocinas são secretadas pelos fibrocondrócitos e pelos sinoviócitos e são reguladas positivamente durante a progressão da OA modulando o metabolismo dos fibrocondrócitos pelo aumento de fatores envolvidos no catabolismo do tecido, isto é, óxido nítrico (ON), ciclooxigenase 2 (COX-2), MMPs e outras enzimas proteolíticas, que degradam o ácido hialurônico (AH), o agrecan (ACAN), o colágeno e a fibromodulina favorecendo dessa forma a degradação da articulação (Stone *et al.*, 2014; Akkiraju, Nohe, 2015; Khan *et al.*, 2016). Assim, o controle da homeostase articular e da degradação da MEC é de grande interesse científico e médico para o desenvolvimento de novas terapias e alvos terapêuticos para as doenças como a OA e a artrite reumatoide (Martel-Pelletier *et al.*, 2008; Kapoor *et al.*, 2011).

O tratamento conservador da OA do joelho tem como objetivo diminuir a dor, prevenir deformidades articulares e melhorar a função articular (Rosales *et al.*, 2014; Fibel *et al.*, 2015). Entre as opções destacamos os tratamentos não farmacológicos e os farmacológicos (Chevalier, 2010; McAlindon *et al.*, 2014; Arden *et al.*, 2015; Fibel *et al.*, 2015; Roubille *et al.*, 2015). Os medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios propiciam uma melhora da dor e função nos quadros iniciais da OA, apesar de não modificarem o curso natural do processo degenerativo, porém apresentam efeitos colaterais quando são empregados por longos períodos especialmente em pacientes idosos (Akkiraju, Nohe, 2015; Fibel *et al.*, 2015). Conforme a doença progride, são indicados os tratamentos farmacológicos com drogas modificadoras da doença OA (*Disease-Modifying Drugs for Osteoarthritis - DMDOA*) tais como diacereína, sulfato de condroitina (*Chondroitin Sulfate - CS*), sulfato de glicosamina (*Glucosamine Sulfate - GS*) e glicosamina em combinação com o CS; e aplicação intra-articular de AH (Wang *et al.*, 2006; Chevalier, 2010; Bannuru *et al.*, 2011; Chiusaroli *et al.*, 2011; Rezende, Campos, 2012; Hochberg *et al.*, 2016; Kongtharvonskul *et al.*, 2015; Salvato *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015; Pavelka *et al.*, 2016).

A procura por novos tratamentos leva em consideração a bioquímica das vias de inflamação alteradas durante o processo de OA e o entendimento de que a OA não se trata de um processo puramente mecânico ou decorrente do envelhecimento (Lotz *et al.*, 2013; Rezende *et al.*, 2013). Nos últimos anos, avanços em terapias celulares para a restauração da cartilagem abriram novos caminhos para futuras intervenções terapêuticas. Neste contexto, a utilização de células-tronco mesenquimais (*Mesenchymal Stem Cells - MSCs*) tem sido apontada como uma opção terapêutica interessante devido às suas propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias e regenerativas (O'Sullivan *et al.*, 2011; Antonioli *et al.*, 2015; Fibel *et al.*, 2015; Ham *et al.*, 2015).

Apesar do grande número de opções para o tratamento da OA, esta ainda é uma doença que não apresenta cura (Richette, Bardin, 2004; Bastick *et al.*, 2015; Ham *et al.*, 2015). As recomendações atuais das sociedades médicas acreditam que há pouca evidência que as DMDOAs possam de fato beneficiar os pacientes, pois existem poucos trabalhos que mostrem os benefícios com tais drogas, além do que, dependendo das regulamentações dos países envolvidos, são consideradas

fitoterápicos ou nutracêuticos e são comercializadas com várias formulações diferentes, o que dificulta a realização de trabalhos que comprovem a sua eficácia. Portanto, novas linhas de pesquisa são necessárias para compreender o mecanismo desta doença e que possam auxiliar no desenvolvimento de novas terapias capazes de retardar a progressão da OA (Richette, Bardin, 2004; London *et al.*, 2011; Reginster *et al.*, 2012; Attur *et al.*, 2013; Bruyère *et al.*, 2016).

Neste contexto, avaliamos moléculas extraídas da *Lonomia obliqua*, que é uma taturana brasileira que possui cerdas e é encontrada principalmente no Sul e Sudeste do Brasil. O contato com as cerdas desta lagarta e consequente inoculação do veneno através da pele, causa sérios distúrbios na coagulação sanguínea (Zannin *et al.*, 2003).

Vários estudos mostram que a hemolinfa e o extrato da *Lonomia obliqua* contém diferentes moléculas com atividades biológicas interessantes (Alvarez Flores *et al.*, 2010). Uma das moléculas mais estudadas é o Losac, obtido na forma recombinante (rLosac) para expressão em sistema bacteriano (Alvarez Flores *et al.*, 2011). Estudos *in vitro* com a proteína purificada demonstraram que o Losac é capaz de induzir a proliferação de células endoteliais de cordão umbilical humano (*Human Umbilic Vein Endothelial Cells* - HUVECs) e evitar a morte induzida por deprivação de soro (Alvarez Flores *et al.*, 2006). O efeito citoprotetor do rLosac foi também observado em outros tipos celulares, por exemplo, neurônios e fibroblastos (Alvarez Flores *et al.*, 2012; Bosch *et al.*, 2016). Em fibroblastos, o rLosac modula o ciclo celular, reduz a liberação de espécies reativas de oxigênio e favorece a expressão de moléculas de MEC (Bosch *et al.*, 2016).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o possível potencial condroprotetor do rLosac no modelo de inflamação provocado pela IL-1 β em cultura de fibrocondrócitos retirados de meniscos de rato.

2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Avaliar o potencial condroprotetor do rLosac em culturas de fibrocondrócitos isolados de articulação de ratos normais, na capacidade de reverter o processo inflamatório induzido pela interleucina 1 β e na modulação da produção de componentes da matriz extracelular.

3 LITERATURA

Laemmli (1970) desenhou um método de eletroforese em gel com o objetivo de auxiliar na identificação de proteínas provenientes do bacteriófago T4 que na época eram desconhecidas. Algumas proteínas foram identificadas como produtos de genes específicos e outras como componentes principais da cabeça do bacteriófago que são clivadas durante o processo de montagem.

Mosmann (1983) descreveu um ensaio colorimétrico quantitativo utilizando um sal de tetrazólio para medir citotoxicidade, sobrevivência e proliferação de células de mamíferos. O ensaio detecta células vivas, não mortas, e o sinal gerado é dependente do grau de ativação das células. Os resultados podem ser detectados em leitor de microplacas com elevado grau de precisão e sem necessidade de lavagens durante o ensaio. As principais vantagens desse ensaio colorimétrico são a sua rapidez e precisão, e a falta de qualquer radioisótopo.

Vermes *et al.* (1995) descreveram o uso da anexina V e do iodeto de propídeo (*Propidium Iodide* - PI) em conjunto para a identificação de células em fase inicial de apoptose por citometria de fluxo. Utilizaram linfócitos humanos que foram irradiados em diferentes intensidades e concluíram que a marcação dupla com Anexina V e PI possibilitaria diferenciar células que estariam no início da apoptose daquelas que já se encontrariam em necrose ou apoptose tardia.

Martel-Pelletier *et al.* (2001) revisaram a literatura por conceitos sobre MMPs. As MMPs são endopeptidases zinco dependentes capazes de degradar os componentes da MEC incluindo o colágeno, proteoglicanos, fibronectina e laminina. De acordo com as suas propriedades estruturais e funcionais, as MMPs podem ser divididas em cinco grupos. As mais envolvidas no processo de osteoartrose são as collagenases (MMP-1,8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9) e estromelisinases (MMP-3, 10 e 11). As MMPs são sintetizadas como pró-enzimas e devem ser ativadas através da quebra proteolítica, sendo controladas por fatores fisiológicos e patológicos como citocinas pró-inflamatórias, hormônios, fatores de crescimento e proteases.

Camanho (2001) avaliou em artigo de atualização, aspectos relacionados à patogênese e os possíveis tratamentos para a OA do joelho. A OA de joelho é uma doença que se caracteriza por apresentar um caráter inflamatório e degenerativo com o envolvimento da cartilagem articular levando a uma deformidade articular. A OA pode apresentar uma etiologia primária pelo próprio envelhecimento ou pode ser secundária a etiologias traumáticas, inflamatórias e infecciosas. A estrutura da cartilagem articular e os aspectos inflamatórios observados na patogênese da doença são atualmente muito estudados e os recentes avanços terapêuticos tem se baseado em soluções biológicas e não cirúrgicas. O tratamento medicamentoso com drogas condroprotetoras pode ser indicado e o tratamento cirúrgico pode ser aplicado dependendo de alguns fatores como idade, comprometimento articular e função articular. O autor conclui que independente do tratamento proposto, a OA é uma doença evolutiva e deve ser tratada o mais precocemente possível.

Shin *et al.* (2003) avaliaram a influência do estresse (carga mecânica) na MEC dos meniscos, na presença de IL-1 β e determinaram o papel do ON nesse processo. As amostras de meniscos de porco foram submetidas a cargas de compressão dinâmica a 0,1MPa por 24 horas (h) em 0,5Hz e 1ng/mL de IL-1 e a síntese das proteínas totais, proteoglicanos e ON foram mensurados. A compressão dinâmica aumentou significativamente a síntese de proteínas e proteoglicanos (68 e 58%, respectivamente), comparado às amostras que não foram submetidas à compressão dinâmica. O efeito de estímulo do estresse mecânico foi impedido pela presença de IL-1, mas foi restaurado especificamente pela inibição de óxido nítrico sintetase (iNOS2). Esses achados sugerem que a IL-1 pode modular os efeitos da carga mecânica (tensão) sobre a MEC através de uma via que é dependente de ON.

Zannin *et al.* (2003) realizaram um estudo com 105 pacientes que apresentaram distúrbios hemostáticos após contato com as cerdas da taturana. O estudo foi realizado no Estado de Santa Catarina entre dezembro de 1998 e junho de 2000. A maioria dos acidentes ocorreu em áreas rurais (85%) e durante as atividades laborais (55%). Os testes globais de coagulação foram prolongados na maioria dos casos e os pacientes foram divididos em 3 grupos de acordo com nível de fibrinogênio (Fg): $\leq 0,5\text{g/L}$ (grupo A); $0,51 - 1,5\text{g/L}$ (grupo B), $>1,5\text{g/L}$ (grupo C).

Houve uma redução significativa dos fatores V, XIII, VIII e precalicreína no grupo A, sem qualquer alteração nos fatores X, II e von fator Willebrand. Trombina-antitrombina e protrombina F1+2 foram elevados na maioria dos pacientes. A antitrombina e proteína S não foram alteradas considerando que os níveis de proteína C foram reduzidos no grupo A. Os níveis de plasminogênio e de α 2-antiplasmina foram significativamente reduzidos no grupo A e os níveis do dímero-D foram extremamente altas em todos os grupos, demonstrando que a fibrinólise havia sido ativada, possivelmente de forma secundária à produção de fibrina. Níveis de ativador de plasminogênio tissular (*Tecidual Plasminogen Activator* - t-PA) foram normais e do Inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1) foi moderadamente elevado no grupo A. A contagem de plaquetas permaneceu acima de 150×10^9 plaquetas/mL em 97% dos casos. Em resumo, os resultados sugerem que o envenenamento por *Lonomia obliqua* é caracterizada por uma coagulopatia de consumo e fibrinólise secundária.

Richette e Bardin (2004) avaliaram a utilização das drogas condroprotetoras ou modificadoras da estrutura que pertencem a uma classe de drogas que são capazes de prevenir, estabilizar ou reparar lesões causadas pela OA. A eficácia dessas drogas pode ser observada em trabalhos que utilizam como parâmetro a diminuição do espaço articular em radiografias simples. A OARSI em 1996 classificou duas classes de drogas para OA: drogas sintomáticas que diminuem a dor e melhoram a função articular representada pelos anti-inflamatórios não hormonais e as drogas sintomáticas de ação lenta para OA (*Slow-Acting Drugs for Osteoarthritis-sy-SADOA*) representadas pelo GS, diacereína, extrato insaponificável de abacate, CS e AH.

Wieland *et al.* (2005) discutem os aspectos epidemiológicos e fisiopatológicos da OA e a necessidade de novos tratamentos. A OA é uma doença incapacitante que afeta milhões de pacientes. A sua etiologia é desconhecida, mas é provavelmente multifatorial. A OA nos coloca diante de um dilema: que muitas vezes começa a alterar tecidos diferentes antes da meia-idade, mas não pode ser diagnosticado até que se torne sintomática décadas mais tarde, quando as alterações estruturais já estão muito avançadas. As opções para tratar a dor

osteoartrítica crônica são insuficientes, mas novas opções medicamentosas estão surgindo.

Alvarez Flores *et al.* (2006) descreveram a purificação de uma proteína chamada Losac (*Lonomia obliqua Stuart Factor Activator*) purificado de um extrato de cerdas da lagarta *Lonomia obliqua*. Essa proteína possui 45 kilo Dalton (KDa) de massa molecular que ativa o fator X da coagulação sanguínea de uma forma dose dependente sem a influência de íons cálcio. Em culturas primárias de HUVECs, Losac foi capaz de induzir citoproteção quando as células estavam privadas de soro fetal bovino (SFB). Além disso, foi capaz de induzir o aumento da fase S do ciclo celular (duplicação de ácido desoxirribonucleico - DNA) e de induzir a proliferação de células endoteliais, de prevenir a morte induzida por deprivação de soro e estimular a liberação de moléculas associadas com processos proliferativos e antiapoptóticos tais como o ON e o t-PA. No entanto, o mecanismo pelo qual exerce essas atividades não foi determinado.

Cortial *et al.* (2006) descrevem um modelo tridimensional *in vitro* de cultura de condrócitos em base a uma estrutura formada por colágeno e estimulada com IL-1 β , que pode servir como modelo para o estudo de drogas anti-inflamatórias com potenciais efeitos antiartríticos e/ou antiosteoartríticos.

Deschner *et al.* (2006) avaliaram os efeitos dos testes de tensão de tração cíclica (*Compact Tension Specimen* - CTS) em fibrocondrócitos de meniscos de rato, submetidos a várias amplitudes e frequências, na presença ou na ausência de IL-1 β por até 24h. A fim de determinar se um possível efeito regulador de carga mecânica sobre a RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Fator- $\kappa\beta$*) e seus receptores em condições inflamadas foi preservado, as células foram estimuladas com IL-1 β durante 24h. A expressão e síntese de RANKL, RANK (*Activator of Nuclear Fator- $\kappa\beta$*), e osteoprotegerina (OPG) foram determinadas por testes semi-quantitativo e PCR (*real time quantitative*) em tempo real, Western blot e imunofluorescência. Os fibrocondrócitos constitutivamente expressaram baixos níveis de RANKL e RANK, mas os níveis de OPG foram expressos. A IL-1 β aumentou a expressão e síntese de RANKL e RANK significativamente ($p \leq 0,05$), enquanto a expressão de OPG não foi

afetada após 4 e 24h. Quando os fibrocondrócitos foram simultaneamente expostos a CTS, a expressão de RANKL e RANK foi significativamente regulada negativamente. O efeito inibitório do CTS na regulação positiva induzida por IL-1 β de RANKL e RANK foi sustentado, bem como magnitude e frequência dependente. Esse estudo fornece evidências de que a RANKL e seus receptores são expressos em fibrocondrócitos de menisco. Esses dados demonstram também que a carga mecânica dinâmica pode modificar a expressão de RANKL e RANK em condições inflamatórias.

Dudzinski *et al.* (2006) fizeram uma revisão da atividade biológica e farmacologia do ON e a regulação endotelial da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), produtora de ON, em condições fisiológicas e patológicas.

Ferretti *et al.* (2006a) demonstraram em modelo experimental de artrite em coelhos que os sinais biomecânicos são potentes agentes anti-inflamatórios que reprimem a ativação da transcrição de genes pró-inflamatórios e aumentam a expressão de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, que diminuem o processo inflamatório. Os autores revelaram os benefícios das terapias baseadas no movimento caracterizando os potenciais mecanismos intracelulares envolvidos. Esses sinais biomecânicos agem nos condrócitos inflamados, pois são potentes inibidores da indução de genes pró-inflamatórios e inibem a expressão de mediadores catabólicos como a IL-1 β , COX-2, MMP-1. Além disso, esses sinais induzem a expressão de IL-10 que diminui o processo inflamatório.

Ferretti *et al.* (2006b) estudaram a capacidade de resposta mecânica de fibrocondrócitos em condições normais e inflamatórias pela avaliação da expressão do mRNA da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), do TNF- α e da MMP-13. Para isso, fibrocondrócitos de menisco de ratos foram expostos a forças de tensão dinâmica (*Dynamic Tension Filter* - DTF) em várias magnitudes e frequências. Os resultados mostram que DTF em magnitudes de 5 a 20% não induzem a expressão de genes pró-inflamatórios. A IL-1 β induz um rápido aumento do mRNA da iNOS, enquanto que a exposição à DTF fortemente reprime esse efeito e de forma dependente à magnitude e às frequências rápidas. Tal como ocorre com a iNOS, a

exposição de fibrocondrócitos a DTF também inibiu a expressão de mediadores pró-inflamatórios induzidos pela IL-1 β que estão envolvidos na inflamação articular. Os resultados desse estudo mostram que a exposição de fibrocondrócitos à DTF durante 4 ou 8h foi suficiente para manter seus efeitos anti-inflamatórios durante as próximas 20 ou 16h, respectivamente. Assim, os sinais mecânicos agem como potentes sinais anti-inflamatórios, sendo críticas à magnitude e frequência.

Wang *et al.* (2006) analisaram os efeitos da aplicação intra-articular de AH de alto peso molecular na expressão gênica de 16 citocinas e enzimas relacionadas à OA em sinoviócitos retirados por punção articular de pacientes com diagnóstico de OA em fase inicial. Foram realizadas punções articulares de 15 pacientes com OA inicial. Após o cultivo dos sinoviócitos, as células foram expandidas para o experimento até a 4^o ou 6^o passagem e foram estimuladas com e sem IL-1 e foram tratadas com ou sem AH de alto peso molecular (600 e 800 KDa). Foi realizada a quantificação proteica da expressão de 16 genes envolvidos no processo inflamatório da OA. A viscosuplementação com AH de alto peso molecular pode ter efeito de modificar a estrutura da cartilagem por diminuir a regulação da expressão gênica da agreganase-2, TNF- α e IL-8 e iNOS em sinoviócitos do líquido sinovial retirados de pacientes com OA inicial. Esse efeito pode ser mediado pela interação entre CD44 e AH de alto peso molecular.

Bryan e Grisham (2007) discutem os métodos e estratégias comumente usados que permitem a quantificação precisa e sensível do ON ou dos produtos da reação do ON devido a sua curta meia vida.

O IBGE (2008) é o encarregado de publicar a projeção da população do Brasil por sexo e idade. Entre os anos de 1980 e 2050 estima-se que 9,9 milhões de brasileiros terão sofrido com OA, sendo que 4,2 milhões desses pacientes têm 60 anos ou mais (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008).

Lawrence *et al.* (2008) realizaram uma estimativa da prevalência de artrite e outras condições reumáticas nos EUA. Utilizaram dados disponibilizados pelos institutos nacionais de saúde e nutrição. A maioria dos dados não está disponível

para doenças reumáticas; para obtenção de dados mais específicos foram utilizados os dados adquiridos em 2005 a partir do *Census Bureau*. Os resultados mostram que entre os adultos norte-americanos, quase 27 milhões têm OA clínica (a partir da estimativa de 21 milhões para 1995), 711.000 têm polimialgia reumática, 228.000 têm arterite de células gigantes, até 3,0 milhões tiveram artrite gotosa (acima da estimativa de 2,1 milhões para 1995), 5,0 milhões têm fibromialgia, de 4 a 10 milhões têm a síndrome do túnel do carpo, 59 milhões tiveram dor lombar nos últimos 3 meses, e 30,1 milhões tiveram dor de garganta nos últimos 3 meses.

Martel-Pelletier *et al.* (2008) revisaram os aspectos mais relevantes da cartilagem articular em condições normais e no processo de OA. A cartilagem articular é um tecido especializado que se caracteriza por ser avascular, aneural e recobre as superfícies ósseas das articulações diartrodiais. Apresenta como funções principais suportar cargas, absorver impactos e é capaz de suportar as forças de cisalhamento. As propriedades da cartilagem articular estão relacionadas diretamente com a sua composição e estrutura da MEC, compostas por altas concentrações de proteoglicanos (agrecan) entrelaçadas por fibras colágenas e água, permitindo movimentos sem atrito com absorção do impacto e dissipação de cargas. Temos ainda uma população de células que são os condrócitos que são responsáveis pela síntese e manutenção da MEC. A OA é caracterizada pela degradação e perda da cartilagem articular, formação de osteófitos, remodelação do osso subcondral e inflamação da membrana sinovial. Apesar de não ser completamente elucidada, a etiologia é o resultado das alterações mecânicas, biológicas, bioquímicas e moleculares encontradas na doença. A via comum da degradação articular resulta na falha dos condrócitos em manter a homeostase entre a síntese e a degradação da MEC. Durante a evolução da doença, há processos inflamatórios da membrana sinovial desde o início da doença, nos quais favorecem mediadores inflamatórios a perpetuar a degradação articular. Os autores concluem que as novas pesquisas devem estar concentradas em identificar marcadores mais específicos, diagnósticos mais precoces nas fases iniciais da doença e novas estratégias de tratamento que tenham por objetivo retardar a progressão da doença.

Kotlarz *et al.* (2009) fizeram uma análise multivariável da relação entre OA e os gastos anuais em saúde assumidos pelos pacientes e pelas seguradoras nos EUA. Utilizaram dados da Medical Expenditure Panel Survey (MEPS) coletados entre os anos de 1996 a 2005. O MEPS é um banco de dados nacional representativo nos EUA, que inclui informações dos gastos com assistência médica, condições médicas, seguros saúde, e características sócio-demográficas. Os resultados mostram que a OA é uma doença que contribui muito com os gastos em assistência médica. Entre as mulheres, a OA aumentou as despesas pessoais (*Out-Of-Pocket* - OOP) em US\$ 1.379 por ano e as despesas das seguradoras em US\$ 4.833. Entre os homens, a OA aumentou as despesas OOP em US\$ 694 por ano e as despesas das seguradoras em US\$ 4.036. Dada a elevada prevalência da OA, os efeitos agregados sobre as despesas com cuidados de saúde são muito grandes. A OA foi responsável em elevar os gastos com assistência médica anual agregados em US\$ 185,5 bilhões. Desse montante, as despesas das seguradoras foram de US\$ 149,4 bilhões e as despesas OOP foram de US\$ 36,1 bilhões. Devido à maior prevalência de OA em mulheres e sua utilização dos cuidados de saúde, as despesas totais para esse grupo foi de US\$ 118 bilhões, ou quase dois terços do aumento total de despesas na área da saúde decorrentes da OA. A carga de custos de saúde associados com OA é elevada para todos os grupos examinados e é desproporcionalmente maior para as mulheres. Embora as seguradoras suportem o peso dos custos de tratamento para OA, os custos OOP também são substanciais.

Alvarez Flores *et al.* (2010) fazem uma revisão da distribuição das espécies de Lepidoptera no mundo, com ênfase no envenenamento causado pelo contato com a taturana brasileira *Lonomia obliqua*, uma espécie responsável por causar a síndrome hemorrágica em pacientes que tiveram contato com as cerdas e veneno deste animal. Os autores descrevem que a documentação sobre os efeitos adversos causados pelo contato com lepidópteros é muito escassa no mundo. A maioria das síndromes causadas por Lepidoptera são consequências do contato direto com os espinhos ou cerdas das lagartas, e alguns poucos pelo contato com o pelo do adulto (mariposa). O tratamento baseia-se na remoção de pelos, na aplicação de antiprurícticos tópicos e, em alguns casos, o uso de anti-histamínicos orais. No entanto, no caso de envenenamentos pela taturana *Lonomia obliqua*, o único

tratamento recomendado é o uso do soro antilonômico produzido no Brasil pelo Instituto Butantan. O soro mostrou ser eficaz no restabelecimento dos parâmetros da coagulação sanguínea e evita o aparecimento das complicações observadas em casos mais graves, tais como coagulopatia de consumo, hemorragia intracerebral, e insuficiência renal aguda. Os autores também fazem uma revisão dos estudos que foram realizados para compreender a fisiopatologia e mecanismo de envenenamento por *Lonomia obliqua*. Vários princípios tóxicos foram encontrados no extrato de cerdas e hemolinfa. Algumas toxinas do veneno têm geralmente mais de uma função. Com o advento das técnicas de biologia molecular tornou-se possível analisar esses processos em um nível molecular, dando assim origem a hipóteses sobre as bases moleculares do envenenamento. Essa avaliação contribui para melhorar a nossa compreensão das alterações dramáticas que causam síndrome hemorrágica em pacientes, o tratamento atual, e a diversidade das moléculas envolvidas nessa patologia.

Chevalier (2010) discute os desafios de encontrar novos tratamentos que possam retardar a progressão da OA. O objetivo dessa revisão é avaliar as vantagens da administração de drogas intra-articulares, em comparação com um tratamento sistêmico, em pacientes com OA das articulações que suportam peso, tais como a OA do joelho. Outras perspectivas incluem a terapia anticitocina, a terapia genética, a administração de fatores de crescimento, terapia com células-tronco e novos agentes tais como o lubricin. O desafio para os próximos anos é encontrar um tratamento que possa retardar a progressão da doença e que seja selecionado de acordo com as necessidades de cada paciente.

El-Bikai *et al.* (2010) descreveram o papel da 4-hidroxinonenal (HNE), um produto da peroxidação lipídica, em condrócitos osteoartríticos após ligação ao COL2A1 e o efeito benéfico do tratamento com carnosina, uma droga que age na captura da HNE. Na proporção de 1:20 (COL2A1 / HNE) o colágeno modificado foi capaz de induzir a expressão de ICAM-1, da integrina $\alpha 1\beta 1$ e da MMP-13, bem como a fosforilação das quinases ERK1/ERK2, do fator nuclear Kappa β (NF- κ B) e da p65, sem afetar a adesão e viabilidade celular nem a expressão de COL2A1. No entanto, na proporção de 1:200, o COL2A1 modificado pela HNE é capaz de alterar

a adesão dos condrócitos, induzir a morte celular e aumentar a atividade da caspase 3. Além de inibir a expressão da integrina $\alpha 1\beta 1$ e do COL2A1 e a fosforilação das quinases ERK1/ERK2, da NF- κ B e da p65. Em contraste, houve um aumento na liberação de PGE2, na expressão de COX-2 e na fosforilação da p38 MAPK. Em ambas as proporções, a modificação do COL2A1 pelo HNE afeta a forma celular. Os resultados desse estudo, em resumo, indicam que a ligação de HNE às proteínas da MEC tais como COL2A1, induz mudanças fenotípicas e funcionais que contribuem na deterioração da cartilagem e desenvolvimento da OA e que a carnosina é efetiva em neutralizar essas mudanças.

Lahm *et al.* (2010) descreveram as mudanças no conteúdo e síntese de COL1A1 e COL2A1 e de proteoglicanos em tecidos de cartilagem de 20 pacientes com OA de joelho. Os autores compararam os dados das análises de expressão quantitativa realizada por PCR em tempo real, com as análises de imagem obtidas por imunocitoquímica e histologia. Os resultados mostram que há um decréscimo do COL2A1 em amostras de OA avançada, e perda dos proteoglicanos, e que os dados de PCR em tempo real de *photoshop* das imagens mostram uma forte correlação com o COL2A1. Os autores concluem que as análises de imagem por *photoshop* podem se tornar um complemento valioso nos sistemas de classificação histopatológicas da cartilagem articular lesada.

Akhtar *et al.* (2011) realizaram um estudo do potencial anti-inflamatório e condroprotetor de um extrato composto por Herbal e pela mistura de aminoácidos provenientes da *Uncaria tomentosa*, *Boswellia spp.* e *Lepidium meyenii*, além de L-leucina (*Herbal-Leucine Mixture* - HLM), em condrócitos humanos osteoartíticos e em amostras de cartilagem com OA. Os autores trataram as células com IL-1 β e avaliaram o efeito do HLM na produção de ON, glicosaminoglicanos (GAG), MMPs, ACAN e COL2A1 em ambos os tipos celulares. Os resultados do estudo demonstram que o HLM é um agente anti-inflamatório eficaz, como evidenciado pela forte inibição da expressão de iNOS, MMP-9 e MMP-13 e da produção de ON em condrócitos pré-tratados com IL-1 β . Além disso, o extrato foi capaz de inibir a quebra da matriz evidenciado pelo bloqueio da liberação de GAG, e de regular positivamente ACAN e COL2A1. Esses efeitos foram mediados pelo NF- κ B. Os

resultados sugerem que o HLM pode ser um agente condroprotetor e anti-inflamatório na artrite, induzindo a expressão gênica, favorecendo o lado anabólico e regenerativo, e como uso potencial na terapêutica da OA.

Alvarez Flores *et al.* (2011) descreveram o sequenciamento, clonagem e expressão em sistema bacteriano da proteína Losac. A análise da sequência dos aminoácidos deduzidos a partir do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) revelou similaridade com membros da superfamília das imunoglobulinas (IgSF): 47 a 76% de identidade com hemolinas presentes em várias espécies de lepidópteros, 34 e 26% com os quatro primeiros domínios Ig da proteína neuroglian de *D. melanogaster* e L1-NCAM (*Neural cell adhesion molecule*) de humano, respectivamente. Similar à proteína nativa (extraída das cerdas da taturana *Lonomia obliqua*), o rLosac ativa o fator X da coagulação sanguínea independente da presença de íons cálcio. A proteína recombinante de 46 KDa foi produzida com uma cauda de 6 histidinas na região N-terminal para facilitar sua purificação com colunas de níquel-sepharose. A caracterização bioquímica do rLosac revelou que este ativa o fator X de forma similar à metaloprotease extraída do veneno da serpente *Vipera russelli* (RVV-X), uma metaloprotease extraída do veneno da *Vipera russelli*. Além disso, os estudos de inibição revelaram que a atividade enzimática do Losac é inibida pelo fluoreto de fenilmetilsulfonil (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride* - PMSF), sugerindo uma atividade tipo serinoprotease. Esse foi o primeiro relato de uma proteína do tipo hemolina capaz de ativar a coagulação sanguínea através da ativação enzimática específica do fator X.

Bannuru *et al.* (2011) realizaram um estudo de meta-análise com o objetivo de avaliar os resultados da utilização do AH *versus* placebo no tratamento da OA de joelho. Foram analisados 54 estudos elegíveis com 7.545 pacientes com diagnóstico de OA. Os maiores benefícios do tratamento com o AH foram observados a partir da 4ª semana, apresentando o maior benefício na 8ª semana. A terapia apresentava um efeito residual até a 24ª semana com melhora da sintomatologia. Os autores destacaram que a terapêutica com AH pode ser observada até os seis meses de tratamento. Além disso, a utilização do AH pode ser útil no tratamento da OA e deve ser combinada com outras terapias.

Baum e Duffy (2011) publicaram uma revisão bibliográfica onde são discutidas as diferenças estruturais e funcionais entre miofibroblastos e fibroblastos e examina as diferentes funções desses dois tipos diferentes de células no coração. Estudos mostram que os fibroblastos estão envolvidos na formação da MEC. Além disso, eles participam no processo de reparação tecidual através da sua diferenciação em miofibroblastos, que são células envolvidas na resposta inflamatória em uma lesão. Os miofibroblastos migram para os locais de lesão, onde eles produzem citocinas, aumentando assim a resposta inflamatória.

Camanho *et al.* (2011) relatam os fatores envolvidos na gênese da dor na OA do joelho nos pacientes que apresentam dor refratária ao tratamento convencional realizado pelos ortopedistas e reumatologistas. Em algumas situações devem-se contemplar alvos terapêuticos com o manejo de moduladores da medula espinal e do córtex cerebral como, por exemplo, os antidepressivos, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

Chiusaroli *et al.* (2011) avaliaram o efeito do GS cristalina em culturas de células estimuladas com IL-1 β (2ng/mL a 10ng/mL) e na expressão de marcadores de degradação articular e de inflamação por 1, 2, 6 e 24h. Os autores concluíram que a glicosamina inibe a expressão de genes de diferentes marcadores de inflamação e degradação articular por agir na via de inflamação NF- κ B.

Kapoor *et al.* (2011) discutem o conhecimento do papel das citocinas pró-inflamatórias na fisiopatologia da OA e abordam o potencial da terapia anticitocina no tratamento dessa doença. A OA está associada com a destruição de cartilagem, a remodelagem do osso subcondral e a inflamação da membrana sinovial, embora a etiologia e patogênese subjacente a essa doença debilitante sejam mal compreendidas. A secreção de moléculas inflamatórias, tais como as citocinas pró-inflamatórias, estão entre os mediadores críticos responsáveis pelos distúrbios implicados na fisiopatologia da OA. Estas citocinas, incluindo a IL-1 β , o TNF, IL-6, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, o fator inibidor de leucemia e a IL-8 têm sido mostrados por estar implicados na OA o que os torna possíveis alvos terapêuticos.

Kim *et al.* (2011) abordam os conceitos da biologia celular espacial da MEC, especialmente no papel das integrinas e proteoglicanos de heparan sulfato nos mecanismos que respondem às informações físicas e químicas do ambiente, avaliando a conexão direta entre a MEC com os sítios de adesão local, fatores de crescimento e as respostas que levam à ativação de vias de sinalização, integrando assim ambos os sinais externos e internos no espaço e tempo.

London *et al.* (2011) referem que existe uma lacuna no tratamento dos pacientes sintomáticos que são submetidos ao tratamento conservador da OA e que se recusam aos tratamentos mais invasivos. A demora da aceitação dos tratamentos mais invasivos como a substituição articular ou osteotomias em pacientes mais ativos leva a piora do quadro doloroso, e a piora da qualidade de vida, levando a um aumento dos custos financeiros no tratamento da OA. Os autores concluíram que há uma necessidade de se encontrar uma opção mais segura e eficaz para os pacientes com OA moderada e grave.

O'Sullivan *et al.* (2011) discutem o conhecimento sobre terapia de reparação celular para OA, tal como o uso de células condroprogenitoras. A cartilagem tem uma capacidade limitada de cicatrização devido à baixa motilidade dos condrócitos, à baixa taxa de proliferação, e à ausência de vasos sanguíneos. As células condroprogenitoras são células que se diferenciam em condrócitos maduros, para reparar lesões articulares e subsequentemente inibir o aparecimento das OA. A embriogênese da articulação se desenvolve a partir dos precursores mesodermis embrionários que por sua vez se diferenciam em condroprogenitores e, finalmente, em condrócitos adultos maduros ou sinoviócitos. A hipótese de muitos estudos é que os progenitores retidos nesses tecidos articulares adultos proporcionam um reservatório potencial de células condroprogenitoras.

Pereira *et al.* (2011) realizaram uma revisão sistemática das diferenças nas estimativas de prevalência e incidência de OA, de acordo com os métodos de avaliação. Foram revisados 72 trabalhos sendo que 9 estavam relacionados com incidência e 63 com prevalência. Os autores concluíram que a maior prevalência de

OA acontece na região das mãos, embora a OA de joelho seja a mais estudada e mais frequente em mulheres. Em todas as articulações estudadas, a maior prevalência foi definida pela classificação radiológica. A grande heterogeneidade dos trabalhos revisados não permite encontrar novas conclusões.

Alvarez Flores *et al.* (2012) descreveram o efeito citoprotetor da proteína rLosac em HUVECs e em neurônios do gânglio dorsal (*Dorsal Root Ganglion - DRGs*). Os resultados mostram que o rLosac induz proliferação e sobrevivência celular e que esse efeito foi inibido pela estaurosporina, um inibidor de PKC. Outros inibidores tais como o L-NAME, um inibidor da enzima eNOS, e o LY294002, um inibidor de PI3K, não tiveram efeito sobre esta atividade. Análise de Western blot indica ativação de vias de sinalização. Em neurônios DRGs, o rLosac não tem efeito tóxico em concentrações de até 200nM da proteína. Há um aumento da função mitocondrial e ativação de vias de sinalização intracelular.

Reginster *et al.* (2012) avaliaram a utilização do GS no tratamento da OA dos membros inferiores nos últimos vinte anos com a melhora dos sintomas (dor e função) e com objetivo de retardar a progressão estrutural da OA. A prescrição diária do GS na dose de 1500mg, uma vez ao dia, é capaz de reduzir os sintomas de OA dos membros inferiores, além de postergar a indicação cirúrgica da OA em 50% dos pacientes após a descontinuidade do tratamento medicamentoso. Os autores concluíram que o GS apresenta efeitos positivos para o tratamento da OA dos joelhos. Esses resultados não devem ser extrapolados para outros sais da glicosamina (cloridrato e suplementos alimentares), pois não há regulamentação sobre a farmacocinética e farmacodinâmica dessas formulações.

Rezende e Campos (2012) realizaram uma revisão sobre o tratamento da OA com a utilização da viscosuplementação. A viscosuplementação consiste na injeção intra-articular de AH exógeno nas articulações diartrodiais, com o objetivo de restaurar propriedades reológicas do líquido sinovial produzindo efeito mecânico, analgésico, anti-inflamatório e condroprotetor sobre a articulação. O AH é um polissacarídeo de alta viscosidade produzido naturalmente pelas células B da membrana sinovial. Os efeitos da viscosuplementação estão diretamente

relacionados ao peso molecular, a configuração espacial e a concentração do fármaco fornecendo melhora da dor e da função articular alterando o curso natural da doença, além de apresentar um bom perfil de segurança.

Attur *et al.* (2013) descreveram os recentes avanços na identificação de biomarcadores para OA que irão identificar os pacientes que evoluíram com OA sintomática. A finalidade de se pesquisar biomarcadores prognósticos seria identificar subgrupos de pacientes em que a doença progrida de forma mais rápida. Os autores concluem que esses avanços podem colaborar no desenvolvimento de drogas modificadoras da doença osteoartrítica.

Cooper *et al.* (2013) definiram que a OA é uma síndrome clínica de insuficiência articular devido à degradação da cartilagem e do envolvimento de outras estruturas periarticulares. A *European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis* (ESCEO) e a Fundação Internacional de Osteoporose foram convocadas para rever as diretrizes atuais para a realização de ensaios clínicos e avaliar novos medicamentos para OA. Os autores consideram que os principais desafios no desenvolvimento de drogas condroprotetoras são a ausência de definição da doença, especialmente nas fases iniciais e a falta de consenso na literatura para se observar desfechos clínicos significativos. A ESCEO considera que na OA de joelho, a diminuição do espaço articular maior do que 0,5mm por mais de dois ou três anos seguidos pode ser considerada como parâmetro para indicação para artroplastia total de joelho (ATJ). Estudos recentes utilizando outras técnicas como ressonância nuclear magnética (RNM) e marcadores bioquímicos podem auxiliar no diagnóstico precoce da doença.

Lotz *et al.* (2013) elaboraram um artigo após encontro da ESCEO onde foi discutida a importância dos marcadores bioquímicos do metabolismo da matriz no desenvolvimento de medicamentos para a OA. Os melhores marcadores são moléculas ou fragmentos moleculares presentes na cartilagem, osso e sinoviócitos. Atualmente os marcadores mais estudados estão associados com o metabolismo do colágeno e do ACAN na cartilagem. Outros marcadores estão relacionados com processos de inflamação e de fibrose. Ainda os biomarcadores podem ser utilizados

para investigação, prognóstico, eficácia de tratamento (ajudar no diagnóstico) e segurança na pesquisa de novos medicamentos para a OA.

Rezende *et al.* (2013) avaliam os conceitos da OA com ênfase no envolvimento inflamatório na fisiopatologia da doença articular e a possível aplicação clínica de novos medicamentos e medidas no tratamento da OA. É fundamental ter em mente que o tratamento da OA não é escalonado, e sim multimodal. A OA não tem cura, mas pode ser controlada por medidas conservadoras como dieta, atividade física, uso de órteses ou palmilhas e a administração de medicamentos. Nos casos aonde não há melhora com o tratamento conservador, o tratamento cirúrgico deve ser indicado, sendo que a substituição articular pode ser indicada melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

Alvarez-Garcia *et al.* (2014) analisaram os efeitos dos ácidos graxos palmitato e oleato em células de condrócitos de pacientes osteoartríticos e de células de sinoviócitos de pacientes jovens, ambos grupos foram submetidos à ATJ. As culturas foram tratadas com palmitato, oleato isoladamente ou com IL-1 β . Foram analisadas a viabilidade celular, a atividade da caspase, e a expressão gênica e protéica de componentes da MEC. Os resultados mostraram que o palmitato induziu a atividade da caspase e a morte celular em condrócitos normais estimulados com IL-1 β e regulou IL-6 e COX 2. Os autores concluem que o palmitato apresenta uma ação pró-inflamatória e catabólica em sinergia com a IL-1 β induzindo apoptose e degradação da cartilagem articular. Estes dados sugerem que os níveis elevados de ácidos graxos saturados encontrados em pacientes obesos podem contribuir para a perpetuação do processo de degeneração articular.

Burgos-Vargas *et al.* (2014) avaliaram em estudo observacional, transversal, as características demográficas, clínicas e terapêuticas em pacientes com OA em países da América Latina (Argentina, Brasil e México). Foram incluídos 1.210 pacientes, com média de idade de 61,8 anos, 80,8% do sexo feminino, com sintomatologia de pelo menos 69 meses. Dos pacientes, 74% apresentavam limitação funcional, 71% utilizavam medicamentos por pelo menos 13,9 meses, e apenas 27% receberam medicação no mês anterior. Dos medicamentos prescritos,

50% eram anti-inflamatórios não hormonais, 32,5% analgésicos, e 27,5% drogas modificadoras do curso da doença. Os autores concluíram que os custos envolvidos na OA na América Latina dependem de variáveis demográficas, clínicas e terapêuticas. O papel dessas variáveis é influenciado pelo sistema de cuidados de saúde aos pacientes desses países.

Kulkarni *et al.* (2014) avaliaram os níveis de citocinas pró-inflamatórias do líquido sinovial de dois pacientes de 30 e 50 anos, com etiologias diferentes, que apresentavam lesões meniscais confirmadas por RNM. Após análise, foram encontrados níveis elevados de IL-1 β e ON em ambos os pacientes sendo maiores no paciente com etiologia traumática. As lesões meniscais são acompanhadas de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e podem acelerar o processo de degeneração articular.

McAlindon *et al.* (2014) descrevem a elaboração de um manual de recomendações para o tratamento não cirúrgico da OA de joelho. Reuniram-se treze especialistas de várias áreas para discutir e elaborar as diretrizes do manual. Foram considerados 29 tratamentos para recomendação baseados nas melhores evidências da literatura e em manuais anteriores, e incluem intervenções biomecânicas, exercícios, educação do paciente, e perda de peso. Os tratamentos apropriados para os subgrupos específicos incluem paracetamol, balneoterapia, capsaina, uso de bengalas, duloxetina, anti-inflamatórios não esteroides e tópicos. Essas recomendações fornecem orientações que podem ser úteis para todos os pacientes e devem ser individualizadas.

Rosales *et al.* (2014) avaliaram a relação entre o Índice de Massa Corporal (IMC), dor e função de OA de joelho em 38 pacientes que foram submetidos a tratamento seguindo as recomendações da OARSI. Todos os pacientes foram avaliados pelas escalas de WOMAC (*The Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index*), Lequesne, Escala Visual Analógica (*Visual Analogue Scale* - VAS) no início do tratamento e após seis meses. Em relação ao tratamento foi administrado diacereína e analgésicos, se necessário, órteses foram indicadas e um programa de educação para OA com atividade física, redução de peso e

reeducação alimentar. Em relação aos resultados quanto mais alto era o IMC inicial, menor foi a melhora da dor e, a função do joelho melhorou quando o IMC inicial era menor. Os autores concluíram que o IMC determina como os pacientes irão responder ao tratamento e melhorar a dor e função articular.

Stone *et al.* (2014) avaliaram o estímulo provocado por citocinas pró-inflamatórias em amostras de meniscos de cadáveres e condrócitos retirados de pacientes que foram submetidos à ATJ. As culturas de células foram estimuladas com IL-1 β , IL-6 e fragmentos de fibronectina (FnF) e as respostas aos estímulos foram analisados por PCR em tempo real. Para determinar o papel de NF- κ B na produção de MMPs, culturas de meniscos foram tratados com fatores inflamatórios com e sem o inibidor de NF- κ B. Houve aumento da secreção de MMPs em resposta ao estímulo das células meniscais normais e osteoartíticas. A expressão das citocinas IL-1 α , IL- β e IL-6, as quemoquinas IL-8, CXCL1, CXCL2 e CSF1, e os componentes do NF- κ B e TNF- α foram aumentados significativamente. Os autores concluíram que houve aumento da produção das MMPs e expressão de genes catabólicos. O menisco pode ter um papel ativo do desenvolvimento da OA após lesão na articulação com aumento da produção de citocinas, quemoquinas e enzimas de degradação da matriz.

Akkiraju e Nohe (2015) realizaram uma revisão bibliográfica sobre o papel de condrócitos na formação da cartilagem e na progressão da OA. A cartilagem articular recobre as articulações diartrodiais e é responsável pela distribuição mecânica de cargas através das articulações. A maior parte da sua estrutura e função é controlada pelos condrócitos que regulam a MEC e mantêm a homeostase do tecido. O desequilíbrio leva a doenças degenerativas como a OA que se caracteriza pela degradação da cartilagem, formação de osteófitos e rigidez das articulações. A degeneração da cartilagem é uma consequência da hipertrofia dos condrócitos, juntamente com a expressão de enzimas proteolíticas. As MMPs e as proteínas disintegrinas com motivos de trombospondina (*Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs* - ADAMTS) são um exemplo de enzimas que degradam a MEC. Os autores também versam as possíveis abordagens terapêuticas alternativas que utilizam infusão de MSC para a reparação da cartilagem.

Antonioli *et al.* (2015) estudaram a interação de células estaminais mesenquimais de medula óssea de (BM-MSCs) com condrócitos osteoartríticos e o efeito na produção de citocinas inflamatórias e hialuronato em um sistema Transwell. Os autores compararam estes resultados com monoculturas de ambos os tipos celulares. Os resultados mostram que houve uma diminuição na contagem de células BM-MSCs em cocultura com condrócitos-OA quando comparado ao BM-MSCs sozinho. Em monocultura, BM-MSCs produziram maiores quantidades de AH do que os condrócitos-OA e a cocultura de BM-MSCs com condrócitos-OA aumentou a produção de AH por célula. A expressão do mRNA ácido hialurônico sintase-1 foi regulada no BM-MSCs após cocultura com condrócitos-OA, enquanto a hialuronidase-1 foi regulada negativamente. Após cocultura, baixos níveis de IL-6 foram detectados de BM-MSCs em comparação com condrócitos-OA. Esses resultados indicam que, em resposta à cocultura com OA-condrócitos, BM-MSCs modulou o seu comportamento, aumentando a produção de AH e diminuindo citocinas inflamatórias. Os resultados indicam que BM-MSCs por si só poderia ser uma ferramenta potencial para a terapia regenerativa de OA, exercendo efeitos de curto prazo sobre o microambiente local, mesmo quando o contato celular-célula não está ocorrendo.

Arden *et al.* (2015) referem que a OA se caracteriza por apresentar diferentes fenótipos de pacientes com apresentações clínicas diversas, determinando que o tratamento deva ser individualizado para cada paciente. O diagnóstico clínico associado a exames de imagem pode ser utilizado no desenvolvimento de drogas para beneficiar o paciente. Atualmente biomarcadores bioquímicos, genéticos e epigenéticos estão sendo estudados para que em um futuro próximo nos ajudem na conduta clínica destes pacientes.

Barreto *et al.* (2015) realizaram um estudo para determinar a percentagem de células apoptóticas em um modelo de contusão da OA e para avaliar se a injeção intra-articular de elevadas doses de AH, imediatamente após o trauma poderia reduzir a apoptose. Para isso, foram avaliados 40 joelhos de coelhos adultos que foram submetidos ao modelo contusional descrito por Mazieres. Imediatamente após

o trauma, 2ml de AH foi infiltrado em um dos joelhos e 2ml de solução salina no joelho contralateral. O AH e a solução salina foram injetados no 3º, 7º, 10º, 14º, 17º e 21º dias após a lesão. A taxa de apoptose no modelo contusional foi de 68,01%. O AH reduziu a taxa de apoptose para 53,52% ($p < 0,001$). Os autores concluíram que a administração do AH imediatamente após a lesão reduziu a taxa de apoptose dos condrócitos.

Bastick *et al.* (2015) realizaram uma revisão sistemática dos fatores prognósticos para a progressão da OA sintomática. Dos 1392 artigos encontrados, 30 foram analisados, sendo que as maiores evidências mostram que a idade, etnia, IMC, comorbidades, sinovite infrapatelar evidenciada pela RNM, derrame articular, radiografias e OA sintomática, são fatores preditivos para a progressão da OA.

Chen *et al.* (2015) avaliaram os efeitos da IL-1 β e TNF- α sobre as propriedades mecânicas dos condrócitos de joelhos de cabra. A rigidez celular e a função contrátil foram avaliadas por citometria magnética óptica, e expressão de moléculas de MEC e citoesqueleto por imunofluorescência e por análise de Western blot. Os resultados mostraram que a rigidez dos condrócitos estava diminuída pela rotura da F-actina. O tratamento com 10ng/mL de IL-1 β ou 40ng/mL de TNF- α por 24h aumentaram o nível de F-actina e rigidez celular. Os autores concluem que a IL-1 β e TNF- α alteram as propriedades mecânicas dos condrócitos *in vitro*.

Fibel *et al.* (2015) avaliaram os artigos mais relevantes da literatura mostrando as maiores evidências no tratamento da OA do joelho. O manejo da OA inclui terapias não farmacológicas, que tem como enfoque a educação do paciente, estratégias para o próprio paciente, perda de peso, programas de alongamento, uso de imobilizadores e órteses para os pés. Os analgésicos orais e anti-inflamatórios são úteis no manejo da dor no curto prazo, pois quando administradas por longos períodos aumentam os riscos adversos. As drogas modificadoras da estrutura da cartilagem estão sendo pesquisadas como possíveis drogas com potencial de proteção ou podem retardar a progressão da doença, mas até o momento estudos devem ser realizados para esclarecer melhor a efetividade dessas drogas. As injeções intra-articulares podem ser indicadas no tratamento da OA do joelho com

corticoides e infiltrações com AH e mais recentemente estudos mostram novas modalidades como plasma rico em plaquetas e células mesenquimais. O objetivo do desenvolvimento de novas modalidades de tratamento seria postergar a indicação da necessidade da realização da ATJ na falha do tratamento conservador.

Ham *et al.* (2015) oferecem informações de possíveis estratégias na regeneração de cartilagem pelo transplante de MSCs em pacientes com OA. Os tratamentos convencionais da OA muitas vezes resultam em dor e atividade limitada. No entanto, o transplante de MSCs tem vários efeitos benéficos, tais como efeitos parácrinos, atividade anti-inflamatória, e capacidade imunomoduladora. Além disso, as MSCs podem ser diferenciadas em vários tipos de células, incluindo condrócitos, osteócitos, endotélio, e adipócitos. Assim, o transplante de MSC é uma ferramenta terapêutica sugerida para o tratamento de OA. Essa revisão também aborda os problemas de transplante de MSCs, tais como populações heterogêneas, incluindo MSCs diferenciadas e não indiferenciadas. Portanto, são necessárias novas estratégias para a indução de diferenciação das MSCs. Uma possibilidade é a aplicação de microRNAs (miRNA) e pequenas moléculas que regulam múltiplas vias moleculares e processos celulares, tais como a diferenciação.

Imamura *et al.* (2015) avaliaram as concentrações das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF- α) e IL-10 em pacientes com OA, e correlacionaram os níveis séricos com a intensidade da dor. Foram avaliados 53 pacientes, com idade igual ou superior a 60 anos, com diagnóstico de OA de joelho confirmados pelos critérios do Colégio Americano de Reumatologia. O grupo controle era composto por 48 indivíduos sem doenças articulares prévias. Os grupos foram avaliados pela VAS e responderam o questionário WOMAC. Amostras de sangue (5ml) foram coletadas para análise das citocinas por citometria de fluxo. O limiar de dor por pressão (*Pressure Pain Threshold* - PTT) foi mensurado utilizando um algômetro de pressão em diferentes regiões do corpo. Os pacientes com OA apresentaram maior sensibilidade de dor nas áreas investigadas ($p \leq 0,05$) e os níveis de IL-6 e IL-10 foram mais elevados no grupo com OA ($p \leq 0,05$). Os autores concluíram que os níveis séricos de IL-6 e IL-10 foram superiores nos pacientes com OA e a associação entre os níveis das citocinas com os questionários (WOMAC e

VAS) foram positivos. Esses resultados se alinham com o entendimento da fisiopatologia e fornecem dados para a terapêutica da doença.

Kongtharvonskul *et al.* (2015) conduziram revisão sistemática de estudos controlados randomizados com o objetivo de comparar resultados clínicos relevantes entre diacereína, glicosamina e placebo no tratamento da OA de joelho. Dos 505 estudos pesquisados, 31 foram elegíveis sendo que 23 eram relacionados com glicosamina e 8 a diacereína. Comparados ao placebo, a glicosamina mostrou ser superior em relação à escala WOMAC, WOMAC para dor, WOMAC para função e escala de Lequesne. A diacereína mostrou ser superior ao placebo em relação à VAS, WOMAC para função e para rigidez. O estudo sugere que a diacereína e a glicosamina são igualmente eficazes para a diminuição do quadro de dor, embora a diacereína apresente mais efeitos colaterais quando comparado a glicosamina.

McNulty e Guilak (2015) avaliaram estudos experimentais e teóricos que medem diretamente os efeitos biomecânicos de carga sobre os meniscos em condições fisiológicas e patológicas. Os estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que as células meniscais são expostas a um ambiente de sobrecarga não homogêneo. Os estudos relataram que as células meniscais são diretamente influenciadas por fatores físicos, como a tensão, compressão e a pressão hidrostática. Esses resultados podem ajudar na compreensão da patologia e mostrar possíveis abordagens terapêuticas para prevenir a degeneração e reparação dos meniscos.

Puig-Junoy e Zamora (2015) realizaram uma revisão sistemática com 39 artigos com o objetivo de apresentar os custos relacionados com a OA publicados na literatura até março de 2013. Os autores relataram que os custos diretos e indiretos relacionados com a OA podem estar entre 0,25 e 0,50% do Produto Interno Bruto desses países pesquisados. Os custos são crescentes e em 2011 houve um incremento de 1.000 euros para os pacientes tratados com OA. Além disso, os custos aumentam com a idade e com a gravidade da doença, principalmente quando há indicação cirúrgica. Existem poucos estudos que avaliam perda de produtividade e os custos relacionados com a incapacidade mostrando um aumento significativo de pacientes com mais de 50 anos acometidos com a doença.

Roubille *et al.* (2015) avaliaram o impacto da extrusão meniscal na progressão estrutural da OA e a resposta ao tratamento com ranelato de estrôncio (ER) de pacientes com e sem extrusão meniscal durante 36 meses. Os pacientes foram distribuídos em: grupo 1, com 113 pacientes utilizando 1 grama (g) de ER; grupo 2, com 105 pacientes utilizando 2g de ER; e grupo 3, placebo com 112 pacientes. Os autores concluíram que houve associação entre a extrusão meniscal e alteração da medular óssea com a perda da cartilagem articular e há efeito protetor com o tratamento com ER em pacientes com extrusão meniscal, bem como quando houve associação de extrusão meniscal e alteração da medular óssea.

Salvato *et al.* (2015) analisaram por estudo longitudinal a influência da farmacoterapia na qualidade de vida dos pacientes com diagnóstico de OA. Foram avaliados 91 pacientes de ambos os sexos, maiores de 70 anos portadores de OA de joelho e quadril. Foram levantados dados sobre a farmacoterapia no tratamento da OA utilizando questionários de qualidade de vida. Os autores observaram que os pacientes que foram tratados com CS associado com glicosamina tiveram menor declínio do componente físico, porém não influenciaram o componente mental da OA.

Singh *et al.* (2015) avaliaram os efeitos benéficos da utilização da condroitina na OA comparado com placebo ou medicação oral incluindo hormonais não esteroidais, glicosamina ou medicamentos oriundos de plantas. Foram incluídos 43 estudos controlados randomizados com 4962 pacientes que receberam condroitina e 4148 pacientes que receberam placebo foram incluídos. Os pacientes tratados com condroitina apresentaram pontuações maiores nas escalas funcionais e de dor comparados ao placebo. Os resultados revelaram que a condroitina isolada ou em combinação com glicosamina ou outro suplemento foram superiores na redução da dor até os seis meses de evolução. Os autores concluíram que a revisão de estudos randomizados, sendo que a maioria apresentava baixa qualidade metodológica, mostrou que a condroitina isolada ou em associação a glicosamina foi superior ao placebo em relação à dor até os seis meses de evolução, mostrando apresentar poucos eventos adversos na sua administração e novos estudos com melhor

qualidade são necessários para observar o efeito da condroitina no tratamento da OA.

Hochberg *et al.* (2016) compararam a eficácia e a segurança da utilização do CS associado com cloridrato de glicosamina e a utilização do celecoxib em pacientes com AO de joelho e dor severa. Foi realizado estudo multicêntrico o qual foi avaliado o tratamento de 606 pacientes que foram randomizados, sendo que 304 pacientes receberam 400mg de CS associado a 500mg de cloridrato de glicosamina três vezes ao dia e no outro grupo de 302 pacientes receberam 200mg de celecoxib diariamente por seis meses. Os autores concluíram que a associação do CS com glicosamina apresentou eficácia semelhante ao celecoxib após os seis meses em relação à melhora da dor, rigidez, limitação funcional e diminuição do edema. Até os quatro meses o grupo que recebeu celecoxib foi superior ao grupo que recebeu CS e glicosamina em relação à diminuição da dor, mas após o sexto mês eles foram iguais. A combinação do CS e glicosamina mostrou ser uma boa opção em pacientes com OA e deve ser considerada como opção no tratamento dos pacientes com OA que apresentem doenças cardíacas e gastrointestinais.

Bosch *et al.* (2016) estudaram o efeito citoprotetor da proteína rLosac em fibroblastos. O rLosac induz um efeito de sobrevivência celular em fibroblastos submetidos à deprivação de soro, observável após 24h pelo método do brometo de dimetiltiazil difeniltetrazolio (MTT). Além disso, a proteína foi capaz de induzir um aumento da migração de fibroblastos dérmicos humanos (*Human Dermal Fibroblasts* - HDF). Por citometria de fluxo, o rLosac causou um aumento dose-dependente das células na fase S do ciclo celular e uma redução significativa de células com DNA fragmentado. Além disso, o tratamento com rLosac resulta numa diminuição significativa na produção de espécies reativas de oxigênio e na perda do potencial de membrana mitocondrial, indicando que a redução do estresse oxidativo dos fibroblastos está envolvida no efeito citoprotetor induzido pelo rLosac. Os autores mostraram que houve aumento nos níveis do Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein 2*) e diminuição da proteína Bax (*BCL-2 associated protein X*), inibição da liberação de citocromo c e redução dos níveis de caspase-3, todos considerados fatores críticos para a apoptose, além da redução das alterações morfológicas. No seu conjunto,

esses resultados sugerem que rLosac induz fortemente a proteção celular em condições de estresse por privação de soro evitando danos e perda da função mitocondrial por inibição da apoptose. Essa descoberta abre uma nova perspectiva para compreender melhor o papel das proteínas hemolinas durante os processos celulares.

Bruyère *et al.* (2016) avaliaram as recomendações da ESCEO referentes aos aspectos relacionados à utilização de drogas de ação lenta para a OA incluindo o GS e o CS como primeira escolha no tratamento dos pacientes com OA. Apesar das recomendações para utilização desses medicamentos, a eficácia ainda é duvidosa, provavelmente porque é utilizada em todo mundo com formulações diferentes e com normas regulatórias dependendo dos países envolvidos. Dessa forma a ESCEO exalta a diferenciação entre as glicosaminas e ensaios clínicos de longo prazo e recomenda a utilização do GS cristalina (1500mg ao dia) minimizando a progressão da doença.

Khan *et al.* (2016) descreveram a historia natural das lesões meniscais com oito anos de seguimento e a sua relação com a mudança dos sintomas e estruturas envolvidas. Foram avaliados 198 pacientes com média de idade de 47 anos, sendo que 57% eram do sexo feminino. Entre os participantes, 22% apresentavam novas lesões meniscais, 16% apresentaram aumento do tamanho das lesões, enquanto não houve melhora entre os participantes. Houve associação entre o tamanho da lesão meniscal com a dor, IMC e presença de osteófitos no início dos estudos. As alterações observadas estão associadas de forma independente com a piora da dor e danos estruturais sugerindo que as lesões meniscais estão associadas com a evolução do processo degenerativo.

Pavelka *et al.* (2016) revisaram os riscos e os benefícios da utilização da diacereína na OA. Segundo a ESCEO a diacereína é considerada uma droga sintomática de ação lenta na OA, com propriedades anti-inflamatórias, anticatabólicas e pró-anabólicas na cartilagem e na membrana sinovial. Após avaliação pelas agências reguladoras da Europa, a ESCEO com a colaboração de 11 especialistas, definiu o papel da diacereína no tratamento da OA com base na

revisão de ensaios clínicos. Em relação aos efeitos colaterais, a diacereína tem demonstrado possuir efeitos gastrointestinais em alguns pacientes. Contudo, a utilização de drogas não esteroides anti-inflamatórias e paracetamol, podem apresentar efeitos colaterais em pacientes mais idosos que apresentem comorbidades. Os autores concluíram que a diacereína pode ser útil na OA de quadril e joelho, sendo considerado como primeira escolha do tratamento medicamentoso da OA, especialmente para os pacientes nos quais os medicamentos analgésicos são contraindicados.

Sharma (2016) revisou na literatura os trabalhos publicados sobre OA no Pubmed no período entre abril de 2014 a abril de 2015 com os seguintes descritores (OA/terapia, OA/epidemiologia). Foram encontrados 1523 trabalhos, sendo que 150 foram considerados relevantes e entraram nesta revisão. O autor concluiu pela revisão que os trabalhos devem se basear no desenvolvimento do tratamento farmacológico e não farmacológico. Além disso, as pesquisas futuras deverão estar direcionadas para relação entre a atividade física e a progressão e definição da OA, prevenção inicial no desenvolvimento da doença, intervenção terapêutica nas fases iniciais, identificação dos fenótipos clínicos e buscar tratamentos individualizados para os pacientes.

4 MÉTODOS

4.1 Obtenção da proteína recombinante Losac

O Losac é uma proteína citoprotetora purificada do extrato de cerdas da taturana *Lonomia obliqua* (Figura 1). A proteína rLosac foi produzida em sistema bacteriano utilizando bactérias cálcio-competentes da linhagem *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas com o vetor de expressão pAE-Losac, de acordo com a metodologia descrita por Alvarez Flores *et al.* (2011). A produção da proteína recombinante foi realizada em colaboração com Dra. Miryam P. Alvarez Flores e Dra. Ana Marisa Chudzinski-Tavassi do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan.



Figura 1. Exemplar da larva de *Lonomia obliqua* no sexto instar.

4.2 Obtenção dos fibrocondrócitos de rato

4.2.1 Procedimento cirúrgico

Para a obtenção das células, foram utilizados ratos machos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, variedade albina, *Rodentia*, *Mammalia*), adultos, com idade entre 15 e 20 semanas de vida, pesando entre 200 e 250g no início dos experimentos. Os animais utilizados foram adquiridos no biotério do Instituto

Butantan e mantidos no biotério do laboratório de Bioquímica durante o período experimental.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo sob o número 0299/12 (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) sob o número 902/12 (Anexo 2). Neste projeto foram seguidos os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.

A indução anestésica foi realizada pela injeção com cetamina (10mg/kg) e xilazina (2mg/kg). A seguir, o animal foi posicionado na mesa operatória em decúbito dorsal horizontal sendo realizada a tricotomia dos membros inferiores e antissepsia com gluconato de clorexedine e campos estéreis. O procedimento cirúrgico foi realizado por incisão longitudinal medial no terço proximal da perna, luxação lateral da patela e visualização dos meniscos sendo realizada exérese total de ambos os meniscos.

O sacrifício dos animais foi realizado através de injeção intra-peritoneal de doses tóxica do anestésico cetamina (150mg/kg) e xelazina (30mg/kg) causando morte indolor por parada respiratória após realização do procedimento cirúrgico.

4.2.2 Isolamento dos fibrocondrócitos

Fibrocondrócitos foram obtidos utilizando o protocolo descrito por Ferretti *et al.* (2006b). Em resumo, meniscos dos joelhos foram fragmentados e incubados com 0,2% de tripsina (Gibco) por 10 minutos, e depois com 0,15% de colagenase I (Sigma) por 2h a 37°C. Depois desse período de incubação com as enzimas digestivas, o material digerido foi lavado com meio de cultura DMEM/F-12 suplementado com 10% de SFB (Vitrocell), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco) e cultivado a 37°C em estufa com 5% CO₂.

4.2.3 Manutenção das culturas primárias

Quando confluentes, a monocamada celular foi lavada três vezes com tampão salino-fosfato pH 7,4 (PBS) e as células coletadas com o uso da solução de tripsina 0,25%/ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) 0,02% (Cultilab). A tripsina foi neutralizada pela adição de 1mL de SFB (Vitrocell). As células foram centrifugadas a 1000rpm, por 10 minutos e 4°C e ressuspensas em meio Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – DMEM) contendo 10% de SFB e a contagem celular realizada em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de tripan para avaliação de viabilidade celular. As células foram distribuídas em número de 1×10^5 células por tubo de polipropileno de 1,5mL, em volume final de 1mL contendo: 50% SFB, 10% DMSO e 40% de meio DMEM. Os tubos foram rotulados e colocados em caixas especiais para congelamento em cilindros contendo nitrogênio líquido.

No descongelamento, as células contidas nos tubos foram centrifugadas a 1000rpm, por 10 minutos e 4°C, ressuspensas em meio DMEM contendo 10% de SFB e cultivadas em garrafas de cultura de 25cm². Quando confluentes, a monocamada foi desaderida com tripsina 0,25%/EDTA 0,02% (Cultilab) e as células foram semeadas em placas conforme o requisito do experimento. Foram utilizadas células até a terceira passagem.

4.3 Caracterização celular da cultura primária de fibrocondrócitos por RT-qPCR

O fenótipo das células meniscais foi confirmado pela expressão do mRNA dos componentes de MEC cartilaginosa, COL1A1 E COL2A1 e SOX-9. Para isso, utilizou-se a extração do RNA total seguida de uma reação de transcrição reversa da reação de polimerização em cadeia (RT-PCR) quantitativa em tempo real ou RT-qPCR (*Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada um desses genes (Tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados e condições para reação de RT-qPCR

Número de acesso (GenBank)	Símbolo do gene	Sequência	Amplicon (pb)	T _m
NM_017008.4	GAPDH	Forward: GTGAAGGTCGGTGTGAACGG Reverse: ACTTTGTCACAAGAGAAGGCAGC	74	60°C
NM_053304.1	Col1a1	Forward: GTACATCAGCCCAAACCCCA Reverse: GATCGGAACCTTCGCTTCCA	98	60°C
NM_012929.1	Col2a1	Forward: GTTCACGTACTGCCCCTGA Reverse: AAGGCGTGAGGTCTTCTGTG	97	60°C
NM_080403.1	SOX-9	Forward: CTGAAGGGCTACGACTGGAC Reverse: AGTGTGGCTTGTTCTTGCTGG	73	60°C

O RNA total foi extraído das células em cultura monocamada semiconfluente de fibrocondrócitos de uma garrafa de 75cm² (3x10⁶ células) pelo método de TriZol[®] (Life Technologies) de acordo ao protocolo descrito pelo fabricante. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria, a partir da absorbância em 260nm. A pureza das amostras foi determinada pela razão entre os valores de absorbância em 260nm e 280nm e a integridade do RNA averiguada por eletroforese em gel de agarose/formaldeído 5%.

Após extração do RNA total, a síntese da primeira fita de cDNA foi iniciada a partir de 2µg de RNA total, com o emprego do *QuantiTect Reverse transcription Kit* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

O cDNA obtido foi submetido às reações de PCR em tempo real usando o equipamento ABI7500 (Applied Biosystem, Carlsbad, CA). As reações foram realizadas utilizando-se o kit *Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems). Diluições seriadas de amostras controle foram analisadas simultaneamente para estabelecimento de uma curva-padrão. A especificidade do produto gerado foi confirmada por análise da curva de dissociação dos produtos formados. Todas as amostras foram quantificadas em relação à equação obtida a partir do padrão interno do experimento. Apenas reações com uma eficiência entre o intervalo de 90 a 110% foram consideradas. O cálculo da eficiência da reação foi efetuado pela fórmula: Eficiência=10(-1/slope). Dessa forma, apenas reações com “slope” da curva-padrão entre -3,1 e -3,6 foram consideradas para análise. As amostras de tecido (cartilagem e menisco) foram utilizadas como referência. Reações utilizando *primers* para o gene do GAPDH foram utilizadas para normalizar os genes de interesse.

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Tratamento dos fibrocondrócitos

Os fibrocondrócitos foram semeados em placas de cultura de 6 (1×10^5 células/poço) ou 96 poços (1×10^4 células/poço). As células foram incubadas com meio DMEM suplementado com 10% de SFB (meio basal) na presença ou ausência de 10ng/mL de interleucina humana recombinante-1 β (IL-1 β , R&D System) por 24, 48 e 72h e foram tratadas com diferentes concentrações de rLosac.

Conforme descrito no item 4.1, o rLosac foi purificado em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (veículo). Em todos os ensaios *in vitro*, a concentração do veículo utilizado foi menor que 0,1% do volume total de meio de cultura.

4.4.2 Ensaios de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade foi realizado em placas de cultura de 96 poços. Os fibrocondrócitos ($1,5 \times 10^4$ células/poço) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB foram incubados com diferentes concentrações do rLosac (volume final de 200 μ L) na presença ou ausência de IL-1 β durante 24, 48 ou 72h.

Para análise de viabilidade e citotoxicidade, utilizou-se o ensaio de MTT (Mosmann, 1983). O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, Sigma) é um sal de tetrazólio cuja redução ocorre em mitocôndrias ativas em células viáveis. Esta biorredução está relacionada com desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH glicolítico produzidos pelas células viáveis. Após período de incubação, o sobrenadante celular foi removido e as células incubadas com 100 μ L de MTT (0,5mg/ml em PBS) a 37°C durante 3h. Após, adicionou-se 100 μ L de DMSO e os valores de absorvância foram mensurados a 540nm usando um leitor automático de placa Spectra MAX 190 (Molecular Devices, EUA).

A viabilidade celular também foi avaliada pela contagem de células. Os fibrocondrócitos foram tripzinizados e colocados em placas de 24 poços para aderência (20×10^3 células/poço) e mantidas até o dia seguinte com meio DMEM contendo 10% DE SFB. As monocamadas foram tratadas com rLosac (60nM) em condições de morte celular induzida por deprivação de soro e por indução pela

adição de 10ng/ml de IL-1 β . A contagem das células foi realizada em 72h de cultivo utilizando o aparelho Vi-Cell (Beckman Coulter). O aparelho fornece os valores do número total de células e número de células viáveis por mililitro.

4.4.3 Ciclo celular por citometria de fluxo

A influência do rLosac na proliferação celular foi avaliada através da análise da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular pela incorporação de PI mensurado por citometria de fluxo. O ciclo celular consiste em quatro fases principais: G (1), S, G (2), e M (Figura 2A). Quando há DNA fragmentado, há visualização de células hipodiploides (Figura 2B).

Os fibrocondrócitos (1×10^6 células/mL) foram tratados com rLosac 60nM durante 48h em meio basal (DMEM suplementado com 10% SFB) na ausência ou presença de 10ng/mL de IL-1 β . Após o tratamento, as suspensões celulares de fibrocondrócitos foram ressuspendidas em etanol 70% e armazenadas a -20°C. Após 12h de refrigeração, as células foram novamente centrifugadas e em seguida ressuspendidas em solução de PBS: 950 μ L de PI: 40 μ L (1mg/mL) e RNase: 10 μ L (10mg/mL), para a avaliação da quantidade e integridade do DNA nas fases do ciclo celular. Os resultados obtidos pelo programa de aquisição *Cell-Quest* adquiridos no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton e Dickson, EUA), foram analisados pelo programa *MODFIT 2,8 FACS* sendo utilizados 10.000 eventos para avaliação das fases do ciclo celular. Os resultados foram expressos em percentagem média de células distribuídas nas diferentes fases do ciclo celular: G0/G1, S e G2/M.

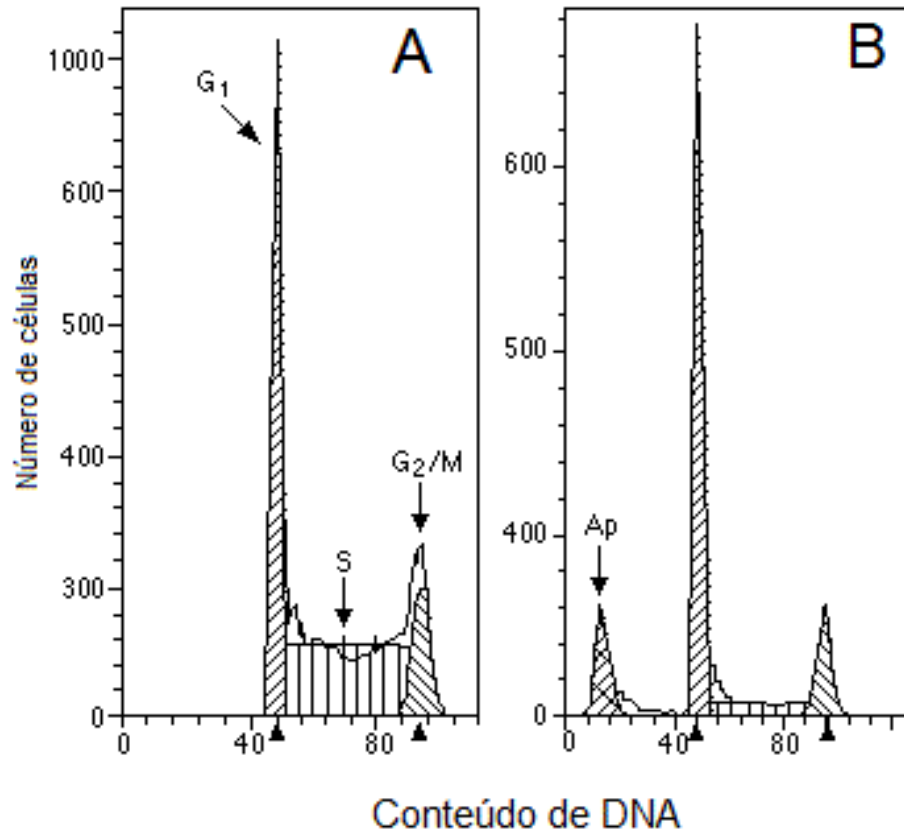


Figura 2. Fases do ciclo celular por citometria de fluxo. (A) Fases G1, S, G2, e M. (B) Pico correspondente ao DNA fragmentado (Ap).

4.4.4 Avaliação da atividade apoptótica por citometria de fluxo

Este ensaio baseia-se na habilidade das células apoptóticas de se ligarem à proteína Anexina V e de excluir o PI que estabelece a integridade da membrana celular (Vermes *et al.*, 1995). Uma das características das células apoptóticas é a exposição da fosfatidilserina (*Phosphatidylserines* - PS) na parte externa da membrana celular nos estágios iniciais da apoptose. A proteína Anexina V se liga irreversivelmente à PS das células apoptóticas, podendo ser identificada por citometria de fluxo utilizando uma Anexina V conjugada com fluoresceína. Em conjunto com esse anticorpo utiliza-se o PI, que não penetra pela membrana plasmática de células vivas, ou células que entram no processo precoce de apoptose. Células necróticas incorporam PI ao seu núcleo (Figura 3).

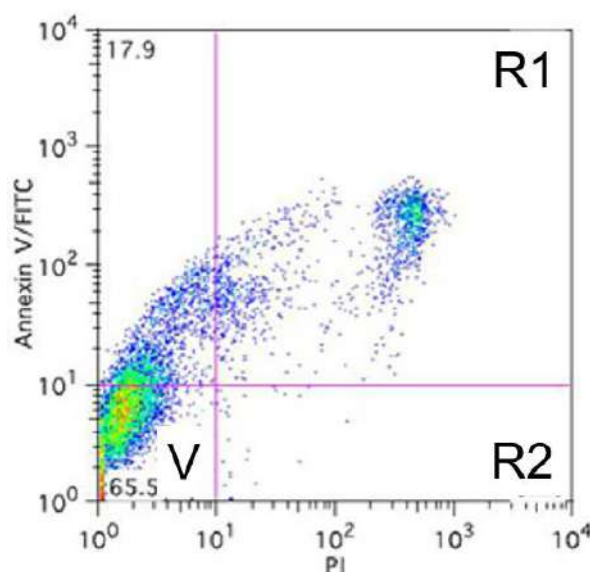


Figura 3. Diagrama de citometria de fluxo de células marcadas com Anexina V-FITC/PI.

Os fibrocondrócitos (1×10^6 células/mL) foram tratados com rLosac 60nM durante 48h em meio basal (DMEM suplementado com 10% SFB) na ausência ou presença de 10ng/mL de IL-1 β . As culturas primárias de fibrocondrócitos foram lavadas 2x em PBS a 4°C, ressuspensas em 100 μ L de tampão FACS e incubadas por mais 30 minutos com 1 μ g da proteína Anexina V conjugada com FITC (Santa-Cruz) e 18 μ g/mL de solução de PI (Sigma[®] Chemical). Os resultados obtidos pelo programa de aquisição *Cell-Quest* adquiridos no citômetro de fluxo *FACScalibur* (Becton e Dickson, EUA), foram analisados pelo programa *MODFIT 2,8 FACS* sendo utilizados 10.000 eventos.

4.4.5 Quantificação de óxido nítrico (ensaio de Griess)

O ON é um gás instável gerado na parede vascular a partir de L-arginina pela ação da cNOS (óxido nítrico sintase constitutiva) e da iNOS (Dudzinski *et al.*, 2006). Uma vez gerado ele é convertido em nitritos e nitratos.

O ensaio de Griess baseia-se na determinação espectrofotométrica de nitritos e nitratos, produtos estáveis da decomposição do ON (Bryan e Grisham, 2007). As monocamadas confluentes de fibrocondrócitos ($1,5 \times 10^4$ células/poço, placa de 96 poços) foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% de SFB na ausência ou presença do rLosac e/ou IL-1 β (10ng/mL) durante 24 e 48h. Os sobrenadantes

foram coletados e congelados a -80°C até a dosagem dos nitritos e nitratos pelo método de Griess. O reagente de Griess foi preparado misturando-se volumes iguais da solução A (sulfamilamida 1% em H_3PO_4 a 5%) e solução B (α -naftilenodeamina 0,1%). Na reação foram misturados 50 μl de cada amostra com 50 μl do Reagente de Griess, em triplicata, em placa de 96 poços de fundo redondo. Após incubação de 10 minutos, a temperatura ambiente, foi realizada a leitura da reação a 540nm no leitor de placa Spectra MAX 190 (Molecular Devices, EUA).

4.4.6 Liberação de metaloproteinases por zimografia

A liberação de MMPs (MMP-2 e MMP-9) foi analisada pelo método de zimografia utilizando sobrenadantes celulares após tratamento com ou sem o rLosac. As monocamadas confluentes de fibrocondrócitos ($1,5 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% de SFB na ausência ou presença do rLosac com ou sem a adição de 10ng/mL de IL-1 β durante 24 e 48h. Os sobrenadantes foram aplicados a um gel de SDS-PAGE de 7,5% contendo 1mg/ml de gelatina e com gel de empilhamento de 5%. A amostra foi dissolvida em tampão de amostra 4X (8% p/v dodecil sulfato de sódio (SDS), 40% glicerol, 200mM Tris-HCl, pH 6,8, e 0,02% azul de bromofenol). Após corrida (17mA, 4°C em câmara fria ou geladeira), o gel foi lavado com uma solução de 2,5% de Triton X-100 durante 1 hora e depois com água destilada. O gel foi incubado a 37°C com tampão Tris-HCl 10mM pH 7,5 contendo 5mM de CaCl_2 e 1 μM de ZnCl_2 . Finalmente, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250.

4.4.7 Efeito do rLosac na produção de moléculas de matriz extracelular por imunocitoquímica

Para confirmar a síntese das moléculas de MEC, foi realizada a marcação de culturas de fibrocondrócitos com alguns anticorpos específicos para COL2A1 (Goat polyclonal to COL2A1, 1/50, Santa Cruz), fibronectina (Rabbit polyclonal to Fibronectin, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, abcam), e laminina (Rabbit polyclonal to Laminin alpha 4, 1/500, abcam), diluídos em tampão de bloqueio (20mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, pH 7,5 contendo 0,1% de Triton X-100, 10% SFB, 1% albumina sérica bovina -

BSA). Foram utilizados anticorpos secundários diluídos em 20mM de Tris-HCl, 150mM de NaCl, pH 7,5 contendo 0,1% de Triton X-100: Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG (para laminina e fibronectina) e Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG (para COL2A1), ambos da Life Technologies (10µg/mL). As diluições dos anticorpos obedecem às recomendações dos fabricantes.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas estéreis na presença de 10ng/ml de IL-1β. Após o tratamento com rLosac (60nM), o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 3,7% por 10 minutos. Foi adicionado Triton X-100 0,1% por 15 minutos para permeabilização da membrana plasmática, seguida da adição do anticorpo primário e incubação durante 12h (*overnight*) no escuro a 4°C. As células foram lavadas com PBS e os anticorpos secundários foram adicionados e mantidos por 1 hora a temperatura ambiente, no escuro. Após lavagem, o núcleo das células foi corado com o reagente DAPI (Invitrogen) e as lamínulas foram montadas em lâminas contendo 4µl de solução antifade (VECTASHIELD, VECTOR-H1000), para preservar a fluorescência, e seladas com esmalte transparente. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência *Axio Imager A1* da marca Carl Zeiss.

4.4.8 Efeito do rLosac na produção de moléculas de matriz extracelular por Western blot

A síntese de MEC foi avaliada quantitativamente por Western blot. Foram utilizados os mesmos anticorpos da microscopia de fluorescência, mas com diluição de 1/200 para todos os anticorpos, diluídos em tampão de bloqueio Tris-HCl (20mM), NaCl (150mM), pH 7,7 contendo Tween 20 (0,05%) e leite desnatado (5% m/v). Foi utilizado também o anticorpo *Rabbit polyclonal to GAPDH* (1/200, Santa Cruz), que reconhece a proteína constitutiva GAPDH, como normalizador da expressão das proteínas de matriz. A exposição e visualização das proteínas por quimioluminescência foi realizada utilizando os anticorpos secundários ligados à enzima *Horseshoe Peroxidase* (HRP): *goat anti-mouse IgG-HRP* para COL2A1; e *goat anti-rabbit IgG-HRP* para GAPDH, fibronectina e laminina; e o substrato *ECL Western Blotting detection reagent* (GE Healthcare).

Após o tratamento com 60nM do rLosac na presença de 10ng/mL de IL-1 β , o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS. O descolamento das células foi realizado com ajuda de um rodo para cultura de células após adição de 300 μ l de tampão RIPA (Tris-HCl 50mM, pH 7,4, 1mM EDTA, 0,5% nonidet, 1mM MgCl₂, 10% glicerol, 100mM NaCl). O extrato celular foi mantido no gelo durante 30 minutos. A concentração de proteínas foi quantificada pelo *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific), de acordo as instruções do fabricante, e as amostras estocadas a -80°C antes do seu uso.

O lisado celular (contendo a 30 μ g de proteína) foi analisado por SDS-PAGE 10% (p/v) (Laemmli, 1970), sob condições redutoras pela mistura (proporção 1:1) com o tampão de amostra sem corante, e por Western blot conforme descrito no item 4.1.1, utilizando o aparelho Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System. Após a transferência, a membrana de fluoreto de polivinilideno (*Olyvinylidene Difluoride* – PVDF) foi tratada para revelação (protocolo amplamente difundido), com anticorpos primários específicos dissolvidos em solução de bloqueio (5% de leite desnatado em tampão TBS-T) de acordo com as recomendações do fabricante.

As bandas foram visualizadas no *MiniBIS Pro imaging system* (DNR Bio-Imaging Systems) utilizando o programa GelCapture Version 4.24 (DNR Bio Imaging System LTd.) e as análises realizadas com o programa *GelQuant Version 2.7.0* (DNR). A densidade das bandas foi comparada com a banda da proteína constitutiva GAPDH que serviu para normalizar a concentração dos extratos celulares. Os dados foram expressos como unidades arbitrárias.

4.5 Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (*Standard Error of Mean* - SEM) do número de repetição dos experimentos (n) indicado nas figuras ou nas suas legendas. A significância das diferenças entre dois grupos de valores foi calculada pelo teste *t de Student* não pareado. Quando um grupo de valores foi comparado com dois ou mais grupos, a significância das diferenças foi analisada pelo teste de ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção do rLosac

A proteína rLosac foi obtida de acordo com o protocolo descrito por Alvarez Flores *et al.* (2011). Em todas as etapas de expressão e purificação uma alíquota foi coletada para análise por SDS-PAGE (Figura 4A) ou Western blot (Figura 4B). A proteína apresenta massa molecular de 48,6 kDa (Figura 4C).

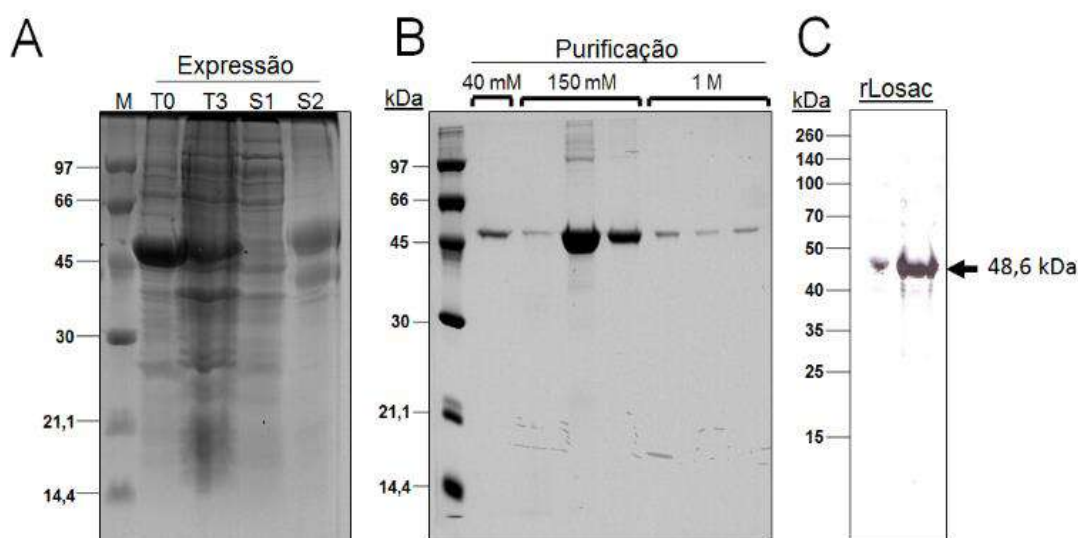


Figura 4. Produção do rLosac em bactéria BL21 (DE3). (A) SDS-PAGE em condições redutoras do processo de expressão do rLosac. T0 - Expressão basal; T3 - Expressão após 3h de indução com 1mM de isopropiltiogalactosídeo; S1 - Fração solúvel; S2 - Corpos de inclusão. M - 10 μ l de marcador de massa molecular *Low Molecular Weight-SDS Market Kit*. (B) Purificação do rLosac após expressão em BL21 (DE3). Foram coletadas frações eluídas com tampão contendo 40mM, 150mM e 1M de Imidazol. (C) Western blot do rLosac purificado utilizando o anticorpo primário 6X-His Monoclonal antibody (Clontech).

5.2 Caracterização dos fibrocondrócitos

Após a obtenção da cultura de fibrocondrócitos de rato, o fenótipo das células foi confirmado pela síntese de COL1A1 E COL2A1 e SOX-9. Após a reação de transcriptase reversa, foram determinadas as condições ideais dos *primers* para melhor eficiência. Obtivemos a amplificação de todos os *primers* para verificar as eficiências de amplificação de todos os genes (Figuras 5, 6, 7 e 8).

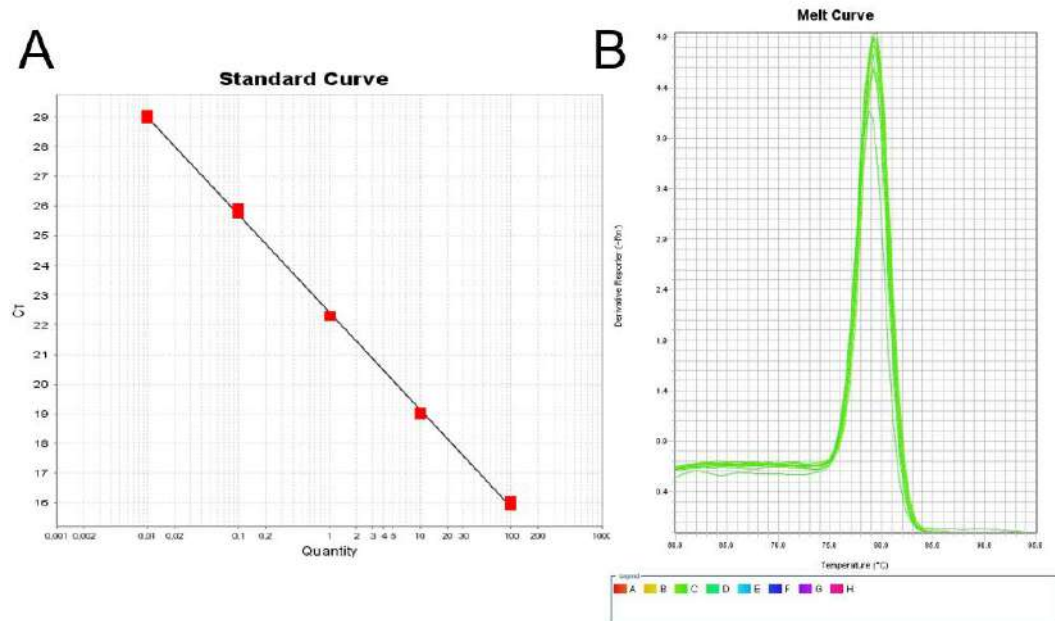


Figura 5. Curva de eficiência do colágeno tipo I (Col1a1). (A) Curva padrão. (B) Curva de melting.

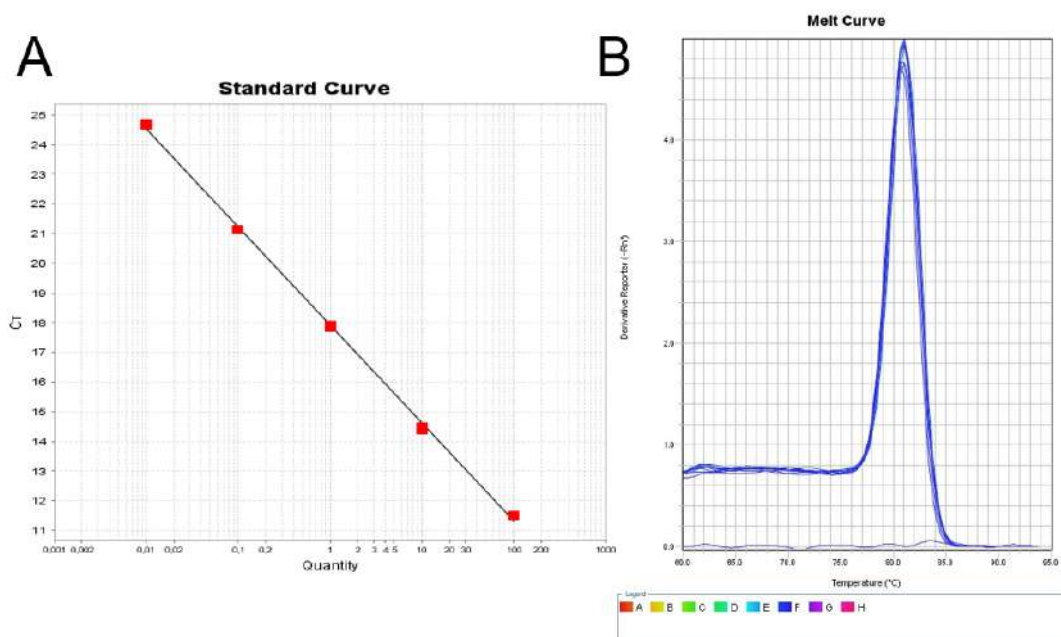


Figura 6. Curva de eficiência do colágeno tipo II (Col2a1). (A) Curva padrão. (B) Curva de melting.

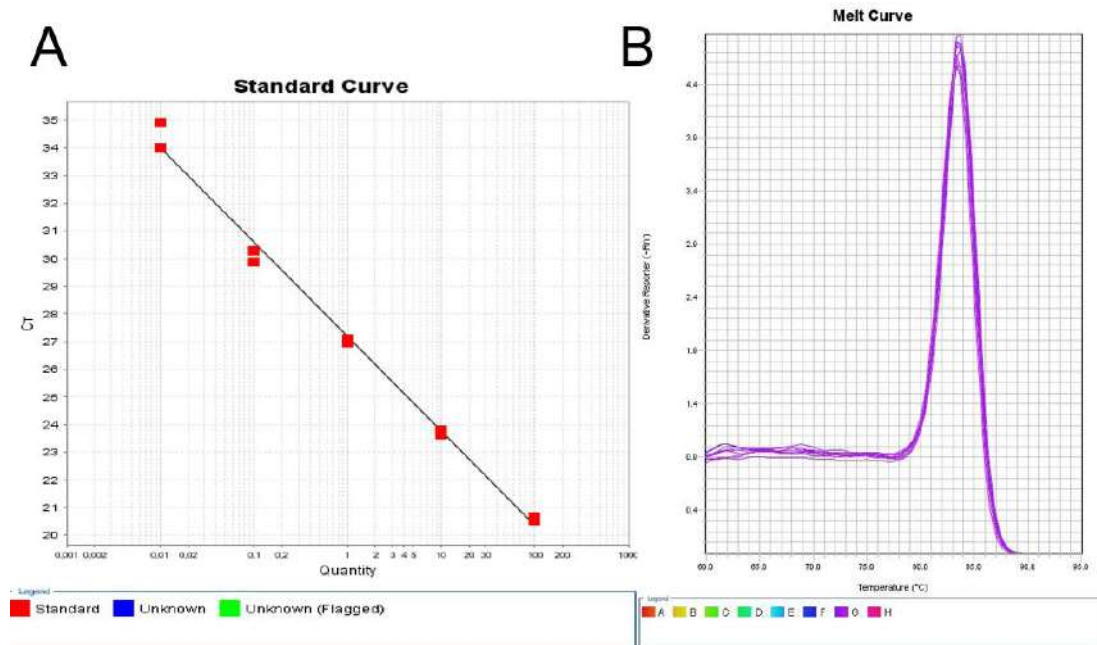


Figura 7. Curva de eficiência do SOX-9. (A) Curva padrão. (B) Curva de melting.

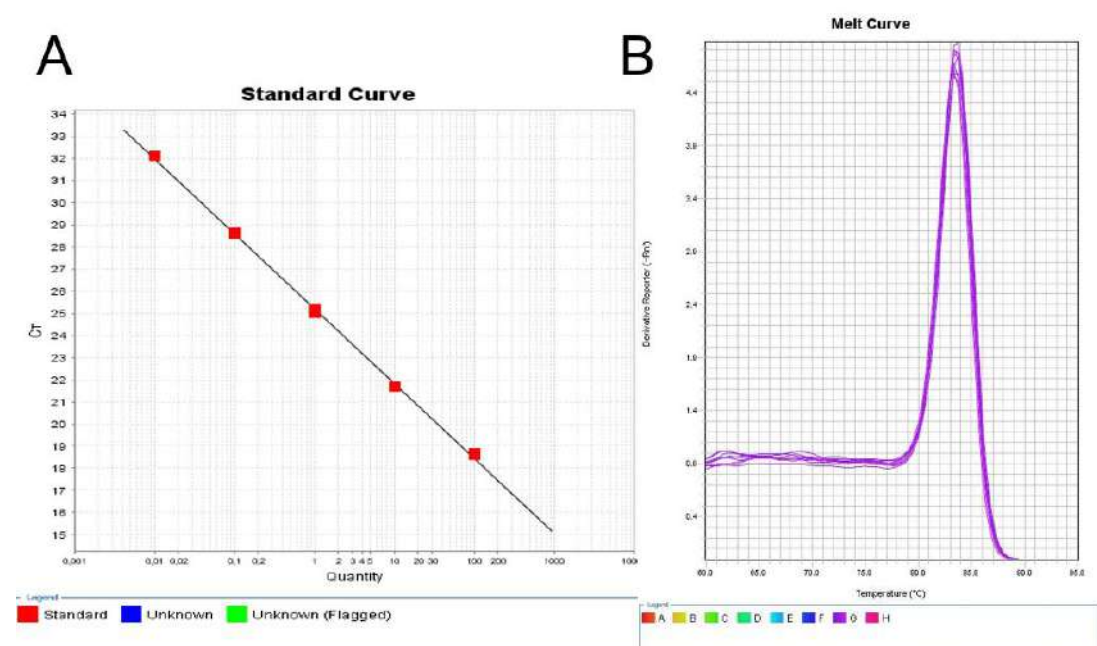


Figura 8. Curva de eficiência do GAPDH. (A) Curva padrão. (B) Curva de melting.

Nossos resultados mostram a eficiência e especificidade dos *primers*, pois apenas um pico foi observado indicando que não houve amplificação de outro transcrito além do analisado. Essa etapa foi essencial para que o controle endógeno pudesse ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa dos genes de interesse. Posteriormente, foi realizada a análise de expressão dos genes de

interesse da monocultura de fibrocondrócitos utilizando como amostra referência o DNA da cartilagem como valor de referência 1. Como esperado, a expressão do COL2A1 apresentou reduzido nível de expressão (Figura 9). Essa redução de expressão é observada após o isolamento dos fibrocondrócitos que iniciam um fenótipo desdiferenciado na ausência de um ambiente tridimensional.

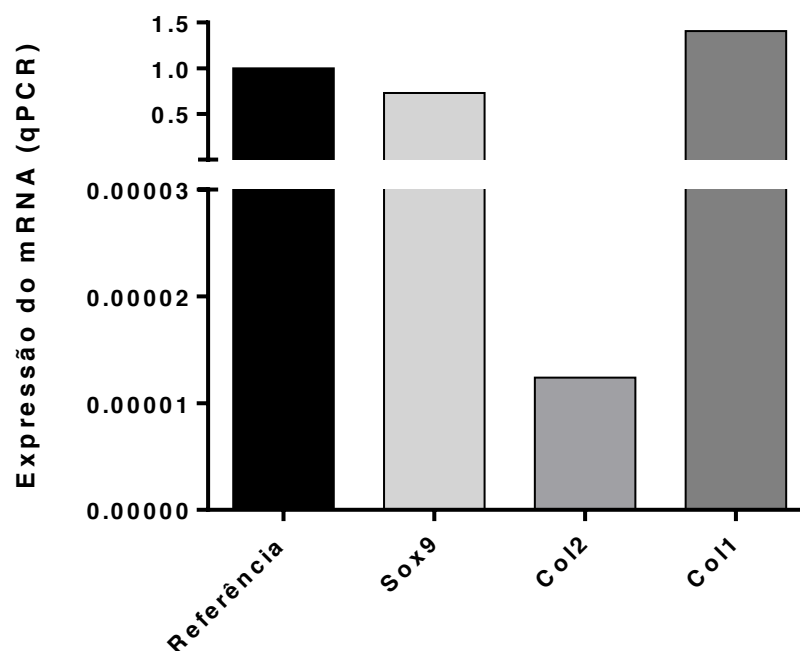


Figura 9. Expressão dos mRNA (qPCR). A expressão relativa dos genes Sox9, colágeno I e II foi avaliada por PCR em tempo real (qPCR) utilizando primers específicos. As mudanças na expressão foram calculadas em relação à expressão na cartilagem.

5.3 Efeito citoprotetor do rLosac em fibrocondrócitos de rato

Neste trabalho, utilizamos rLosac e estudamos o seu efeito na viabilidade celular de fibrocondrócitos tratados em condições normais e pró-inflamatórias (na presença de IL-1 β). A avaliação foi realizada pela contagem de células e pelo método do MTT.

Inicialmente foi realizada a padronização da concentração de IL-1 β e a quantidade de células por ensaio em placa de 96 poços. A concentração de IL-1 β que reduz a viabilidade celular em aproximadamente 50% (50,6 \pm 4,0%) foi de

10ng/mL, em uma monocamada de células contendo 1×10^4 células/poço (Figura 10). A concentração de IL-1 β utilizada em todos os outros ensaios foi de 10ng/mL.

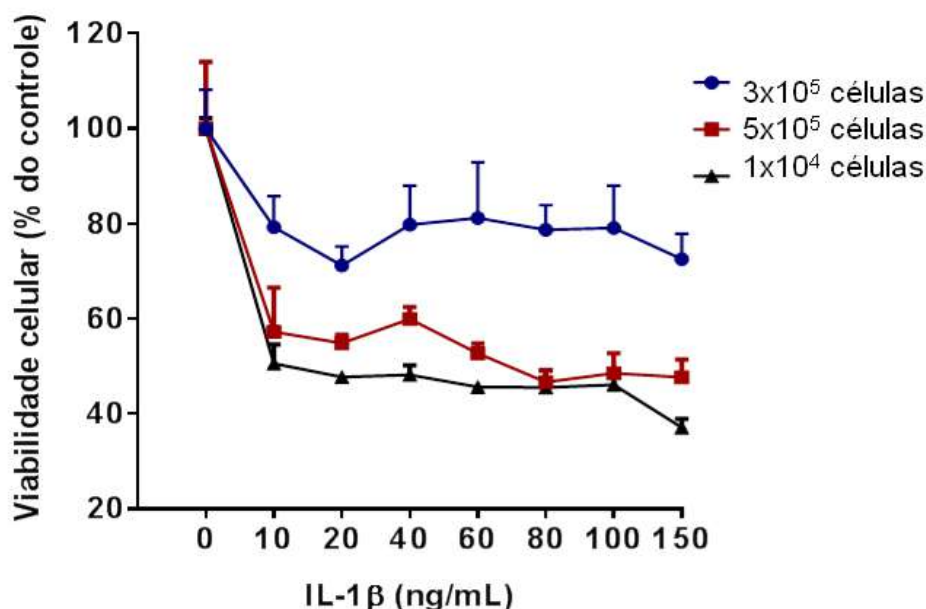


Figura 10. Padronização da concentração de IL-1 β . O controle 100% corresponde às células sem tratamento com IL-1 β .

Os fibrocondrócitos foram tratados com o rLosac em diferentes tempos de tratamento e concentrações na presença ou ausência de 10ng/mL de IL-1 β (Figuras 11 e 12). A viabilidade celular foi avaliada utilizando diferentes concentrações do rLosac (10 a 60nM). O cultivo de fibrocondrócitos subconfluentes em meio suplementado com 10% de SFB mantém as células em proliferação, isto é, há crescimento celular. Células cultivadas na presença de 10% SFB e de diferentes concentrações do rLosac (10 a 60nM) tiveram um aumento do metabolismo mitocondrial em dose-resposta quando comparado ao controle sem tratamento, indicando um possível aumento da proliferação celular induzida pelo rLosac (Figura 11A). A máxima atividade foi obtida com 60nM de proteína após 72h de tratamento. Em condições pró-inflamatórias, na presença de 10ng/mL de IL-1 β onde há 50% de morte celular, o rLosac foi capaz de promover a viabilidade celular (Figura 11B). O efeito foi de dose-resposta e a máxima atividade estatisticamente significativa foi obtida com 60nM de proteína.

A seguir foi estudada a viabilidade celular pela contagem de células utilizando azul de tripan como corante de exclusão. O azul de tripan é incapaz de ingressar em

células viáveis. As células coradas de azul representam as células não viáveis já que o azul de tripan foi capaz de ingressar na célula. Os resultados da figura 12 demonstram um efeito citoprotetor do rLosac em condições de deprivação de soro (Figura 12A) e em condições pró-inflamatórias (Figura 12B) na presença de 10ng/mL de IL-1 β , após 72h de tratamento.

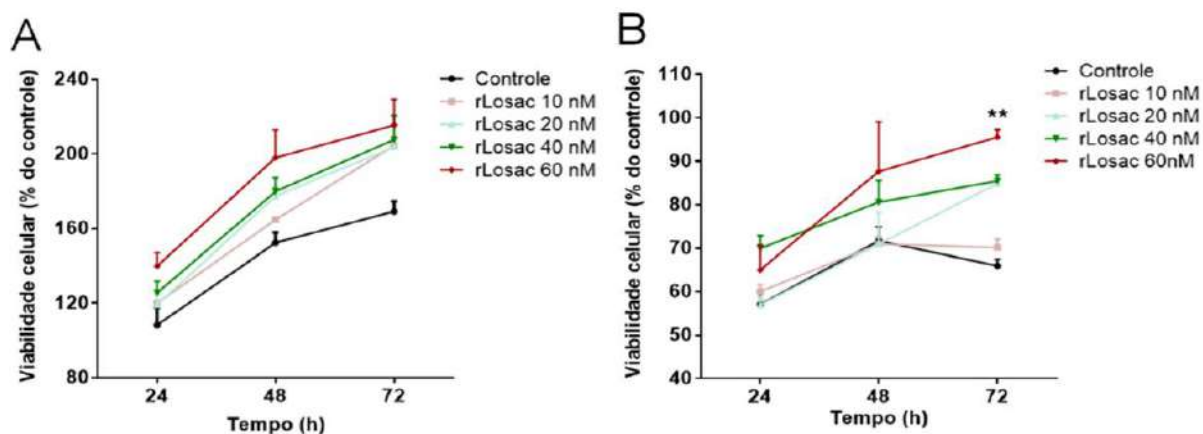


Figura 11. Efeito do rLosac na viabilidade celular pelo método do brometo de dimetilazil difeniltetrazolio. (A) Efeito do rLosac em condições normais de cultivo (10% de SFB). (B) Efeito do rLosac em condições pró-inflamatórias (10% de SFB e 10ng/mL de IL-1 β). Os valores indicam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$.

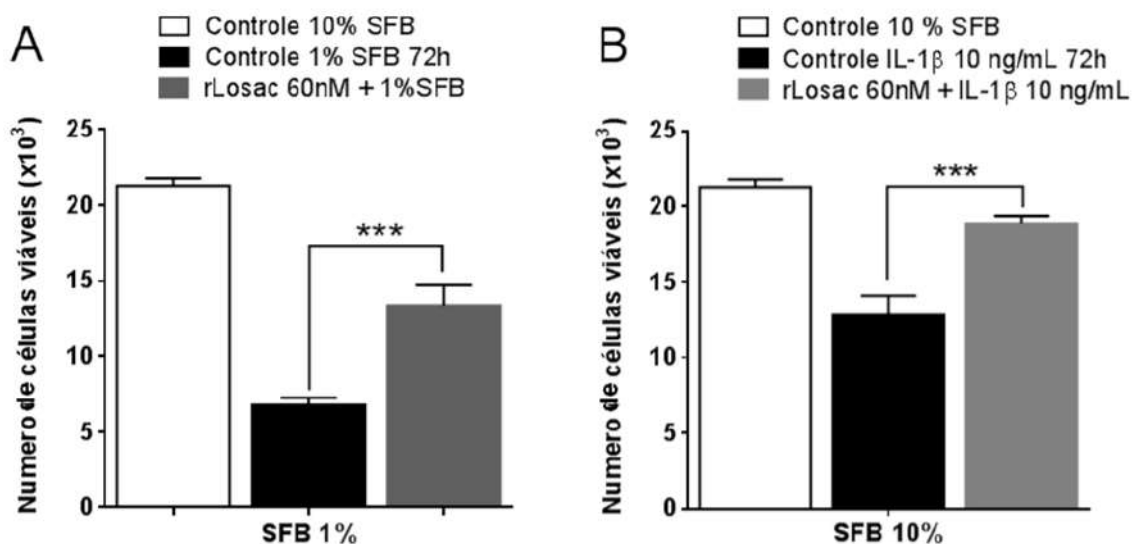


Figura 12. Efeito do rLosac na viabilidade celular pela contagem de células. (A) Morte celular induzida por deprivação de soro. (B) Morte celular induzida pela adição de 10ng/mL de IL-1 β . Os valores indicam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Na figura 13 foi registrado fotograficamente a viabilidade celular após 48h de tratamento com o rLosac. Pode-se observar que o efeito citoprotetor já é evidente nas 48h após o tratamento com o rLosac nessas mesmas condições. Células em deprivação de soro ou na presença de IL-1 β resultaram na alteração da forma alongada dos fibrocondrócitos, além de células descoladas e refringentes, enquanto a monocamada tratada com o rLosac apresenta morfologia típica de fibrocondrócitos de rato.

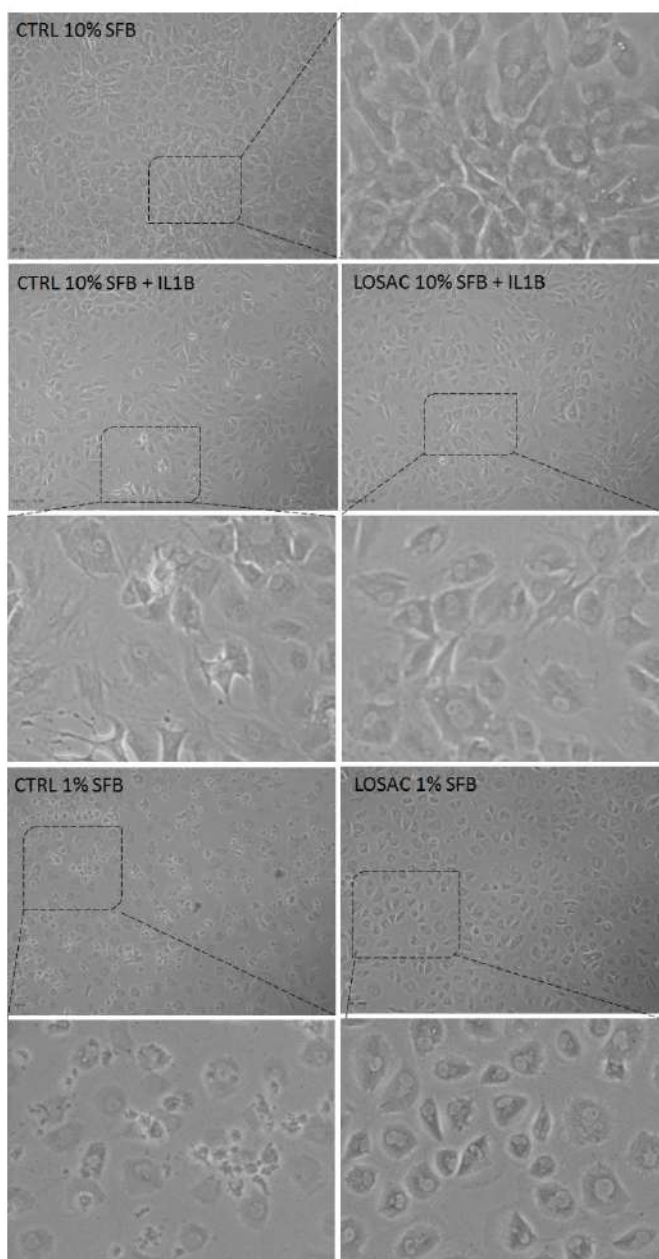


Figura 13. Fotomicrografia de monocamadas de culturas celulares. As culturas celulares foram mantidas em placas de 24 poços contendo $0,8 \times 10^5$ células/poço. As células foram tratadas com 60nM de rLosac em meio DMEM contendo 1% de SFB (deprivação de soro) ou 10% de SFB contendo 10ng/mL de IL-1 β . Após 48h, as células foram fotografadas do microscópio invertido (400X).

5.4 Alterações na distribuição das fases do ciclo celular frente ao tratamento com a rLosac

Avaliamos as fases do ciclo celular em células tratadas por 48h com rLosac 20nM e 40nM, com deprivação de SFB (1%) ou na presença de 10ng/mL de IL-1 β (Figura 14).

A figura 14A mostra as fases do ciclo celular de fibrocondrócitos cultivados em deprivação de soro (1% SFB). Em células permeabilizadas, cuja apoptose foi previamente induzida por deprivação de 1% de SFB, o DNA de baixo peso molecular é marcado com iodeto de propídio (DNA hipodiplóide) e se mostra como de baixa massa molecular (APO). As células mantidas na presença de 1% SFB (indução de apoptose) e tratadas com 60nM do Losac durante 48h mostraram uma redução importante na porcentagem de células hipodiplóides (apoptóticas) quando comparado ao controle não tratado (21,5 \pm 4,9 *versus* 8,1 \pm 1,1** % de células apoptóticas do controle e tratadas com o rLosac, respectivamente, n=3, ** p <0.01 *versus* controle). Além disso, houve uma redução de células na fase G1 (84,3 \pm 6,3 *versus* 71,7 \pm 4,7* % de células em G1 do controle e tratadas com o rLosac, respectivamente, n=3, * p <0.05 *versus* controle) e um aumento da porcentagem de células em fase S (5,4 \pm 2,7 *versus* 17,2 \pm 1,5* % de células na fase S do controle e tratadas com 60nM do rLosac, respectivamente, n=3, ** p <0.05 *versus* controle). Na fase S ocorre a duplicação do DNA, demonstrando que a célula está se preparando para a mitose (fase M).

Por outro lado, nas células cultivadas com IL-1 β e tratadas com 60nM do rLosac pode-se observar que as fases G₂/M do ciclo celular encontram-se aumentadas (6,1 \pm 2,5 *versus* 18,4 \pm 2,5* % de células apoptóticas do controle e tratadas com 60nM do rLosac, respectivamente, n=3, * p <0.05 *versus* controle) (Figura 14B). Na fase G₂/M a célula está preparada para entrar em mitose (fase M).

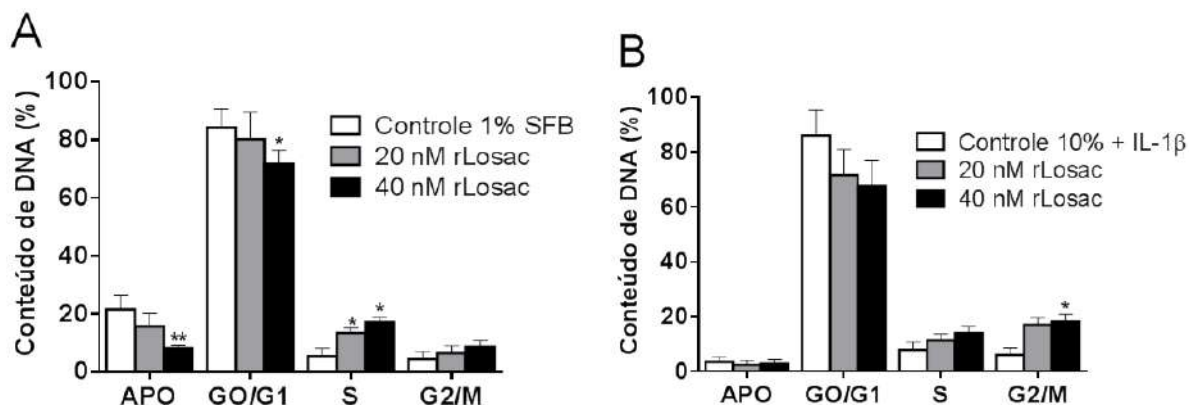


Figura 14. Distribuição das fases do ciclo celular de fibrocondrócitos com deprivação de 1% de SFB (A) ou na presença de IL-1 β (B). Os valores indicam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

5.5 Efeito do rLosac na morte celular por apoptose

Na figura 15A estão representados os histogramas de citometria de fluxo de células marcadas com Anexina V-FITC/PI. Em condições normais de cultivo (10% SFB) pode-se observar que a maioria das células está viável (quadrante inferior esquerdo) enquanto a percentagem de células em apoptose inicial e tardia foi de aproximadamente 2,6%. Na presença de IL-1 β , após 48h de cultivo houve um aumento do número de células em apoptose inicial (8,7 \pm 0,5 %, *** $p < 0.001$) e apoptose tardia (16,6 \pm 1,6%, *** $p < 0.001$) (Figura 15B).

Células cultivadas na presença de IL-1 β foram tratadas com o 60nM de rLosac durante 48h, nessas condições as células apresentaram uma redução significativa no número de célula em apoptose inicial (4,4 \pm 0,4 %, ** $p < 0.01$) e apoptose tardia (5,6 \pm 0,7 %, *** $p < 0.001$).

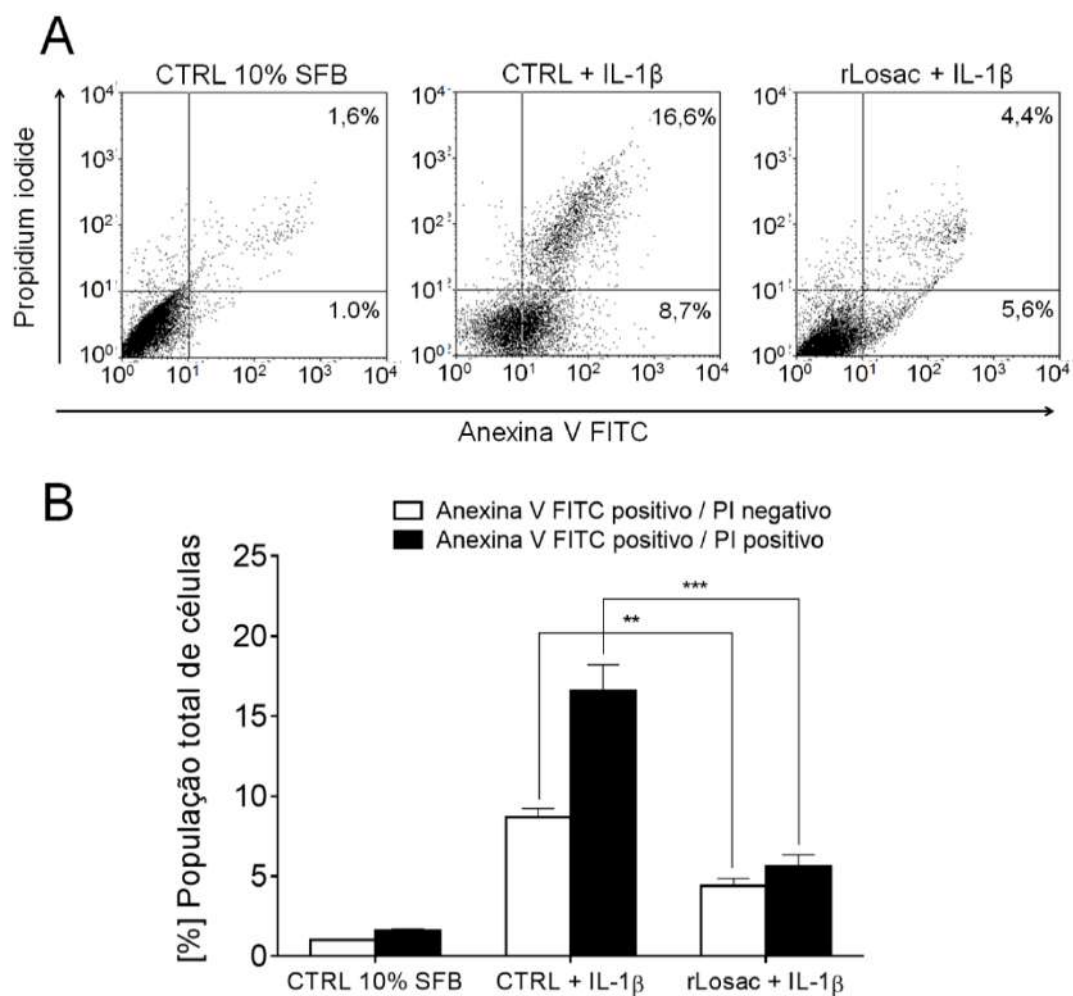


Figura 15. Efeito do rLosac no processo de apoptose de fibrocondrócitos de rato induzido pela IL-1 β . (A) Histograma representativo das taxas de apoptose de cada tratamento. (B) Análise estatística dos diferentes grupos (n=3). Os valores indicam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. ** p <0.01 *** p <0.001.

5.6 Efeito do rLosac na liberação de óxido nítrico

As concentrações de nitrato foram calculadas conforme descrito no item 4.4.5. em “Métodos”. O efeito de 60nM do rLosac na produção de ON foi estudado após estimulação dos fibrocondrócitos por 24 e 48h em condições normais de cultivo (10% SFB) (Figura 16) e na presença de IL-1 β (Figura 17). Após 24h de estímulo com diferentes concentrações do rLosac não houve diferenças significativas entre o controle não tratado e as células tratadas com a proteína (Figura 16A). No entanto, após 48h observou-se uma redução na liberação de ON dependente da concentração do rLosac utilizado (Figura 16B).

Por outro, a liberação de ON também foi avaliada em condições pró-inflamatórias, na presença de 10ng/mL de IL-1 β (Figura 17). Após 24h de estímulo com o rLosac observou-se uma redução na liberação de ON dependente da concentração do Losac utilizado (Figura 17A). No entanto, após 48h não houve diferenças significativas entre o controle não tratado e as células tratadas com a proteína (Figura 17B).

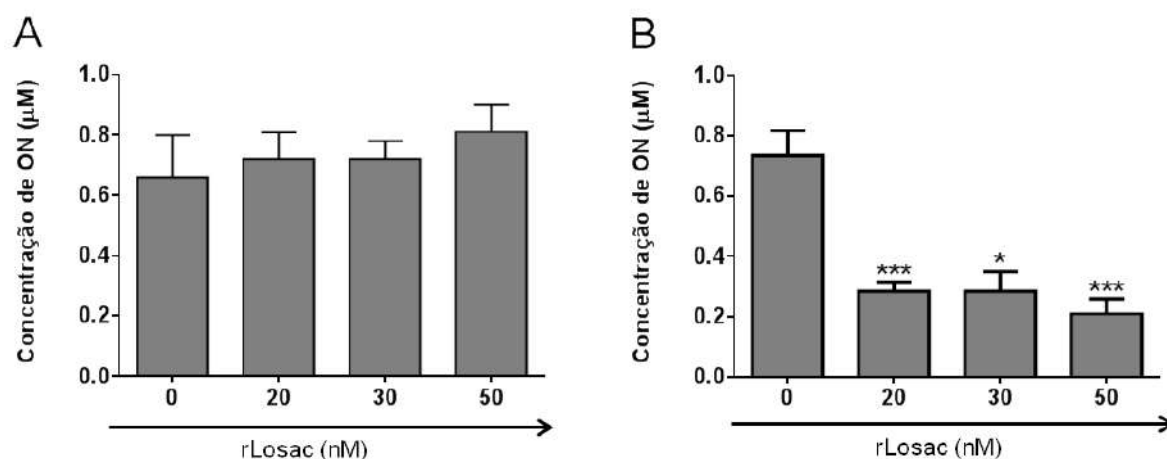


Figura 16. Efeito do rLosac na liberação de óxido nítrico em condições normais de cultivo durante 24h (A) e 48h (B) em meio DMEM contendo 10% SFB na ausência (controle negativo) ou presença do rLosac. Os valores indicam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

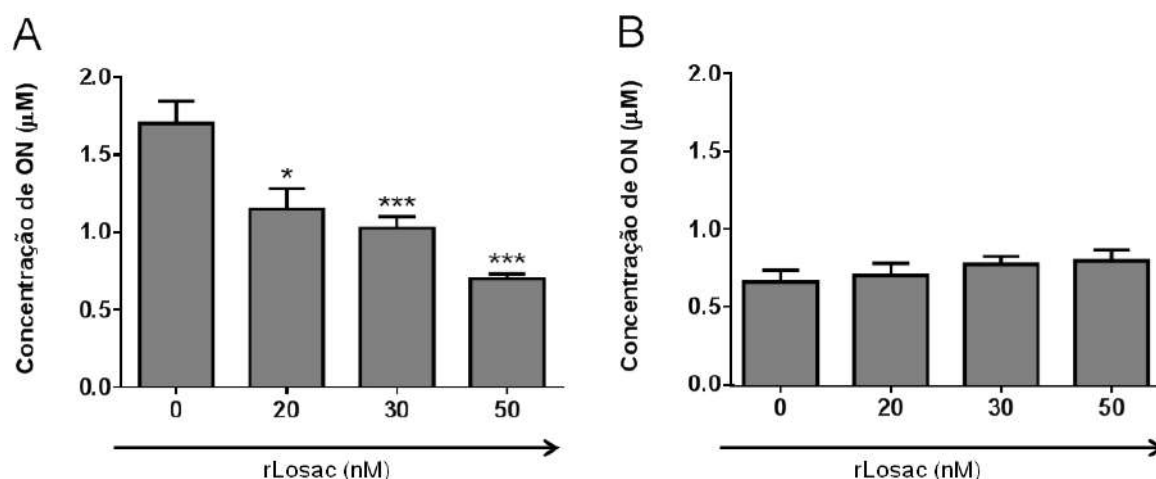


Figura 17. Efeito do rLosac na liberação de óxido nítrico em condições pró-inflamatórias durante 24h (A) e 48h (B) em meio DMEM contendo 10% SFB e 10ng/mL de IL-1 β , na ausência (controle negativo) ou presença do rLosac. Os valores indicam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

5.7 Efeito do rLosac na liberação de metaloproteinases por zimografia

Na figura 18 foi observada a redução da atividade das MMPs-2 e 9, após 48h de tratamento das células com o rLosac (60nM) com ou sem a adição de 10ng/mL de IL-1 β . Após 72h, este efeito foi mais evidente (Figura 18C). Foram utilizados padrões de MMPs-2 e 9 como controle de massa molecular e atividade.

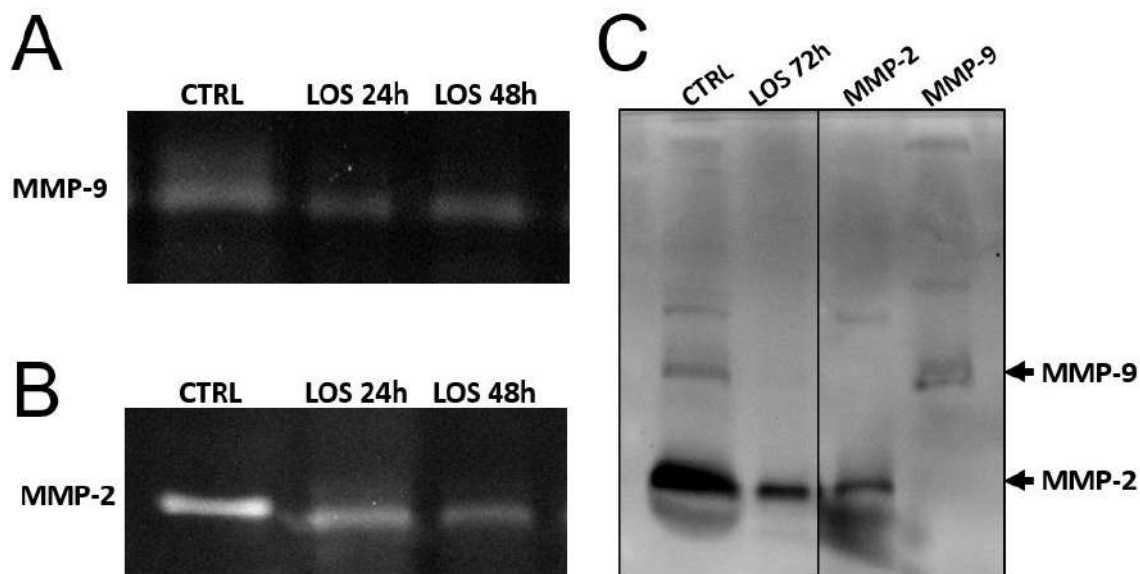


Figura 18. Imagens de géis de zimografia de gelatina. Foram utilizados 30 μ l dos sobrenadantes de fibrocondrócitos tratados na ausência (controle, CTRL) ou na presença de rLosac com ou sem 10ng/mL de IL-1 β durante 24, 48 e 72h.

5.8 Efeito do rLosac na expressão de moléculas da matriz extracelular

Avaliamos por imunocitoquímica e Western blot o efeito do rLosac na expressão protéica de algumas moléculas presentes na MEC tais como COL2A1, fibronectina e laminina em culturas de fibrocondrócitos na presença de IL-1 β . Inicialmente, realizamos uma avaliação por imunocitoquímica, utilizando anticorpos específicos para cada uma das moléculas de MEC estudadas. Foi verificado que fibrocondrócitos tratados com 10ng/mL de IL-1 β apresentam uma marcação baixa de COL2A1 enquanto que na presença da proteína rLosac (60nM) apresentaram maior marcação após 72h de tratamento (Figura 19). Resultado similar foi observado por microscopia de fluorescência para as moléculas fibronectina (Figura 20) e laminina (Figura 21). A análise de Western blot dos extratos celulares permitiu quantificar e corroborar essas diferenças na concentração protéica das três proteínas (Figura 22).

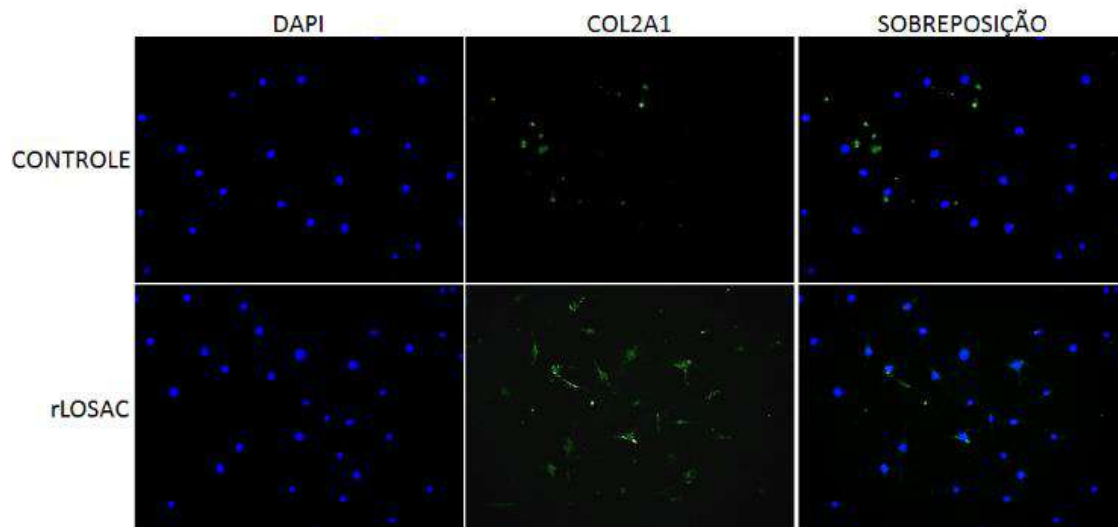


Figura 19. Imunocitoquímica de fibrocondrócitos marcados com anticorpo anti-colágeno do tipo II. Fibrocondrócitos em monocamada foram tratados durante 72h com o rLosac (60nM) na presença de 10ng/mL de IL-1 β , fixados e marcados com o anticorpo anti-Col2A1. Micrografias foram obtidas em microscópio de fluorescência Axio Scope A.1 (Carl Zeiss, Germany).

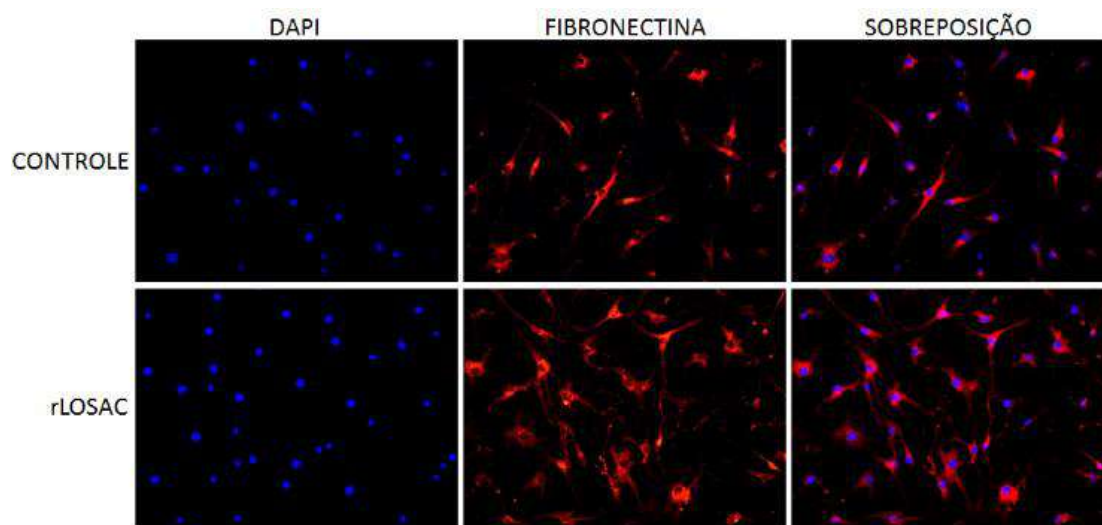


Figura 20. Imunocitoquímica de fibrocondrócitos marcados com anticorpo anti-fibronectina. Fibrocondrócitos em monocamada foram tratados durante 72h com o rLosac (60nM) na presença de 10ng/mL de IL-1 β , fixados e marcados com o anticorpo anti-fibronectina (marcação vermelha) e DAPI (marcador azul de núcleo). Micrografias foram obtidas em microscópio de fluorescência Axio Scope A.1 (Carl Zeiss, Germany).

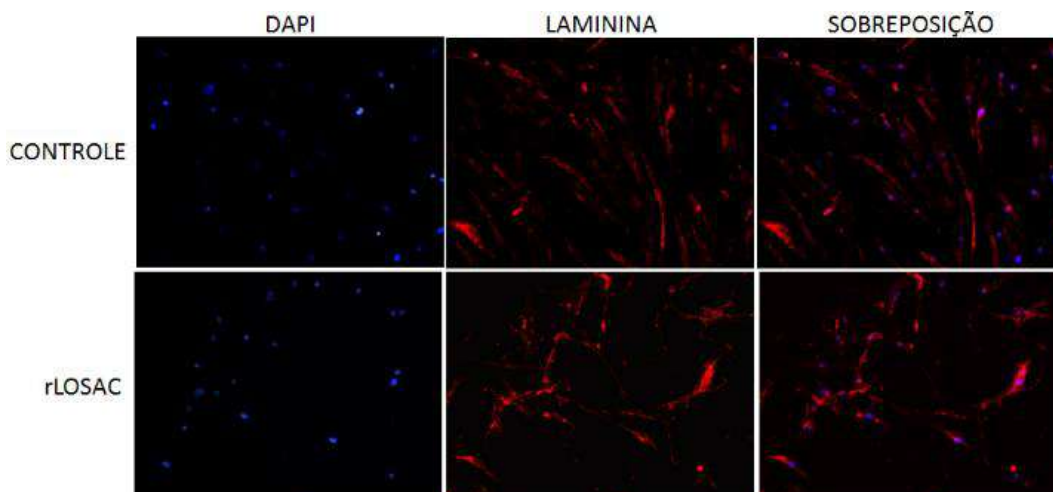


Figura 21. Imunocitoquímica de fibrocondrócitos marcados com anticorpo anti-laminina. Fibrocondrócitos em monocamada foram tratados durante 72h com o rLosac (60nM) na presença de 10ng/mL de IL-1 β fixados e marcados com o anticorpo anti-laminina (marcação vermelha) e DAPI (marcador azul de núcleo). Micrografias foram obtidas em microscópio de fluorescência Axio Scope A.1 (Carl Zeiss, Germany).

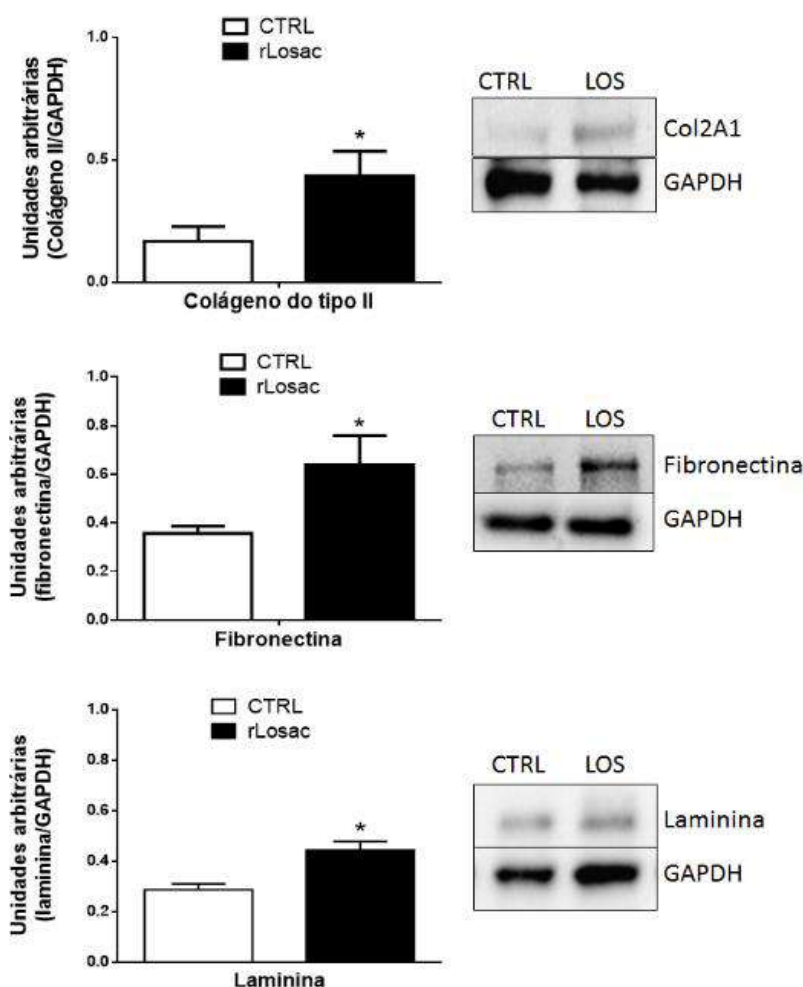


Figura 22. Análise das moléculas de matriz extracelular dos extratos celulares por Western blot. Efeito do rLosac (60nM) na expressão de moléculas de matriz extracelular após tratamento de 72h em meio DMEM contendo 10% de SFB e 10ng/mL de IL-1 β . Os valores indicam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. * p <0.05.

6 DISCUSSÃO

As doenças osteoartísticas são doenças crônicas degenerativas que afetam as articulações de um modo geral, afetando a qualidade de vida dos pacientes (Martel-Pelletier *et al.*, 2008). Na fisiopatologia, a cartilagem articular provavelmente é a estrutura aonde observamos as maiores alterações com o desbalanço da homeostase articular e produção das citocinas inflamatórias (Akkiraju e Nohe, 2015). Entretanto outras estruturas intra-articulares estão envolvidas no processo degenerativo, motivo pelo qual avaliamos o possível efeito condroprotetor do rLosac em culturas de fibrocondrócitos oriundas de meniscos de ratos que foram estimuladas com IL-1 β . Stone *et al.* (2014) mostraram que os meniscos podem ter um papel ativo no desenvolvimento da OA após lesão na articulação, com aumento da produção de citocinas, quimioquinas e enzimas de degradação da matriz. Outros estudos mostraram que as células meniscais, apesar de apresentarem menor rigidez articular quando comparada aos condrócitos articulares, quando eram expostas a sobrecargas, apresentavam reparação tecidual e ativavam as vias pró-inflamatórias (Sanchez-Adams e Athanasiou, 2012; McNulty e Guilak, 2015; Khan *et al.* 2016). Dessa forma optamos em estudar as culturas de fibrocondrócitos oriundas dos meniscos de ratos por acreditar que no processo degenerativo, as células meniscais também podem desempenhar papel importante, corroborando os conceitos atuais da OA (Sharma, 2016).

Embora a OA seja caracterizada como uma doença do envelhecimento devido à senescência celular, degeneração articular e pelo desgaste por sobrecarga, atualmente é definida como uma doença que apresenta insuficiência articular ocasionada pelo estresse celular e uma atividade inflamatória intensa associada a fatores predisponentes (Rezende *et al.*, 2013). Apresenta evolução variável, sendo que a sua história natural não está completamente compreendida (Bastick *et al.*, 2015). Vários fenótipos da doença devem ser estudados, o que em parte pode explicar a evolução diferente entre os pacientes (Arden *et al.*, 2015).

No processo de OA são produzidos mediadores pró-inflamatórios e degeneração da cartilagem (Kapoor *et al.*, 2011). O controle da degradação da MEC é crucial para o desenvolvimento de doenças artríticas como a OA e a artrite reumatoide (O'Sullivan *et al.*, 2011; Akkiraju e Nohe, 2015). Não há cura para a OA

do joelho e o tratamento objetiva diminuir a dor, prevenir deformidades articulares, melhorar a função articular e retardar o processo degenerativo (Chevalier, 2010; Fibel *et al.*, 2015; Ham *et al.*, 2015). São utilizados desde analgésicos até tratamentos fitoterápicos. No entanto, a maioria dos tratamentos somente alivia a dor ou retarda o processo de degeneração articular. Quando o tratamento conservador falha e nos casos mais avançados de comprometimento articular, é oferecido ao paciente o tratamento cirúrgico que engloba vários procedimentos desde o debridamento articular, osteotomias visando à correção dos desvios articulares e as artroplastias com a substituição da articulação proporcionando uma melhora da qualidade de vida com o alívio da dor e melhora da função articular (Camanho, 2001; London *et al.*, 2011; Camanho *et al.*, 2011; Fibel *et al.*, 2015).

Entre as drogas que são utilizadas no tratamento de OA destacamos as DMDOAs. Mesmo não havendo consenso na literatura em relação à utilização das DMDOAs, elas são capazes de reverter, estabilizar ou pelo menos retardar o progresso da OA (Richette e Bardin, 2004). Entre as drogas disponíveis destacamos a diacereína que é derivado da antraquinona, apresentando a reína como metabólito ativo. Apresenta como ação principal inibir a IL-1 β (ação anti-inflamatória), pró-anabólica e anticatabólica, fornecendo efeito na cartilagem, membrana sinovial e no osso subcondral (Pavelka *et al.*, 2016). O GS é constituinte natural dos GAGs da MEC e do líquido sinovial. O seu efeito é atribuído na regulação da expressão de mediadores inflamatórios. Em estudos *in vitro*, reduz PGE2 e inibe a via de sinalização celular NF- κ B (Bruyère *et al.*, 2016). A condroitina pertence à família dos polissacarídeos (GAGS). É encontrada na cartilagem humana, ossos, córnea, pele e na parede dos vasos sanguíneos. O seu mecanismo de ação está relacionado com a restauração dos componentes da MEC da cartilagem e síntese de colágeno (Singh *et al.*, 2015; Hochberg *et al.*, 2016). A associação do GS e condroitina mostrou resultados positivos quando comparado à utilização de anti-inflamatórios após o sexto mês de tratamento (Hochberg *et al.*, 2016). O AH é um polissacarídeo de alta viscosidade produzido pelas células β da membrana sinovial propiciando uma ação mecânica, analgésica, anti-inflamatória e efeito condroprotetor (Rezende, Campos, 2012; Rezende *et al.*, 2013). Observamos que as DMDOAs têm em comum a ação anti-inflamatória e a possibilidade de agir regulando a expressão das moléculas da MEC.

Fica clara então a necessidade de desenvolver novos tratamentos que além de retardar o processo de degeneração articular estimulem a produção de nova cartilagem, diminuam a inflamação e melhorem a qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, a proteína rLosac, proveniente da taturana *Lonomia obliqua* é um bom candidato para o estudo de doenças degenerativas.

Bosch *et al.* (2016) reportaram que a rLosac é capaz de induzir a sobrevivência celular em fibroblastos deprivados de soro, além de reduzir a perda da MEC decorrente da morte celular. O mecanismo de sobrevivência celular em fibroblastos provavelmente está associado com as mudanças no ciclo celular induzidas pelo rLosac, estimulando a fase de síntese de DNA, mitose e a diminuição de caspase-3, um conhecido efetor da apoptose. Similar ao observado em fibroblastos (Bosch *et al.*, 2016), neste trabalho foi observado que em fibrocondrócitos (fibroblatos diferenciados) de rato, que o rLosac induz o efeito citoprotetor em condições de deprivação de soro e na presença da IL-1 β mensuradas pelo método do MTT e contagem de células (Figuras 11 e 12). Optamos pelo método do MTT porque avalia a viabilidade celular a nível mitocondrial permitindo uma análise quantitativa e por apresentar uma resposta confiável. Para complementar a análise de viabilidade celular, acrescentamos o método de contagem de células que utiliza o azul de tripan para verificar as células viáveis. Dessa forma foram utilizados dois métodos, que quando são usados em conjunto nos mostram que o rLosac induz o efeito citoprotetor.

Os estudos de ciclo celular e apoptose por citometria de fluxo confirmam que o rLosac é capaz de evitar morte celular induzida pela IL-1 β .

A avaliação do ciclo celular nos permite observar a presença de células com conteúdos anormais de DNA nas diferentes fases do ciclo celular. A apoptose é um tipo de morte celular programada que remove células não desejadas e mantém a homeostase tecidual sem provocar processo inflamatório (Vermees *et al.*, 1995). Ambos os métodos foram avaliados por citometria de fluxo. Em células permeabilizadas, cuja apoptose foi previamente induzida por deprivação de 1% de SFB, o DNA de baixo peso molecular é marcado com iodeto de propídio (DNA hipodiplóide) e se mostra como de APO. As células mantidas na presença de 1% SFB (indução de apoptose) e tratadas com 60nM do Losac durante 48h mostraram uma redução importante na porcentagem de células hipodiplóides (apoptóticas)

quando comparado ao controle não tratado (** $p < 0.01$). Além disso, houve uma redução de células na fase G1 (* $p < 0.05$) e um aumento da porcentagem de células em fase S (** $p < 0.01$). Na fase S ocorre a duplicação do DNA, demonstrando que a célula está se preparando para a mitose (Fase M). Esses dados estão em concordância com o efeito citoprotetor observado em outros tipos celulares tais como HUVECs, fibroblastos e neurônios (Alvarez Flores *et al.*, 2006; Alvarez Flores *et al.*, 2012; Bosch *et al.*, 2016). Alguns agentes farmacológicos como as DMDOAs, utilizados atualmente são capazes de aumentar a sobrevivência celular dos condrócitos pela inibição da apoptose como, por exemplo, a injeção intra-articular de AH em um modelo contusional de OA, foi capaz de reduzir a taxa de apoptose (Barreto *et al.*, 2015).

É conhecido que a sobrevivência celular é mantida por fatores de crescimento e pelo contato com a MEC (Kim *et al.*, 2011). Os condrócitos de pacientes com OA são caracterizados pela perda e degradação dos componentes da MEC, mediada por vários fatores, tais como a produção de MMPs que clivam os componentes da MEC, especialmente o colágeno, e a produção de mediadores pró-inflamatórios que desencadeiam uma série de eventos que levam a mudanças na forma celular que induzem a morte celular através da ativação de caspase-3, inibição da via de sinalização ERK1/2 MAPK e fosforilação da p38 MAPK (Akkiraju, Nohe, 2015). Um resultado que merece destaque foi a presença de maiores quantidades de COL2A1 em fibrocondrócitos de rato após tratamento com o rLosac (Figuras 19 e 22). Esse efeito é muito interessante já que a maioria de doenças associadas com cartilagem (Por exemplo, OA) são caracterizadas pela perda e degradação dos componentes da MEC, especialmente perdem a capacidade de produzir COL2A1 associado com a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Lahm *et al.*, 2010; Baum, Duffy, 2011). Além disso, observamos uma redução da MMP-2 e da MMP-9 após tratamento dos fibrocondrócitos com o rLosac, indicando que essa proteína é capaz de reduzir a degradação da MEC (Figura 16 e 17). A importância das MMPs na patogênese de inúmeras doenças tem despertado a atenção de muitos grupos de pesquisa. As MMPs são enzimas proteolíticas envolvidas principalmente na degradação do COL2A1 na cartilagem articular (Martel-Pelletier *et al.*, 2001). As MMP-2 e 9 são denominadas colagenases e digerem principalmente o colágeno tipo 1, 2 e 3, além de quebrar a fibronectina. Outras MMPs importantes que interferem na fisiopatologia

da OA, destacamos as estromelisininas (3 e 10) que interferem na síntese de ACAN. A análise das MMPs foi feita por zimografia que consiste em um método sensível para medida da atividade enzimática após uma separação eletroforética. O princípio físico-químico da eletroforese permite a separação das proteínas, e a atividade enzimática é determinada pelo nível de degradação do substrato normalmente copolimerizado no mesmo gel de corrida. Após a corrida eletroforética e incubação, o gel com gelatina é corado com azul de Coomassie, permitindo a revelação das bandas. A diminuição ou eventual desaparecimento de cor nas bandas do gel está relacionado com a quantidade de gelatina (substrato) degradada na reação de proteólise. Esse método é amplamente utilizado para procura de enzimas que degradam a MEC, em especial, MMPs de MEC (Cortial *et al.*, 2006). Assim, nossos resultados coletivamente sugerem que o efeito citoprotetor do rLosac está favorecendo a preservação das proteínas de MEC, evitando a degradação pela redução de MMPs, mesmo em situação de estresse evidenciado após 48 e 72h de tratamento com rLosac (Figura 18).

Além de estudar a capacidade protetora do rLosac sobre a morte celular de fibrocondrócitos, nosso interesse neste trabalho foi também estudar o efeito do rLosac na liberação de ON, uma molécula envolvida no processo inflamatório induzido pela IL-1 β (Kapoor *et al.*, 2011). Além de estimular a liberação de ON, a IL-1 β estimula a produção de mediadores pró-inflamatórios implicados na patologia osteoartrítica. Nossos resultados demonstram que a liberação do ON foi reduzida de forma significativa após estímulo dos fibrocondrócitos com o rLosac (Figuras 16 e 17). Vários estudos mostram que o ON contribui com a inflamação e destruição articular pelo aumento da ativação e produção de MMPs, inibindo a síntese de macromoléculas tais como colágeno e proteoglicano, atuando como oxidante celular e promovendo a apoptose de condrócitos (Akhtar *et al.*, 2011; Kapoor *et al.*, 2011).

O conjunto de dados obtidos neste estudo permite concluir que o rLosac é capaz de induzir proliferação celular de fibrocondrócitos e evitar a morte celular induzida por deprivação de soro ou pela presença de IL-1 β , modulando o ciclo celular e aumentando a sobrevivência celular, reduzindo a liberação de ON e a atividade das MMPs 2 e 9, além de induzir a expressão e preservação da MEC.

Nossa perspectiva é dar continuidade ao estudo realizando análise do perfil inflamatório de moléculas tais como IL-6 e IL-8, e do AH, e avaliar *in vitro* o

tratamento das células com o rLosac por até 21 dias, ampliando os tempos estudados neste trabalho que foram de 24, 48 e 72h. E nessa perspectiva também, analizaremos a expressão gênica das proteínas pró-inflamatórias, MMPs, e componentes da MEC.

Além disso, nosso interesse também é o estudo da molécula em modelos *in vivo*, em modelo de OA, com a aplicação de um veículo que permita manter a estabilidade da proteína. As limitações de um estudo experimental com células *in vitro* estão relacionadas com o fato de não reproduzirem totalmente o ambiente articular modificado pelo processo de degeneração articular. Entretanto, observamos neste modelo *in vitro* alterações que são observadas desde o início do processo de OA que podem ajudar no desenvolvimento e descoberta de novas sinalizações intracelulares que serão úteis no desenvolvimento de novas terapias.

7 CONCLUSÃO

O rLosac é capaz de induzir proliferação celular de fibrocondrócitos e evitar a morte celular induzida por deprivação de soro ou pela presença de IL-1 β , modulando o ciclo celular e aumentando a sobrevivência celular, reduzindo a liberação de óxido nítrico e a atividade das metaloproteinases 2 e 9, além de induzir a expressão e preservação da matriz extracelular.

8 REFERÊNCIAS

- Akhtar N, Miller MJ, Haqqi TM. Effect of a Herbal-Leucine mix on the IL-1 β -induced cartilage degradation and inflammatory gene expression in human chondrocytes. *BMC Complement Altern Med*. 2011;11:66.
- Akkiraju H, Nohe A. Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. *J Dev Biol*. 2015;3(4):177-192.
- Alvarez Flores MP, Fritzen M, Reis CV, Chudzinski-Tavassi AM. Losac, a factor X activator from *Lonomia obliqua* bristle extract: its role in the pathophysiological mechanisms and cell survival. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(4):1216-23.
- Alvarez Flores MP, Furlin D, Ramos OH, Balan A, Konno K, Chudzinski-Tavassi AM. Losac, the first hemolin that exhibits procogulant activity through selective factor X proteolytic activation. *J Biol Chem*. 2011;286(9):6918-28.
- Alvarez Flores MP, Remuzgo CM, Cury Y, Bosch RV, Vaz-De-Lima BB, Maria DA, et al. Mechanisms Implicated In Cell Proliferation and Cell Survival Induced By Recombinant Losac, A Cell Adhesion Molecule From *Lonomia obliqua* [abstract]. *Toxicon*. 2012; 60(2012):142-3.
- Alvarez Flores MP, Zannin M, Chudzinski-Tavassi AM. New insight into the mechanism of *Lonomia obliqua* envenoming: toxin involvement and molecular approach. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2010;37(1):1-16. Review.
- Alvarez-Garcia O, Rogers NH, Smith RG, Lotz MK. Palmitate has proapoptotic and proinflammatory effects on articular cartilage and synergizes with interleukin-1. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(7):1779-88.
- Antonioli E, Piccinato CA, Nader HB, Cohen M, Goldberg AC, Ferretti M. Modulation of Hyaluronan Synthesis by the Interaction between Mesenchymal Stem Cells and Osteoarthritic Chondrocytes. *Stem Cells Int*. 2015;2015:640218.
- Arden N, Richette P, Cooper C, Bruyère O, Abadie E, Branco J, et al. Can we identify patients with high risk of osteoarthritis progression who will respond to treatment? a focus on biomarkers and frailty. *Drugs Aging*. 2015;32(7):525-35. Review.
- Attur M, Krasnokutsky-Samuels S, Samuels J, Abramson SB. Prognostic biomarkers in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(1):136-44. Review.
- Bannuru RR, Natov NS, Dasi UR, Schmid CH, McAlindon TE. Therapeutic trajectory following intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis--meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(6):611-9. Review.
- Barreto RB, Sadigursky D, de Rezende MU, Hernandez AJ. Effect of hyaluronic acid on chondrocyte apoptosis. *Acta Ortop Bras*. 2015;23(2):90-3.

Bastick AN, Runhaar J, Belo JN, Bierma-Zeinstra SM. Prognostic factors for progression of clinical osteoarthritis of the knee: a systematic review of observational studies. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:152. Review.

Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(4):376-9. Review.

Bosch RV, Alvarez Flores MP, Maria DA, Chudzinski-Tavassi AM. Hemolin triggers cell survival on fibroblasts in response to serum deprivation by inhibition of apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 2016;82:537-46.

Bruyère O, Altman RD, Reginster JY. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;45(4 Suppl):S12-7.

Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(5):645-57. Review.

Burgos-Vargas R, Cardiel MH, Loyola-Sánchez A, De Abreu MM, Pons-Estel BA, Rossignol M, et al. Characterization of knee osteoarthritis in Latin America. A comparative analysis of clinical and health care utilization in Argentina, Brazil, and Mexico. *Reumatol Clin*. 2014;10(3):152-9.

Camanho GL, Imamura M, Arendt-Nielsen L. Genesis of pain in arthrosis. *Rev Bras Ortop*. 2011;46(1):14-7.

Camanho GL. Tratamento da osteoartrose do joelho. *Rev Bras Ortop*. 2001;36(5):135-40.

Chen C, Xie J, Rajappa R, Deng L, Fredberg J, Yang L. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α increase stiffness and impair contractile function of articular chondrocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2015;47(2):121-9.

Chevalier X. Intraarticular treatments for osteoarthritis: new perspectives. *Curr Drug Targets*. 2010;11(5):546-60. Review.

Chiusaroli R, Piepoli T, Zanelli T, Ballanti P, Lanza M, Rovati LC, et al. Experimental pharmacology of glucosamine sulfate. *Int J Rheumatol*. 2011;2011:939265.

Cooper C, Adachi JD, Bardin T, Berenbaum F, Flamion B, Jonsson H, et al. How to define responders in osteoarthritis. *Curr Med Res Opin*. 2013;29(6):719-29. Review.

Cortial D, Gouttenoire J, Rousseau CF, Ronzière MC, Piccardi N, Msika P, et al. Activation by IL-1 of bovine articular chondrocytes in culture within a 3D collagen-based scaffold. An in vitro model to address the effect of compounds with therapeutic potential in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(7):631-40.

Deschner J, Wypasek E, Ferretti M, Rath B, Anghelina M, Agarwal S. Regulation of RANKL by biomechanical loading in fibrochondrocytes of meniscus. *J Biomech*. 2006;39(10):1796-803.

Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:235-76. Review.

El-Bikai R, Welman M, Margaron Y, Côté JF, Macqueen L, Buschmann MD, et al. Perturbation of adhesion molecule-mediated chondrocyte-matrix interactions by 4-hydroxynonenal binding: implication in osteoarthritis pathogenesis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):R201.

Ferretti M, Gassner R, Wang Z, Perera P, Deschner J, Sowa G, et al. Biomechanical signals suppress proinflammatory responses in cartilage: early events in experimental antigen-induced arthritis. *J Immunol.* 2006;177(12):8757-66.

Ferretti M, Madhavan S, Deschner J, Rath-Deschner B, Wypasek E, Agarwal S. Dynamic biophysical strain modulates proinflammatory gene induction in meniscal fibrochondrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(6):C1610-5.

Fibel KH, Hillstrom HJ, Halpern BC. State-of-the-Art management of knee osteoarthritis. *World J Clin Cases.* 2015;3(2):89-101. Review.

Ham O, Lee CY, Kim R, Lee J, Oh S, Lee MY, et al. Therapeutic potential of differentiated mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Int J Mol Sci.* 2015;16(7):14961-78. Review.

Hochberg MC, Martel-Pelletier J, Monfort J, Möller I, Castillo JR, Arden N, Berenbaum F, Blanco FJ, Conaghan PG, Doménech G, Henrotin Y, Pap T, Richette P, Sawitzke A, du Souich P, Pelletier JP; MOVES Investigation Group. Combined chondroitin sulfate and glucosamine for painful knee osteoarthritis: a multicentre, randomised, double-blind, non-inferiority trial versus celecoxib. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(1):37-44.

Imamura M, Ezquerro F, Marcon Alfieri F, Vilas Boas L, Tozetto-Mendoza TR, Chen J, et al. Serum levels of proinflammatory cytokines in painful knee osteoarthritis and sensitization. *Int J Inflam.* 2015;2015:329792.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população do Brasil por sexo e idade: 1980-2050 – revisão 2008 [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; c2008 [citado 2016 Sep 23]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/

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. Review.

Khan HI, Aitken D, Ding C, Blizzard L, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, et al. Natural history and clinical significance of meniscal tears over 8 years in a midlife cohort. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016;17:4.

Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 2011;209(2):139-51. Review.

Kongtharvonskul J, Anothaisintawee T, McEvoy M, Attia J, Woratanarat P, Thakkinstian A. Efficacy and safety of glucosamine, diacerein, and NSAIDs in osteoarthritis knee: a systematic review and network meta-analysis. *Eur J Med Res.* 2015;20:24. Review.

Kotlarz H, Gunnarsson CL, Fang H, Rizzo JA. Insurer and out-of-pocket costs of osteoarthritis in the US: evidence from national survey data. *Arthritis Rheum.* 2009;60(12):3546-53.

Kulkarni P, Koppikar S, Deshpande S, Wagh N, Harsulkar A. Meniscal tear as potential steering factor for inflammation may aggravate arthritis: two case reports. *J Med Case Rep.* 2014;8:137.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

Lahm A, Mrosek E, Spank H, Erggelet C, Kasch R, Esser J, et al. Changes in content and synthesis of collagen types and proteoglycans in osteoarthritis of the knee joint and comparison of quantitative analysis with photoshop-based image analysis. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2010;130(4):557-64.

Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, Gabriel S, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Jordan JM, Katz JN, Kremers HM, Wolfe F; National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum.* 2008;58(1):26-35.

London NJ, Miller LE, Block JE. Clinical and economic consequences of the treatment gap in knee osteoarthritis management. *Med Hypotheses.* 2011;76(6):887-92.

Lotz M, Martel-Pelletier J, Christiansen C, Brandi ML, Bruyère O, Chapurlat R, et al. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(11):1756-63. Review.

Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(2):351-84. Review.

Martel-Pelletier J, Welsch DJ, Pelletier JP. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001;15(5):805-29. Review.

McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(3):363-88.

McNulty AL, Guilak F. Mechanobiology of the meniscus. *J Biomech*. 2015;48(8):1469-78. Review.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

O'Sullivan J, D'Arcy S, Barry FP, Murphy JM, Coleman CM. Mesenchymal chondroprogenitor cell origin and therapeutic potential. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(1):8. Review.

Pavelka K, Bruyère O, Cooper C, Kanis JA, Leeb BF, Maheu E, et al. Diacerein: benefits, risks and place in the management of osteoarthritis. An opinion-based report from the ESCEO. *Drugs Aging*. 2016;33(2):75-85.

Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E. The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19(11):1270-85. Review.

Puig-Junoy J, Ruiz Zamora A. Socio-economic costs of osteoarthritis: a systematic review of cost-of-illness studies. *Semin Arthritis Rheum*. 2015;44(5):531-41. Review. Reginster JY, Neuprez A, Lecart MP, Sarlet N, Bruyere O. Role of glucosamine in the treatment for osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2012;32(10):2959-67. Review.

Rezende MU, de Campos GC, Pailo AF. Current concepts in osteoarthritis. *Acta Ortop Bras*. 2013;21(2):120-2.

Rezende MU, de Campos GC. Viscosupplementation. *Rev Bras Ortop*. 2012;47(2):160-4.

Richette P, Bardin T. Structure-modifying agents for osteoarthritis: an update. *Joint Bone Spine*. 2004;71(1):18-23. Review.

Rosales Ade L, Brito NL, Frucchi R, de Campos GC, Pailo AF, de Rezende MU. Obesity, osteoarthritis and clinical treatment. *Acta Ortop Bras*. 2014;22(3):136-9.

Roubille C, Martel-Pelletier J, Raynauld JP, Abram F, Dorais M, Delorme P, et al. Meniscal extrusion promotes knee osteoarthritis structural progression: protective effect of strontium ranelate treatment in a phase III clinical trial. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:82.

Salvato KF, Santos JP, Pires-Oliveira DA, Costa VS, Molari M, Fernandes MT, et al. [Analysis of the influence of pharmacotherapy on the quality of life of seniors with osteoarthritis]. *Rev Bras Reumatol*. 2015;55(1):83-8. Portuguese.

Sanchez-Adams J, Athanasiou KA. Biomechanics of meniscus cells: regional variation and comparison to articular chondrocytes and ligament cells. *Biomech Model Mechanobiol*. 2012;11(7):1047-56.

Sharma L. Osteoarthritis year in review 2015: clinical. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(1):36-48. Review.

Shin SJ, Fermor B, Weinberg JB, Pisetsky DS, Guilak F. Regulation of matrix turnover in meniscal explants: role of mechanical stress, interleukin-1, and nitric oxide. *J Appl Physiol* (1985). 2003;95(1):308-13.

Singh JA, Noorbaloochi S, MacDonald R, Maxwell LJ. Chondroitin for osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;1:CD005614. Review.

Stone AV, Loeser RF, Vanderman KS, Long DL, Clark SC, Ferguson CM. Pro-inflammatory stimulation of meniscus cells increases production of matrix metalloproteinases and additional catabolic factors involved in osteoarthritis pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(2):264-74.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39-51.

Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lin YH, Hou SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(12):1237-47.

Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA. Osteoarthritis – an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):331-44. Review. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Jul;4(7):543.

Zannin M, Lourenço DM, Motta G, Dalla Costa LR, Grando M, Gamborgi GP, et al. Blood coagulation and fibrinolytic factors in 105 patients with hemorrhagic syndrome caused by accidental contact with *Lonomia obliqua* caterpillar in Santa Catarina, southern Brazil. *Thromb Haemost*. 2003;89(2):355-64.

NORMAS ADOTADAS

Normas adotadas

BIREME. Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. DeCS – Descritores em Ciências da Saúde [citado 2016 Set 25]. São Paulo: BIREME. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira, LM, coordenadora. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora; 2008.

Normas para teses e dissertações [Internet]. 2ª ed. rev. E corrigida. São Paulo: Universidade federal de São Paulo, Biblioteca Antônio Rubino de Azevedo, Coordenação de Cursos; 2015 [citado 2016 set 25]. Disponível em: <http://www.bibliotecacsp.unifesp.br/Documentos-Apostila/normas-para-teses-e-dissertacoes>

Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos [Internet]. COBEA;2013. [citado 2016 Set 25]. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/site/capa>

ABSTRACT

Abstract

Background: Osteoarthritis is an articular disease more prevalent, resulting in the progressive deterioration of the articular cartilage, mediated by proinflammatory pathways of the innate immunity and the production of cytokines. The use of chondroprotective drugs can slow the process of deterioration joint although its effectiveness is questionable. rLosac is a cytoprotective adhesion molecule from the caterpillar *Lonomia obliqua*. **Purpose:** To evaluate the chondroprotective potential of rLosac in fibrochondrocytes. **Methods:** The primary culture of fibrochondrocytes were obtained from rat knee meniscus, grown in two conditions: serum deprivation or in the presence of 10ng/mL interleukin 1 β and then treated with rLosac. Various parameters were measured: cell viability, cell cycle and apoptosis by flow cytometry, release of nitric oxide, and protein expression of extracellular matrix molecules. **Results:** rLosac was able to increase proliferation of fibrochondrocytes and to inhibit apoptosis induced by serum deprivation. In the presence of 10 ng/mL IL-1 β , rLosac caused reduction of nitric oxide release and matrix metalloproteinases 2 and 9 activities, and preservation of the extracellular matrix components such as type II collagen, fibronectin and laminin. **Conclusions:** rLosac is able to induce cell proliferation in fibrochondrocytes and to prevent cell death induced by serum deprivation or in the presence of interleukin 1 β , modulating cell cycle and increasing cell survival, reducing nitric oxide release and the activity of metalloproteinases 2 and 9, besides to preserve extra cellular matrix.

