ALEX SILVA SANTIAGO LOPES

Comparação do efeito condroprotetor terapêutico da glicosamina em relação à diacereína no modelo experimental de artrose em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Roberto Guarniero

SÃO PAULO

2006

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Aos meus pais Arnóbio e Zenilde,

pelos esforços dedicados ao longo da minha vida e por serem exemplos de determinação e honestidade.

À minha irmã Patrícia,

pelo incentivo na dedicação à Medicina.

À Cibele,

pelo carinho, incentivo, paciência e compreensão em todos momentos da realização deste trabalho.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

AGRADECIMENTOS

À Dra. Márcia Uchoa, meus sinceros agradecimentos pela sua orientação, paciência, incentivo e apoio dado durante todas as fases do Mestrado e minha admiração pela sua dedicação à pesquisa.

Ao meu orientador Professor Doutor Roberto Guarnieiro, pelo auxílio na estruturação e desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Doutores Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho e Arnaldo Valdir Zumiotti, Professores Titulares do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela possibilidade da realização do Mestrado.

Ao Professor Doutor Olavo Pires de Camargo, pelo incentivo e apoio tornando possível à realização deste estudo.

Às Doutoras Cláudia e Reneé do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela análise de todas as lâminas dos ratos operados.

À Helena, Cláudia e Rosana, funcionárias da Secretaria de Pós Graduação da Ortopedia, obrigado pela paciência e orientação relativa aos aspectos burocráticos deste Mestrado.

Aos funcionários Cauê e Gustavo pelo excelente tratamento dado aos ratos utilizados nesta pesquisa.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Aos colegas de Residência Médica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos agradáveis e difíceis momentos que passamos juntos.

Aos meus colegas de trabalho da Clínica Genus, Doutores Haruki, Cássio, Miguel e Benedito, pelo apoio na finalização do Mestrado e compreensão em todos os momentos em que estive ausente.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

“Não, não pares! É graça divina começar bem.

Graça maior persistir na caminhada certa, manter o ritmo...

Mas a graça das graças é não desistir, podendo ou não, caindo, embora aos pedaços, chegar até o fim.”

Dom Hélder Câmara

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Esta dissertação está de acordo com :

Referências: adaptado de *International Commitee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO DA LITERATURA..... 6

2.1. Modelos experimentais de artrose..... 6
2.2. A Diacereína..... 11
2.2.1. Propriedades da diacereína..... 11
2.2.2. O efeito da diacereína em modelos experimentais de artrose..... 14
2.3. A Glicosamina..... 16
2.3.1. Propriedades da glicosamina..... 16
2.3.2. O efeito da glicosamina em modelos experimentais de artrose..... 18

3. MÉTODOS..... 19

3.1. Grupos analisados…..... 19
3.2. Procedimentos..... 20
3.2.1. Procedimento cirúrgico..... 20
3.2.1.1. A anestesia..... 20
3.2.1.2. A operação..... 21
3.2.1.3. O pós-operatório..... 22
3.2.2. Procedimento de manutenção..... 23
3.2.3. A medicação oral..... 26
3.2.4. A eutanásia..... 28
3.2.5. Medição do ângulo de extensão máxima do joelho..... 28
3.2.6. Processamento das peças e das lâminas..... 29
3.3. Os critérios de exclusão..... 32
3.4. Análise estatística..... 32

4. RESULTADOS..... 34

5. DISCUSSÃO..... 53

6. CONCLUSÃO..... 66

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 67

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Agentes condroprotetores
AH	Ácido hialurônico
AINH	Antiinflamatório não hormonal
COX-2	Ciclooxigenase 2
Da	Dalton
DMDOA	Droga modificadora da doença osteoartrósica
et al.	e outros
Fig.	Figura
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FNT α	Fator de necrose tumoral α
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina e Eosina
g	Grama
GAG	Glicosaminoglicana
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
kg	Kilograma
L4	Quarta vértebra lombar
LCA	Ligamento cruzado anterior
LIM- 41	Laboratório de Investigações Médicas 41
LS	Líquido sinovial

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

M	Mol
Mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por kilograma
mg/kg/dia	Miligrama por kilograma por dia
Ml	Mililitro
µg	Micrograma
OA	Osteoartrose
ρg	Picograma
p.	Página
PG	Proteoglicanas
PGE_2	Prostaglandina E_2
S1	Primeira vértebra sacral
TFC β1	Transformador do fator de crescimento β 1
%	por cento
v.	Volume

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sistema de graduação de Mankin usado para avaliar o grau de lesão da cartilagem articular nos joelhos dos ratos..... 31

Tabela 2 Medidas da extensão máxima dos joelhos em graus dos ratos dos grupos que tomaram glicosamina, diacereína e controle.... 35

Tabela 3 Análise das médias dos ângulos de extensão máxima dos joelhos operados e não operados dos ratos do grupo controle que tomaram diacereína e glicosamina..... 36

Tabela 4 Quantificação da artrose pelo sistema de Mankin (Grupo glicosamina)..... 36

Tabela 5 Quantificação da artrose pelo sistema de Mankin (Grupo diacereína)..... 38

Tabela 6 Quantificação da artrose pelo sistema de Mankin (Grupo controle)..... 40

Tabela 7 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias direitas (DIR) e esquerdas (ESQ) dos ratos do grupo Controle (meniscectomia + sacrifício com sete meses). Comparação pelo teste de Wilcoxon (α = 0,05).... 42

Tabela 8 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os fêmures direitos (DIR) e esquerdos (ESQ) dos ratos do grupo controle (meniscectomia + sacrifício com sete meses). Comparação pelo teste de Wilcoxon (α = 0,05)..... 43

Tabela 9 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias direitas (DIR) e esquerdas (ESQ) dos ratos do grupo que tomaram diacereína. Comparação pelo teste de Wilcoxon (α = 0,05)..... 44

Tabela 10 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias direitas (DIR) e esquerdas (ESQ) dos ratos do grupo do grupo que tomaram glicosamina. Comparação pelo teste de Wilcoxon (α = 0,05)..... 45

Tabela 11 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias direitas (DIR) dos ratos do grupo do controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05)..... 46

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 12 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias esquerdas (ESQ) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05)..... 47

Tabela 13 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os fêmures direitos (DIR) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05)..... 48

Tabela 14 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os fêmures esquerdos (ESQ) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05)..... 49

Tabela 15 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os joelhos operados (DIR) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05)..... 50

Tabela 16 Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os joelhos não operados (ESQ) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05)..... 51

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias direitas e esquerdas dos ratos do grupo controle (meniscectomia + sacrifício com sete meses)..... 42

Gráfico 2 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos fêmures direitos e esquerdos dos ratos do grupo controle (meniscectomia + sacrifício com sete meses)..... 43

Gráfico 3 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias direitas e esquerdas dos ratos do grupo que tomaram diacereína..... 44

Gráfico 4 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias direitas e esquerdas dos ratos do grupo que tomaram glicosamina..... 45

Gráfico 5 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias direitas dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina..... 46

Gráfico 6 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias esquerdas dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina..... 47

Gráfico 7 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos fêmures direitos dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina..... 48

Gráfico 8 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos fêmures esquerdos dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina..... 49

Gráfico 9 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos joelhos operados (DIR) dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina..... 50

Gráfico 10 Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos joelhos não operados (ESQ) dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina..... 51

Gráfico 11 Representação gráfica dos valores médios dos ângulos de extensão máxima dos joelhos operados dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05)..... 52

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Meniscectomia medial do joelho direito..... 22

Figura 2 Manutenção dos ratos..... 24

Figura 3 Ratos confinados nas caixas..... 25

Figura 4 Os ratos estimulados pelo oferecimento de doce de leite..... 26

Figura 5 Ratos submetidos à administração da droga..... 27

Figura 6 Análise do ângulo de extensão máxima..... 29

Figura 7 Visão macroscópica do joelho operado..... 34

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

RESUMO

LOPES, A.S. Comparação do efeito condroprotetor terapêutico da glicosamina em relação à diacereína no modelo experimental de artrose em ratos[dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 98 p.

O objetivo do presente estudo é o de comparar funcionalmente e histologicamente o efeito terapêutico da glicosamina em relação a diacereína no modelo experimental de artrose em ratos. Trinta ratos Wistar foram submetidos a meniscectomia medial do joelho direito. Dez animais receberam 50mg/kg/dia de diacereína a partir do 3º até o 7º mês de pós-operatório (PO), dez animais receberam 40mg/kg/dia de glicosamina e dez animais não receberam nenhuma medicação. Todos foram sacrificados no 7º mês PO. Foram medidos os ângulos de extensão máxima de cada joelho. A análise histológica com hematoxilina-eosina e alcian blue foi feita de cada um dos côndilos tibiais e femorais. Todos os joelhos operados apresentaram amplitude de extensão do joelho mais limitada que o lado contra-lateral (p=0,001), porém os que receberam diacereína apresentavam menor rigidez (p=0,005). Histologicamente, o modelo experimental levou a uma artrose de leve a moderada estatisticamente diferente do joelho contra-lateral não operado (p=0,001). Já os joelhos dos ratos que fizeram uso das medicações não apresentaram diferenças significativas (p=0,3) entre aqueles que tomaram glicosamina e os que fizeram uso da diacereína. As diferenças entre os joelhos operados medicados e não medicados também não foram estaticamente diferentes.

Conclusões: O uso terapêutico da diacereína e glicosamina diminuiu a rigidez articular e retardou a progressão da artrose. A diacereína atuou melhor na mobilidade articular do que a glicosamina, porém não houve diferença estatística entre as duas drogas no controle da degeneração articular.

Descritores: Osteoartrose/ terapia, Glicosamina, Cartilagem, Ratos Wistar, Modelos Animais, Estudo Comparativo.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

SUMMARY

LOPES, A.S. A comparison between the therapeutic chondroprotective effects of glucosamine and diacerhein in an experimental model of arthritis in rats[dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 98 p.

The purpose of this study is to compare, based on a functional and histological analysis, the therapeutic effects of glucosamine as compared to diacerhein in an experimental model of arthritis in rats. Thirty Wistar rats were submitted to a medial meniscectomy of the right knee. Ten animals received 50 mg/kg/day of diacerhein from the third through seventh post-operative (PO) months, ten animals received 40mg/kg/day of glucosamine and ten animals received no medication at all. All of these animals were sacrificed during the seventh PO month. The maximum angle of each knee extension was measured. A histological analysis was carried out by hematoxilin-eosin and alcian blue staining of each of the tibial and femoral condyles. All the operated knees presented a more limited range of extension than the non-operated knees (p=0.001), however, the animals that received diacerhein presented less stiffness (p=0.005). Histologically, the experimental model caused a light to moderate arthritis statistically different from the other non-operated knee (p=0.001). No significant differences (p=0.3) were detected between the knees of the rats medicated with glucosamine and those that received diacerhein. The operated medicated knees and non-operated knees also showed no statistical differences.

Conclusion: The therapeutic use of diacerhein and glucosamine decreased joint stiffness and delayed the progression of the arthritis. The diacerhein had a more positive effect on joint mobility than the glucosamine, even though there was no statistical difference between the two drugs in controlling the degeneration of the joint.

Descriptors: Osteoarthritis/therapy, Glucosamine, Cartilage, Wistar Rats, Models Animal, Comparative Study

.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrose (OA) é um processo degenerativo progressivo da cartilagem articular e do osso subjacente levando a um quadro de sintomatologia dolorosa e incapacidade funcional, principalmente nos indivíduos idosos.

Estudos epidemiológicos relatam que o impacto da OA levando a incapacidade funcional é similar ao causado pela doença cardiovascular e maior do que o originado por qualquer outra condição clínica no idoso (Pavelka et al., 2002). Atualmente sua prevalência é elevada e sua incidência está crescendo proporcionalmente com o aumento da expectativa de vida da população (Calkins, 2001).

A doença acomete as articulações, principalmente do quadril, joelho, mão, pé e coluna, induzindo a dor e a limitação dos movimentos, resultando em grande perda da qualidade de vida e morbidade.

A OA pode ser dividida em primária ou idiopática, ou seja, sem causa definida e os sinais e sintomas aparecem em idade mais avançada. A secundária tem início precoce desencadeada pela lesão articular traumática, por alterações metabólicas, de desenvolvimento, infecções, neuropatias e desordens da matriz da cartilagem e do osso subcondral. O início das manifestações clínicas ocorre a partir dos 50 anos de idade, porém pode aparecer precocemente em indivíduos obesos ou pessoas mais jovens que

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

utilizam em excesso as articulações, como os atletas (Buckwalter et al., 2001).

A cartilagem articular é um tecido conectivo composto de condrócitos embebidos em uma matriz, essencialmente constituída por proteoglicanas (PGs) e colágeno tipo II. Ela é submetida a processos anabólicos (condroformação) e catabólicos (condroreabsorção). Há um equilíbrio dinâmico destes processos nos condrócitos saudáveis, porém as doenças articulares tais como as OAs são caracterizadas por um distúrbio neste balanço, ou seja, os processos catabólicos excedem os anabólicos levando a um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de sua matriz pela falência dos condrócitos, havendo uma diminuição progressiva da matriz (Aydelotte et al., 1993; Dieppe et al., 1993).

A fisiopatologia desta degradação cartilaginosa envolve as Citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), prostaglandinas, radicais livres como o óxido nítrico (NO) e por componentes da matriz tais como fragmentos de fibronectina que são produzidas pelos macrófagos, monócitos, células sinoviais e condrócitos estimulando a produção de metaloproteinases pelas células da cartilagem. O processo degenerativo leva a áreas de necrose; os restos celulares, liberados no meio articular, levam a uma resposta inflamatória sinovial e das estruturas músculo-esqueléticas adjacentes, perpetuando os mecanismos de lesão e originando as manifestações clínicas da doença (Vidal et al., 1978 Tyler et al., 1985; Peluso et al., 1990; Velosa et al., 1999;).

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Os tratamentos propostos objetivam melhorar os sintomas dolorosos e a função articular. Se as lesões são graves, indicam-se cirurgias tais como osteotomias e artroplastias, mas se a artrose é leve, o tratamento clínico se baseia na perda de peso, fortalecimento muscular e técnicas de proteção articular. A terapia farmacológica, por muito tempo, consistiu no uso de drogas analgésicas e antiinflamatórias não hormonais (AINH) que, embora eficazes no manejo da dor e do processo inflamatório nesta patologia, não alteravam sua evolução natural (Walker e Erkman, 1975).

Uma variedade de agentes que não é primariamente analgésico ou AINH tem se mostrado capaz de prevenir o desenvolvimento da artrose ou diminuir a progressão de alterações patológicas estabelecidas na articulação artrósica em modelos experimentais e em estudos clínicos. Esses agentes têm sido designados como drogas modificadoras da doença osteoartrósica (DMDOA) ou agentes condroprotetores (ACP) (Moskowitz et al., 1996).

A diacereína (4,5-diacetoxi-9, 10-antraquinona-2-ácido carboxílico) é um derivado antraquinona cujo metabólito ativo é a reína. Ela age inibindo a IL-1 que produz alívio sintomático quando administrado oralmente para pacientes com diagnóstico de osteoartrose (Karzel et al., 1971). Inibe a produção de citocinas pela membrana sinovial e condrócitos, bem como o nível de bio-atividade dos receptores para IL-1 (Ghosh et al., 1987).

Um estudo clínico randomizado, duplo-cego e placebo-controlado com três anos de duração, em pacientes portadores de OA do quadril, mostrou que a diacereína foi eficaz, retardando a degeneração da cartilagem e bem

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

tolerada no tratamento em longo prazo, com mínimo efeito colateral gastrointestinal (Dougados et al., 1996).

Os trabalhos também mostram a eficácia e segurança da diacereína no controle dos sintomas da OA, quando administrada por via oral, na dose diária de 100 mg (Abatangelo et al., 1989).

Fagnani et al., 2000, após a análise de custo econômico comparativo entre grupos de pacientes que se submeteram à terapia habitual para OA e grupos que associaram a diacereína ao tratamento, concluíram que o grupo tratado com diacereína apresentou menor gasto em consultas médicas, cuidados de enfermagem, consumo de AINH e reabilitação.

A glicosamina é um aminomonosacarídeo, naturalmente presente no corpo e especialmente nas cartilagens articulares, onde está quimicamente envolvida em diferentes tipos de glicosaminoglicanos da matriz da cartilagem, sendo que a sua principal função é estimular a síntese de proteoglicanos. Sua ação no processo inflamatório baseia-se na redução da síntese de radicais superóxidos por macrófagos e inibição das enzimas lisossomais (Forrester et al., 1981).

Após três anos de tratamento com a glicosamina em um estudo clínico, prospectivo, randomizado, placebo-controlado em 212 pacientes com artrose do joelho, ficou provado que esta droga diminuiu significativamente a progressão da degeneração articular (Reginster et al., 2001).

Quando comparada à eficácia e segurança da glicosamina em relação ao ibuprofeno, constatou-se que a mesma é efetiva no combate dos

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

sintomas da OA, tanto quanto o antiinflamatório não-esteróide. O diferencial é ser mais bem tolerada, uma vez que não inibe as ciclooxigenases, evitando assim, os efeitos colaterais indesejáveis. Este fato a torna uma boa opção para o tratamento das osteoartroses em longo prazo (Pond e Nuki, 1973).

O objetivo do presente estudo é o de comparar funcionalmente e microscopicamente o efeito terapêutico da glicosamina em relação à diacereína no modelo experimental de OA realizado em ratos através da meniscectomia medial.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Modelos experimentais de artrose.

Para estudar a ação das DMDOA, inúmeros modelos animais têm sido utilizados. Em alguns, a artrose é produzida por alteração mecânica da articulação (exemplo: meniscectomia ou secção ligamentar). Em outros, uma lesão química da articulação é produzida (exemplo: injeção intra-articular de enzimas proteolíticas, de antibióticos ou de venenos) ou, ainda, acompanha-se o desenvolvimento de artrose espontânea (por exemplo: Linhagem Hartley de cobaias e algumas linhagens de camundongos). Neste estudo, limitar-nos-emos à revisão dos modelos mecânicos de artrose.

Marshall et al. (1969) estudaram a formação de osteófitos marginais em curtos intervalos após a secção do LCA. Dez cães foram operados, sendo que em um deles foi feita artrotomia bilateralmente e, nos demais, a secção do LCA de um dos joelhos. Os animais foram sacrificados entre uma e oito semanas. Além da formação de osteófitos, o autor mostrou que nas lâminas da cartilagem articular dos animais sacrificados com dois meses de pós-operatório, houve perda de basofilia, diminuição da espessura, formação de clones de condrócitos, fibrilação, degeneração da matriz e fissura da cartilagem.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Hulth et al. (1970) descreveram um modelo experimental de artrose em coelhos após a ressecção do ligamento colateral medial, do menisco medial e de ambos os ligamentos cruzados, com o objetivo de mostrar um método de osteoartrose de progressão lenta em coelhos. Sacrificaram os animais com cinco, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de pós-operatório. Descreveram o aumento de divisão celular de condrócitos que ocorre no início (15 dias após a operação) da artrose, formando clones de condrócitos. Após 30 dias já havia fissuras superficiais, além dos clones de condrócitos. Não encontraram alterações nos joelhos contralaterais.

Moskowitz et al. (1973) apresentaram um modelo experimental de artrose em coelhos realizando a meniscectomia parcial medial (corno anterior). Sacrificaram os animais entre três e 20 semanas. Desde a 12ª semana encontraram alterações da cartilagem como clones de condrócitos, fissuras, fibrilação e perda da camada superficial e cistos subcondrais e maiores alterações nos côndilos femorais mediais. Mostraram que o desenvolvimento de lesões degenerativas simula aquelas da seqüência humana natural que se seguem a um trauma meniscal. Sugeriram o uso deste modelo experimental no estudo das doenças articulares degenerativas em humanos.

Pond e Nuki (1973) lesaram o LCA de um dos joelhos de 10 cães e os sacrificaram entre uma e 26 semanas. As alterações histológicas variaram de normal, no animal sacrificado uma semana após a cirurgia, culminando em fibrilações grosseiras até a camada profunda, nos animais sacrificados em períodos mais tardios. Baseados nos achados de microscopia de luz e

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

eletrônica, os autores afirmam que “a progressão da condição induzida experimentalmente seguiu um curso muito similar ao da história natural da instabilidade anterior e a patologia final, de modo geral, é aquela da osteoartrose”. Este modelo de artrose foi mais tarde aprofundado e comparado à osteoartrose natural de cães por McDevitt, Muir (1976) e MUIR (1977). Os autores defenderam o modelo não somente pela pouca agressividade à articulação durante o ato operatório, mas, com maior importância, pelo aparecimento da lesão na cartilagem articular no mesmo local da superfície tibial em todos os cães, permitindo a análise desses locais antes do aparecimento de lesões e o estudo dos eventos que levam à lesão.

Nesse modelo experimental, três fases foram definidas. Na primeira fase (primeiras três semanas), as alterações histológicas são mínimas na cartilagem tibial não coberta pelo menisco medial, há aumento de conteúdo de água e da extração de proteoglicanas. Na segunda fase (até 12 semanas de pós-operatório), há erosão da cartilagem do côndilo tibial medial (área sem cobertura do menisco) e perda pequena de água e de proteoglicanas desta região. No restante da articulação, as alterações são semelhantes às da primeira fase. Na terceira fase (12-48 semanas de pós-operatório), aparecem erosões graves em focos. Nestes focos, há importante perda de proteglicanas e do conteúdo de água. No restante da articulação encontram-se lesões da segunda fase. Segundo os autores McDevitt, Muir (1976) e Muir (1977), somente nesta fase a doença seria reconhecida por seu quadro clínico ou sua radiologia como osteoartrose. McDevitt, Muir (1976) encerram

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

confirmando a similaridade das alterações bioquímicas que ocorrem na osteoartrose natural e na experimental, dando ainda mais validade ao modelo experimental.

Cox et al. (1975) compararam microscopicamente a meniscectomia medial total e parcial (deixando a periferia do menisco medial íntegra) em cães, que foram sacrificados três a dez meses após a meniscectomia. As alterações da cartilagem foram diretamente proporcionais à quantidade de menisco retirada. Nos joelhos submetidos a meniscectomia parcial, não houve regeneração do tecido meniscal. Em cinco dos nove joelhos submetidos a meniscectomia total, houve regeneração meniscal, de tamanho variável, com a formação de um tecido semelhante a fibrocartilagem. Não havia alterações do tecido cartilaginoso sob esta fibrocartilagem, mas sim no restante do compartimento medial. As alterações da cartilagem articular, após a meniscectomia parcial, nunca foram piores do que as existentes no joelho contralateral submetido a meniscectomia total.

Shapiro e Glimcher (1980) mostraram que as alterações degenerativas em coelhos após meniscectomia medial, principalmente na cartilagem do côndilo tibial medial, iniciam-se na superfície (dois meses), passam para as camadas mais profundas (sete meses de pós-operatório), formando osteófitos, irregularidades da matriz e clones de condrócitos. Apresentam-se com hipocelularidade e com diminuição da concentração de glicosaminoglicanas. As alterações encontradas foram comparadas às alterações iniciais da OA.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Colombo et al. (1983) padronizaram um modelo experimental de artrose acelerada em coelhos após a meniscectomia parcial lateral, secção dos ligamentos colateral lateral e sesamoideo. As alterações da cartilagem podiam ser observadas nas primeiras duas semanas de pós-operatório.

Ghosh et al. (1993) confirmaram que as alterações precoces causadas pela meniscectomia no joelho de carneiros são semelhantes àquelas descritas na OA inicial de humanos.

Rezende (2000) concluiu que o modelo experimental de artrose após meniscectomia medial em ratos foi eficaz produzindo alterações degenerativas, leve após três meses e grave com sete meses de pós-operatório.

Galois et al. (2004) investigaram a influência de um exercício calibrado na progressão das lesões estruturais após ressecção do LCA em ratos. Constataram que os exercícios leves e moderados tiveram um efeito benéfico nas lesões condrais, porém os esforços intensos aceleraram a apoptose dos condrócitos.

Wancket et al. (2005), com a finalidade de testar a localização anatômica dos marcadores da degradação articular em ratos meniscectomizados, concluíram que este modelo experimental de OA produziu lesões condrais semelhantes às dos seres humanos. Os biomarcadores foram considerados um excelente método para avaliar a degradação do colágeno tipo II (um componente importante da cartilagem) que não é rotineiramente vista nas análises da progressão da OA.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

2.2. A Diacereína

2.2.1. Propriedades da diacereína

Pomarelli et al. (1980) realizaram testes farmacológicos nos pulmões de cobaias e em exudatos inflamatórios de ratos com o objetivo de avaliar a ação da diacereína sobre as prostaglandinas. Concluíram que a diacereína não altera a habilidade do tecido pulmonar de cobaias em metabolizar o ácido aracdônico, o que pode, a nível gástrico, antagonizar a ação ulcerogênica de drogas semelhantes ao ácido acetilsalicílico, que levam à deficiência de prostaglandinas gástricas. Semelhantemente, em ratos, diacereína oral na dose de 4 mg/kg aumentou a síntese de prostaglandinas em 69% ($p<0,001$ em relação a controles), enquanto a administração oral de indometacina na dose de 0,2 mg/kg reduziu a síntese em 72% ($p<0,01$ em relação a controles).

La Villa et al. (1989) administraram 50 mg de diacereína duas vezes ao dia, por cinco dias, a indivíduos idosos com insuficiência cardíaca congestiva e compararam com um grupo que recebeu placebo. Não houve alteração significativa da excreção urinária de prostaglandina E_2, de 6-ceto-prostaglandina $F_{1\alpha}$ ou de tromboxane B_2 (medidas de síntese renal de prostaglandina e/ou da atividade extra-renal da ciclooxigenase). Também não ocorreram alterações significativas da função renal, da excreção de sódio, da hemodinâmica renal ou da diurese.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Beccerica et al. (1990) estudaram, em pacientes com osteoartrose ativa (articulações dolorosas e edemaciadas), a ação da diacereína na dose de 100 mg/dia por 10 dias na fluidez de membrana de linfócitos, que nesta patologia fica diminuída. Observaram aumento da fluidez de membrana, sendo que para os pacientes submetidos ao tratamento com a droga por 30 dias na OA sem sinovite dolorosa ocorreu efeito similar, embora a fluidez de membrana não estivesse diminuída no início.

Boittin et al. (1993) observaram os efeitos da diacereína sobre o metabolismo da matriz cartilaginosa, cultivando condrócitos da cartilagem articular de coelhos expostos a diacereína nas doses de 10^{-9} a 10^{-4} M, com ou sem 500 pg/ml de IL-1 humana, por um e seis dias. O aumento da produção de colagenase pelos condrócitos, estimulados pela IL-1, foi reduzido pela diacereína, desde o primeiro dia. Períodos maiores de incubação (seis dias), com uma concentração de 10^{-6}M de diacereína, levaram a um aumento na produção de colágeno e de GAG. Concluíram que a diacereína pode diminuir e até abolir o aumento da produção de colagenase pelos condrócitos estimulados pela IL-1.

Carney et al. (1995) mostraram que a diacereína reduz a produção da condroitina 4-sulfato, mas não a de condroitina 6-sulfato em cobaias, resultando numa diminuição da razão entre ambas. Esta razão está aumentada na OA. Os autores sugeriram que este seria um dos mecanismos através dos quais a diacereína poderia proteger os agrecans (espécie predominante de PG) e demais PG que contêm muitas cadeias de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

condroitina sulfato e de querato-sulfato, ajudando a cartilagem a resistir à carga de compressão.

Pelletier et al. (2001) afirmaram que além da degradação da cartilagem, há evidência que a remodelação do osso subcondral é um fator contribuinte na OA. Por isso, a estratégia do tratamento também objetiva modificar o metabolismo dos osteoblastos do osso subcondral. Eles estudaram a ação da diacereína e reína nas variáveis metabólicas e inflamatórias dos osteoblastos da OA subcondral tais como: fosfatase alcalina, osteocalcina, IL-6, PGE2, COX-2, fator de crescimento insulina-like (IGF-1), ativador do plasminogênio urocinase(Upa) e inibidor do ativador do plasminogênio-1(PAI-1). Os resultados revelaram um efeito direto da diacereína e reína, reduzindo as atividades de síntese dos osteoblastos que poderiam ser responsáveis pela remodelação óssea subcondral anormal durante o curso da OA.

Tamura e Ohmori (2001) relataram a eficácia dos efeitos da diacereína na supressão do óxido nítrico no plasma de ratos que tiveram artrose induzida.

Tamura et al. (2002) aprofundaram sua pesquisa anterior realizando estudos farmacológicos da diacereína em modelos animais de inflamação, OA induzida e reabsorção óssea. Verificaram que a diacereína diminuiu o edema induzido por mediadores inflamatórios tais como carragenina, dextran. Quando a OA foi induzida, também, houve diminuição do edema e da mucoproteína sérica. Nas ratas ooforectomizadas mostrou-se eficiente na

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

prevenção da perda óssea, reduzindo a fosfatase alcalina sérica e a excreção urinária de hidroxiprolina.

2.2.2 O efeito da diacereína em modelos experimentais de artrose.

Mazières et al. (1993) mostraram o efeito protetor profilático da diacereína, em modelos experimentais de artrose, quando causaram uma contusão fechada do joelho em 12 coelhos e a medicação foi dada à metade dos animais. Onze coelhos serviram de controle sem contusão, dos quais cinco receberam diacereína (3,5 mg/kg/dia) desde o início do trabalho. Após o sacrifício com 49 dias após a contusão, não encontraram diferenças entre os dois grupos controles, mas estes apresentaram pontuações de artrose significativamente mais baixas que o grupo contundido. O grupo contundido que recebeu a diacereína não era estatisticamente diferente dos grupos controles, mas era do grupo contundido não tratado.

Mazières et al. (1996), três anos mais tarde, reutilizaram este modelo, porém, agora, com três grupos de coelhos: um grupo controle sem trauma (nove coelhos); outro grupo (nove coelhos) contundido sem medicação alguma; e o último grupo (12 coelhos) contundido passou a receber diacereína (3,5 mg/kg/dia) 30 dias após a contusão. Os animais foram sacrificados 90 dias após o trauma. O grupo medicado apresentou um valor de degeneração intermediário entre o grupo controle e o grupo contundido sem medicação, demonstrando o efeito terapêutico da diacereína.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Brandt et al. (1997) estudaram o efeito da diacereína no modelo acelerado de artrose em cães, descrito pelo grupo em 1985 (secção do LCA após a ganglionectomia L4-S1 ipsilateral).Os autores observaram o efeito benéfico da droga neste modelo experimental.

Smith et al. (1999) testaram o uso de 40 mg/kg/dia de diacereína em 10 cães, por 32 semanas e constataram o retardo da progressão da OA. Entretanto, a concentração de PG, água e a atividade colagenolítica de extratos da cartilagem não foram significativamente diferentes entre os grupos.

Rezende (2000) avaliou o efeito da administração oral de 50 mg/kg/dia de diacereína em ratos submetidos à meniscectomia medial do joelho direito no período de 7 meses. Concluiu que houve diminuição das alterações degenerativas de ambos os joelhos.

Hwa et al. (2001) avaliaram os efeitos da diacereína administrada oralmente no osso subcondral e na cartilagem em modelo experimental de OA em ovelhas. Após meniscectomia lateral bilateral, constataram, pela análise histomorfométrica e histológica, que a diacereína diminuiu a progressão da OA no osso subcondral e na cartilagem articular.

Pelletier et al. (2003) aprofundaram seus estudos anteriores e observaram que a diacereína reduziu o nível de fragmentação do DNA de condrócitos e a morte da cartilagem em modelo experimental de OA em cães, ao mesmo tempo inibindo a caspase-3 e a síntese de óxido nítrico induzido.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

2.3. A glicosamina

2.3.1. Propriedades da glicosamina

Roden et al. (1956) notaram um aumento da produção de glicosaminoglicano e colágeno quando o sulfato de glicosamina foi adicionado a culturas de células fibroblásticas derivadas da cartilagem.

Karzel et al. (1971) estudando a atividade da N-acetylglicosaminaquinase na mucosa gástrica de ratos, constataram que o sulfato de glicosamina foi eficientemente incorporado aos mucopolissacarídeos, estimulando a produção e servindo como um protetor gástrico.

Vidal et al. (1978) administraram, por via oral, glicosamina em animais com OA para avaliar sua ação terapêutica no período de quatorze dias. Observaram que a droga foi capaz de estimular a produção de glicosaminoglicanos e a síntese de proteoglicanas.

Setnikar et al. (1984) apresentaram um grande estudo da farmacocinética da glicosamina, ou seja, avaliaram sua absorção, distribuição e excreção após administração oral e intravenosa em ratos. Constataram sua excelente absorção na cartilagem articular, mínima toxicidade e seu efeito benéfico em relação aos AINH.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Raiss (1985) avaliou as mudanças ultraestruturais em condrócitos, usando morfometria após o uso de sulfato de glicosamina na cartilagem articular degenerada experimentalmente.

Setnikar et al. (1991) aprofundaram sua pesquisa com a finalidade de entender melhor o efeito do sulfato de glicosamina sobre mediadores inflamatórios específicos induzidos a causar edema nas patas dos ratos e sua toxicidade nos órgãos e tecidos. Concluíram que a droga teve ação antiinflamatória no edema provocado pela carragenina, dextran e formalina, porém não foi efetivo contra os mediadores específicos inflamatórios tais como a bradicinina, serotonina e histamina. A administração da glicosamina por via oral não inibiu a ciclooxigenase, não ocorrendo alterações gastrointestinais e também não apresentando sinais agudos de toxicidade no sistema neurológico e somático, nos achados de necropsia. Ao compararem seu efeito e toxidade com o ácido acetilsalicílico e indometacina administrados durante 14 dias em espécies animais, os AINH foram mais eficazes na redução da inflamação, porém o condroprotetor foi muito menos tóxico.

Jimenez et al. (1997) relataram que a glicosamina não afetou a produção de colágeno tipo II em culturas de condrócitos humanos.

Sandy et al. (1998) observaram a redução do catabolismo dos agrecanos mediados pelos condrócitos, inibindo a IL-1 e o ácido retinóico que estimula a enzima agrecanase.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Shikhman et al. (2001) concluíram que a N-Acetylglucosamina evita a ativação dos condrócitos humanos pela IL-1BETA induzidas, ou seja, ela expressou propriedades antiinflamatória e condroprotetora, por interferir no gene de expressão das citocinas indutíveis em condrócitos.

Scott (2004) publicou que a administração da glicosamina nas doses usuais de 1500mg, sozinha ou combinada com a condroitina, não parece causar uma interação clinicamente significante com o anticoagulante warfarin.

2.3.2. O efeito da glicosamina em modelos experimentais de artrose

Ao Eichler e Noh (1970) avaliaram o efeito da glicosamina em animais submetidos à indução de OA e constataram um efeito protetor e redutor contra a degeneração da cartilagem articular.

Hanson et al. *(*1997) observaram um retardo da OA em cavalos com o uso da glicosamina associada à condroitina.

Canapp et al. (1999) também constataram um significante efeito antiinflamatório contra sinovite inflamatória quimicamente induzida em cães, com o uso da glicosamina complementada à condroitina.

Lippiello et al. (2000) estudaram a ação da glicosamina com condroitina em modelo experimental de OA em 42 coelhos e observaram uma estabilização da matriz da cartilagem e lentificação do processo degenerativo articular após análise histológica.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

3. MÉTODOS

Este estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq – do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O material deste trabalho constou de 30 ratos machos adultos da raça Wistar, obtidos junto ao Centro de Bioterismo da FMUSP. A idade mínima para inclusão no trabalho foi de oito semanas e o peso mínimo de 180 gramas. Ratos com idade superior a 16 semanas e peso acima de 390 gramas não foram utilizados neste estudo.

3.1. Grupos analisados

Os ratos foram separados em dois grupos Estudo (G e D), com 20 animais e um grupo Controle (C) com 10 animais, conforme os procedimentos adotados e que serão descritos após sua apresentação. Dessa forma, os grupos estudados foram os seguintes:

G: Dez ratos submetidos a meniscectomia total medial do joelho direito isolada e submetidos à administração oral de glicosamina[(a)], na dose de 40mg/kg/dia, a partir do terceiro mês pós-operatório (PO) e sacrificados com sete meses de pós-operatório.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

D: Dez ratos submetidos a meniscectomia total medial do joelho direito isolada e submetidos à administração oral de diacereína[(b)], na dose de 50mg/kg/dia, no mesmo período do grupo acima.

C: Dez ratos submetidos a meniscectomia total medial do joelho direito isolada que não receberam medicação.

3.2. Procedimentos

Todos os ratos sob anestesia inalatória com halotano foram submetidos a meniscectomia total medial do joelho direito, conforme descrito por Rezende (2000).

3.2.1. Procedimento cirúrgico

3.2.1.1. A anestesia

Os procedimentos de indução e manutenção da anestesia foram padronizados e orientados pela equipe de anestesia do IOT-HC-FMUSP e pela médica veterinária do Centro de Bioterismo da FMUSP.

[(a)] Dinaflex® - Zodiac®; [(b)] Artrodar®- TRB Pharma® ;

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

A indução anestésica foi realizada em câmara inalatória com halotano a 3% e oxigênio a 3 l/min, até que o animal se encontrasse adormecido. A seguir, o rato foi retirado da câmara e colocado na mesa operatória com uma máscara anestésica, onde se manteve o fluxo de 3 l/min de oxigênio misturado com halotano a 2%. Ao final da cirurgia, por ocasião da sutura da pele, a mistura de halotano era diminuída para 1% e, ao término do procedimento cirúrgico, somente oxigênio era inalado.

3.2.1.2. A operação

Em decúbito dorsal horizontal, foram realizadas a tricotomia do membro inferior direito e a anti-sepsia com solução de gluconato de clorhexidina[C]. Campos estéreis isolaram o membro inferior direito. Através de incisão longitudinal medial do 1/3 proximal da perna ao 1/3 distal da coxa e divulsão do vasto medial, procedeu-se à exposição do ligamento colateral medial, que foi seccionado a cerca de dois a três milímetros abaixo da interlinha articular (antes de sua inserção tibial) e rebatido proximalmente. O menisco medial foi identificado e foi feita a exérese do mesmo (Fig. 1).

Todo o procedimento foi realizado com bisturi de lâmina número 15 e com o auxílio de lupa ou de microscópio.

(C) Laborhex® - Glicolabor®

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

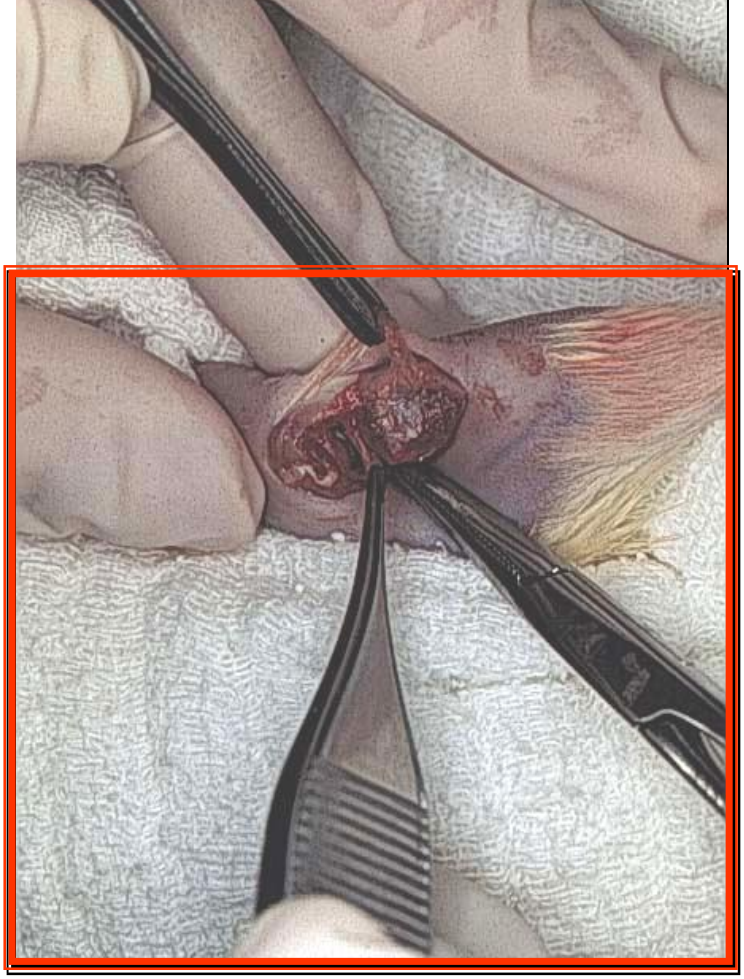


Figura 1 – Meniscectomia medial do joelho direito

O ligamento colateral medial foi suturado ao seu coto distal, através de um ponto com fio nylon monofilamentado 5-0, bem como o músculo vasto medial e a pele foram suturados com pontos separados de fio nylon monofilamentado 4-0. A ferida foi limpa com soro fisiológico e solução de gluconato de clorhexidina.

3.2.1.3. O pós-operatório

Após a recuperação anestésica, o rato operado recebeu 2,5 mg de dipirona por via oral em dose única, protegido por campos limpos, era

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

mantido em gaiola com no máximo três animais. A ração e a água filtrada foram oferecidos pela tampa da gaiola.

Todos os animais removeram seus próprios pontos de sutura entre uma e três semanas após do procedimento.

3.2.2. Procedimento de manutenção

Todos os animais foram mantidos em gaiolas (três ratos por gaiola) de propileno de 16 cm x 34 cm x 49 cm, cobertas com uma tampa de ferro, com espaço para colocação da ração padrão e um ou dois bebedouros com 500 ml de água filtrada (Fig.2). Os três ratos de cada gaiola foram marcados distintamente (uma marca preta, ou duas marcas azuis ou três marcas vermelhas no rabo do animal), com o objetivo de identificá-los dentro de sua gaiola e subgrupo, conforme demonstrado na figura 3.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Figura 2 – Manutenção dos ratos

Três a quatro vezes por semana, todos os animais eram colocados em caixas de papelão de 40 cm x 50 cm x 60 cm e de 50 cm x 70 cm x 80 cm, por duas horas no período noturno. Em cada caixa, eram colocados seis ratos. Para identificação correta dos animais de cada gaiola, cada trio foi marcado no dorso em azul, branco ou vermelho, associado ou não a preto

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(seis combinações). As caixas eram agrupadas em trios. Dentro das caixas, tampas de ferro de gaiolas foram colocadas inclinadas a 45° e apoiadas nas paredes das caixas, de forma a permitir que os ratos subissem até a tampa das mesmas e passassem de uma caixa para outra por suas bordas ou pelo apoio sobre as gaiolas colocadas ao lado das caixas (Fig.4). Os ratos eram estimulados a subir e andar sobre as caixas pelo escurecimento da sala e pelo oferecimento de doce de leite[d].

Figura 3 – Ratos confinados nas caixas

[(d)]Doce de Leite Itambé®

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Figura 4 - Os ratos estimulados pelo oferecimento de doce de leite

Os ratos foram pesados no momento da cirurgia (peso inicial) e por ocasião do sacrifício (peso final), numa balança eletrônica com precisão de um grama. Cada rato, dentro de seu respectivo grupo, foi identificado por um número arábico. Todos os ratos que receberam a medicação oral foram pesados semanalmente para ajuste da dose.

3.2.3. A medicação oral

A diacereína oral foi administrada com os animais acordados. Os ratos do grupo D, a partir do terceiro mês de pós-operatório da meniscectomia medial do joelho direito, receberam diariamente 50mg/kg de

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

peso do pó de diacereína ($C_{19}H_{12}0_8$), diluído a 0,1 g/l em leite condensado[e]. A solução era aspirada numa seringa de 1 ml, sem agulha. O rato era preso pelo dorso e cintura escapular, de forma a prender os membros superiores pela mão esquerda do pesquisador com luva de funileiro. A medicação foi introduzida na cavidade oral, colocando-se a extremidade da seringa sem agulha no canto esquerdo da boca do animal (mão direita do pesquisador), que era liberado, em seguida. Os animais receberam a medicação até a véspera da data da eutanásia, que ocorreu no sétimo mês de pós-operatório (Fig 5).

A glicosamina oral foi administrada diariamente 40mg/kg de peso do pó do sulfato de glicosamina, diluído a 0,1 g/l em leite condensado[e]. O mesmo procedimento adotado para a diacereína foi aplicado para a glicosamina.

Figura 5 – Ratos submetidos à administração da droga

[(e)]Leite Moça Nestlé®

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

3.2.4. A eutanásia

O protocolo para eutanásia também foi padronizado pela equipe de anestesia do IOT-HC-FMUSP e aprovado pela médica veterinária do Centro de Bioterismo da FMUSP.

Todos os ratos foram submetidos à eutanásia com sete meses de pós-operatório. Administrou-se injeção intra-peritoneal de cetamina (anestésico hipnótico) na concentração de 10 mg/kg, associada ao dobro da dose anestésica de diazepam, i.e., 0,8 mg/kg ou ao dobro da dose anestésica de xelazina, i.e., 6,4 mg/kg, potencializando o efeito da cetamina e causando morte indolor por parada respiratória.

3.2.5. Medição do ângulo de extensão máxima do joelho

Foram realizadas dissecções de ambos os joelhos desde a região coxo-femoral até a região do tornozelo após identificação prévia de cada membro.

Após a dissecção, foram medidos os ângulos de extensão máxima de cada joelho estudado, conforme apresentado na figura abaixo:

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

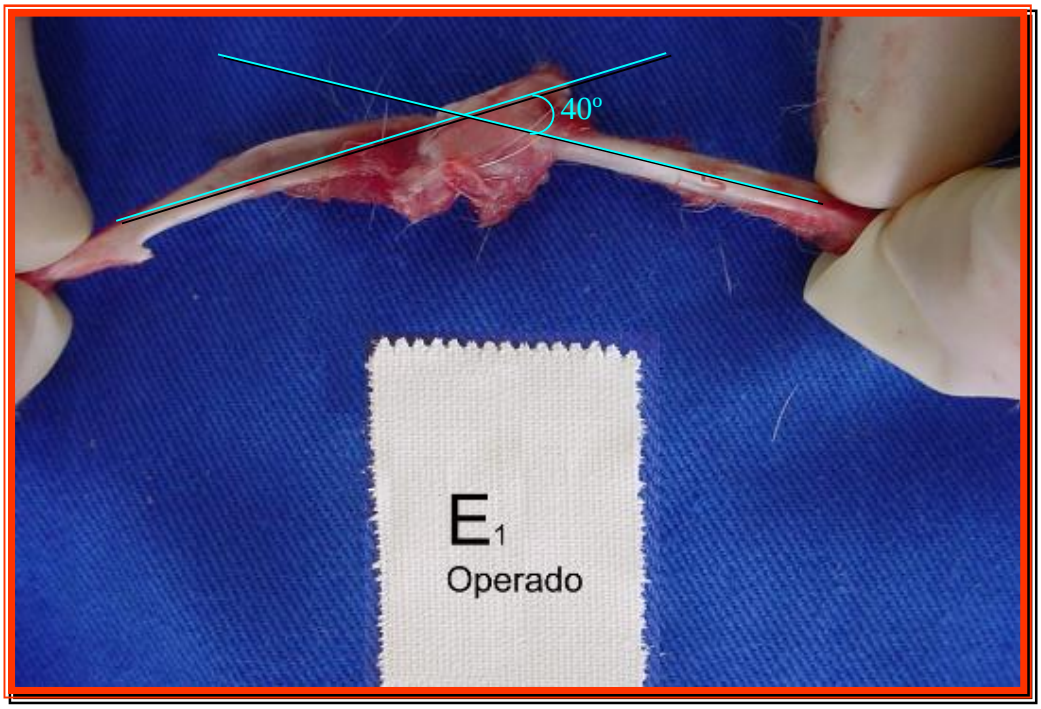


Figura 6 – Análise do ângulo de extensão máxima

3.2.6. Processamento das peças e das lâminas

As peças foram armazenadas em frascos de vidro identificados com solução de formol a 10% e enviadas para estudo anátomo-patológico. Todos os joelhos foram mantidos nessa solução por um dia e, a seguir, submetidos a desmineralização em ácido nítrico a 7,5% por dois a três dias. Após a inclusão em bloco de parafina, foram realizados dois cortes no plano frontal de cada 1/3 proximal de tíbia e de cada 1/3 distal de fêmur, sempre que possível no maior diâmetro bicondilar. Todas as lâminas, coradas em hematoxilina e eosina e Alcian-blue foram marcadas por códigos e analisadas por uma patologista que desconhecia a que grupo pertencia o

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

animal. As lesões encontradas foram registradas segundo um quadro de alterações artrósicas feito pela patologista do serviço de Patologia do IOT-HC-FMUSP, baseado nos trabalhos de sistema de graduação de MANKIN, conforme demonstrado no Tabela 01. A graduação da artrose foi determinada pela soma da pontuação correspondente às alterações encontradas em cada uma das duas lâminas de cada estrutura anatômica.

Outra observação importante é que as alterações encontradas foram analisadas de forma qualitativa (presente ou não) e não quantitativa. Uma vez presente, a pontuação correspondente era, então, atribuída.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 1 - Sistema de graduação de Mankin usado para avaliar o grau de lesão da cartilagem articular nos joelhos dos ratos.

Variável	Pontuação
Superfície	0=normal 1=irregular 2=fibrilação / vacúolos 3=bolhas e erosão
Hipocelularidade	0=normal 1=pequena diminuição de condrócitos 2=grande diminuição de condrócitos 3=sem células
Clones	0=normal 1=duplas ocasionais 2=duplas ou trincas 3=múltiplos ninhos de células
Alcianofilia territorial	0=normal 1=pequena diminuição na coloração 2=grande diminuição na coloração 3=sem coloração
Alcianofilia interterritorial*	0=normal 1=pequena diminuição na coloração 2=grande diminuição na coloração 3=sem coloração

* A alcianofilia interterritorial é avaliada nas camadas superficial, média profunda podendo a pontuação máxima chegar a 21.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Definimos como artrose Leve aquela que pontue até 6; Moderada entre 7 e 12; e Severa com ≥ 13 pontos ou havendo a presença de cisto subcondral. Esta graduação foi feita para a descrição dos resultados e não para sua análise.

Observação: Todos os joelhos retirados foram fotografados sem pele e após artrotomia com eversão da rótula para fins ilustrativos.

3.3. Os critérios de exclusão

Os ratos que apresentassem complicações do tipo infecção ou deiscência da cicatriz cirúrgica, que morressem, independentemente da causa, antes do término do período de experimentação do seu grupo ou que, ao exame anátomo-patológico, apresentassem alguma patologia que interferisse no metabolismo ósteo-cartilaginoso, foram excluídos do trabalho.

3.4. Análise estatística

Realizou-se estatística descritiva dos valores amostrais ordinais (quantitativos): média, desvio padrão, erro padrão da média, valores máximo e mínimo e número de casos.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Nas comparações entre as duas amostras ordinais relacionadas (pareadas), utilizou-se o teste de Wilcoxon e o teste de Kruskal-Wallis (análise de variância) para as comparações entre mais de duas amostras não-paramétricas. Já entre as amostras ordinais realizaram-se testes de correlação de Pearson e regressão linear.

Adotou-se o nível de significância de 5% (α = 0,05) e indicaram-se os resultados significantes com asterisco.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

4. RESULTADOS

O número de ratos permaneceu o mesmo desde o início até a eutanásia. Na dissecção das patas dos joelhos operados e não operados, observou-se macroscopicamente os ligamentos cruzados anteriores, posteriores e colaterais íntegros. Constatou-se degeneração da cartilagem articular, com formação de osteófitos, principalmente do lado medial dos joelhos operados (Fig.7). Não ocorreram fraturas no fêmur e na tíbia dos ratos de todos os grupos estudados. Por isso, conseguiu-se medir todos os ângulos de extensão máxima, tendo como base a diáfise da tíbia e a diáfise do fêmur (Quadro 02).

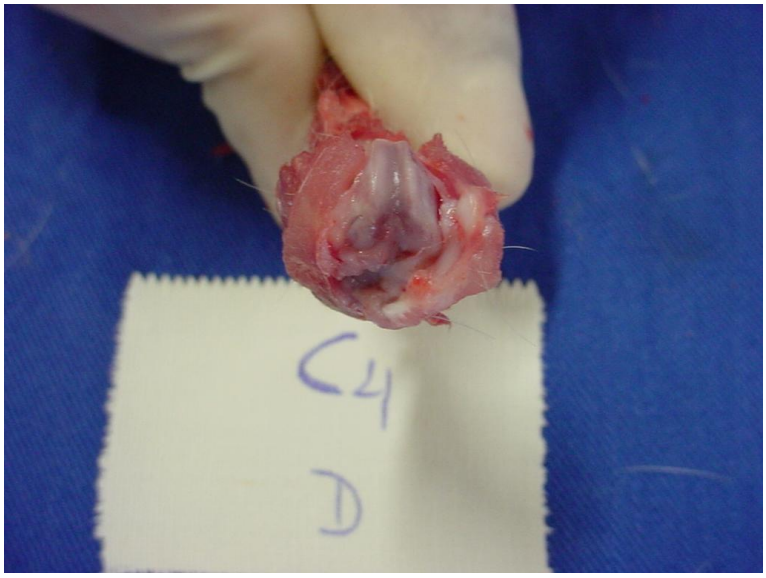


Figura 7- Visão macroscópica do joelho operado

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 2 – Medidas da extensão máxima dos joelhos em graus dos ratos dos grupos que tomaram glicosamina, diacereína e controle.

Grupo Glicosamina			Grupo Diacereína		
Ratos	Operados	Não Operados	Ratos	Operados	Não Operados
G1	35º	25º	D1	35º	20º
G2	45º	30º	D2	35º	20º
G3	35º	20º	D3	30º	20º
G4	40º	15º	D4	30º	15º
G5	40º	30º	D5	25º	15º
G6	30º	20º	D6	35º	20º
G7	30º	20º	D7	30º	15º
G8	30º	25º	D8	40º	25º
G9	50º	30º	D9	40º	25º
G10	50º	40º	D10	35º	25º
Média	38,5º	25,5º	Média	33,5º	20,0º

Grupo Controle		
Rato	Operado	Não Operado
C1	45º	35º
C2	55º	35º
C3	60º	45º
C4	50º	35º
C5	55º	40º
C6	45º	35º
C7	50º	40º
C8	60º	45º
C9	55º	40º
C10	60º	45º
Média	53,5º	39,5º

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 3 - Análise das médias dos ângulos de extensão máxima dos joelhos operados e não operados dos ratos do grupo controle que tomaram diacereína e glicosamina.

	Controle	Diacereína	Glicosamina
Operados	53,5º	33,5º	38,5º
Não operados	39,5º	20º	25,5º
Wilcoxon á=0,05	P=0,004*	P=0,005*	P=0,004*

Tabela 4 - Quantificação da artrose pelo sistema de Mankin (Grupo glicosamina).

Ratos	Lado	Local	S	H	C	Ta	la	Cistos	Pontos
G1	E	Tíbia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	2	-	-	-	-	-	2
G1	D	Tibia	3	2	1	-	-	-	6
		Fêmur	2	2	-	-	-	-	4
G2	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	2	-	-	-	-	-	2
G2	D	Tibia	3	2	1	-	-	-	6
		Fêmur	2	1	1	-	-	-	4
G3	E	Tibia	1	-	-	-	-	-	1
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
G3	D	Tibia	3	3	2	1	1	-	8
		Fêmur	3	1	1	-	-	-	5
G4	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
G4	D	Tibia	3	2	2	-	-	-	7
		Fêmur	2	2	-	-	-	-	4

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Ratos	Lado	Local	S	H	C	Ta	la	Cistos	Pontos
G5	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
G5	D	Tibia	3	2	1	-	-	-	6
		Fêmur	2	1	-	-	-	-	3
G6	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
G6	D	Tibia	3	2	2	-	-	-	7
		Fêmur	2	1	1	-	-	-	4
G7	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
G7	D	Tibia	3	1	1	-	-	-	5
		Fêmur	2	2	1	-	-	-	5
G8	E	Tibia	2	1	-	-	-	-	3
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
G8	D	Tibia	3	1	1	-	-	-	5
		Fêmur	2	1	-	-	-	-	3
G9	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
G9	D	Tíbia	3	3	-	-	-	-	6
		Fêmur	2	1	-	-	-	-	3
G10	E	Tíbia	2	-	-	-	-	-	2
		Fêmur	2	-	-	-	-	-	2
G10	D	Tibia	3	3	-	-	-	-	6
		Fêmur	2	2	-	-	-	-	4

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 5 –Quantificação da artrose pelo sistema de Mankin (Grupo diacereína).

Ratos	Lado	Local	S	H	C	Ta	Ia	Cistos	Pontos
D1	E	Tíbia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
D1	D	Tibia	3	2	2	-	-	-	7
		Fêmur	2	2	-	-	-	-	4
D2	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
D2	D	Tibia	3	2	1	-	-	-	6
		Fêmur	2	2	-	-	-	-	4
D3	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
D3	D	Tibia	2	2	1	-	-	-	5
		Fêmur	2	1	-	-	-	-	3
D4	E	Tibia	2	1	-	-	-	-	3
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
D4	D	Tibia	2	2	2	-	-	-	6
		Fêmur	2	1	-	-	-	-	3
D5	E	Tibia	1	-	-	-	-	-	1
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
D5	D	Tibia	2	1	1	-	-	-	4
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
D6	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
D6	D	Tibia méd.	3	2	-	-	-	-	5
		Fêmur	2	1	-	-	-	-	3
D7	E	Tibia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
D7	D	Tibia	3	2	1	-	-	-	6
		Fêmur	2	1	-	-	-	-	3

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Ratos	Lado	Local	S	H	C	Ta	la	Cistos	Pontos
D8	E	Tibia	1	-	-	-	-	-	1
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
D8	D	Tibia	2	2	2	-	-	-	6
		Fêmur	3	2	-	-	-	-	5
D9	E	Tibia	2	-	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
D9	D	Tíbia	3	2	-	-	-	-	5
		Fêmur	2	1	-	-	-	-	3
D10	E	Tíbia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
D10	D	Tibia	3	2	1	-	-	-	6
		Fêmur	2	2	-	-	-	-	4

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 6 – Quantificação da artrose pelo sistema de Mankin (Grupo controle).

Ratos	Lado	Local	S	H	C	Ta	Ia	Cistos	Pontos
C1	E	Tíbia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
C1	D	Tíbia	3	3	2	2	-	-	10
		Fêmur	3	2	1	-	-	-	6
C2	E	Tíbia	2	1	-	-	-	-	3
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
C2	D	Tíbia	3	3	3	2	-	-	11
		Fêmur	3	2	1	1	-	-	7
C3	E	Tíbia	2	1	-	-	-	-	3
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
C3	D	Tíbia	3	3	3	3	-	-	12
		Fêmur	3	3	3	-	-	-	9
C4	E	Tíbia	2	-	-	-	-	-	2
		Fêmur	1	-	-	-	-	-	1
C4	D	Tíbia	3	2	2	2	1	-	10
		Fêmur	3	2	1	2	1	-	9
C5	E	Tíbia	2	1	-	-	-	-	3
		Fêmur	2	1	-	-	-	-	3
C5	D	Tíbia	3	3	3	2	1	-	12
		Fêmur	2	1	1	-	-	-	8
C6	E	Tíbia	1	1	-	-	-	-	2
		Fêmur	2	-	-	-	-	-	2
C6	D	Tíbia	3	3	3	1	-	-	10
		Fêmur	2	2	2	-	-	-	6
C7	E	Tíbia	2	1	-	-	-	-	3
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
C7	D	Tíbia	3	3	2	2	2	-	12
		Fêmur	3	2	2	1	-	-	8

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Ratos	Lado	Local	S	H	C	Ta	Ia	Cistos	Pontos
C8	E	Tíbia	2	-	-	-	-	-	2
		Fêmur	2	-	-	-	-	-	2
C8	D	Tíbia	3	3	3	1	-	-	10
		Fêmur	3	2	1	-	-	-	6
C9	E	Tíbia	2	1	-	-	-	-	3
		Fêmur	1	1	-	-	-	-	2
C9	D	Tíbia	3	3	3	3	2	-	14
		Fêmur	2	1	1	-	-	-	9
C10	E	Tíbia	3	1	-	-	-	-	4
		Fêmur	2	-	-	-	-	-	2
C10	D	Tíbia	3	3	3	2	2	-	13
		Fêmur	3	3	1	1	1	-	9

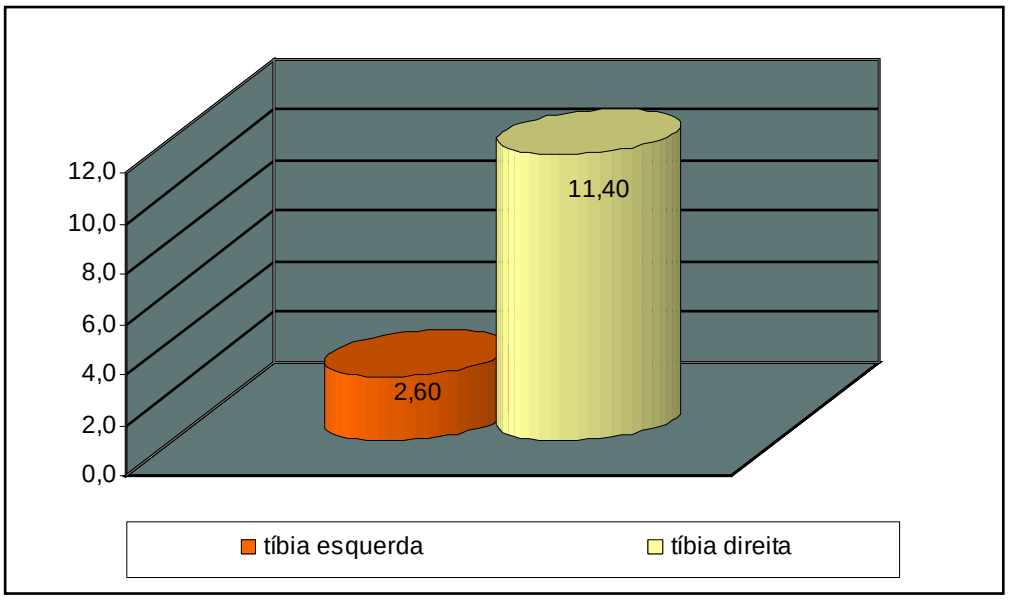
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 7 - Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias direitas (DIR) e esquerdas (ESQ) dos ratos do grupo Controle (meniscectomia + sacrifício com sete meses). Comparação pelo teste de Wilcoxon (α = 0,05).

	Tíbia direita	Tíbia esquerda
Média	11,40	2,60
Mediana	11,50	2,50
Desvio Padrão	1,430	0,699
Valor Mínimo	10	2
Valor Máximo	14	4
Número	10	10

P = 0,001*

Gráfico 1 - Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias direitas e esquerdas dos ratos do grupo controle (meniscectomia + sacrifício com sete meses).



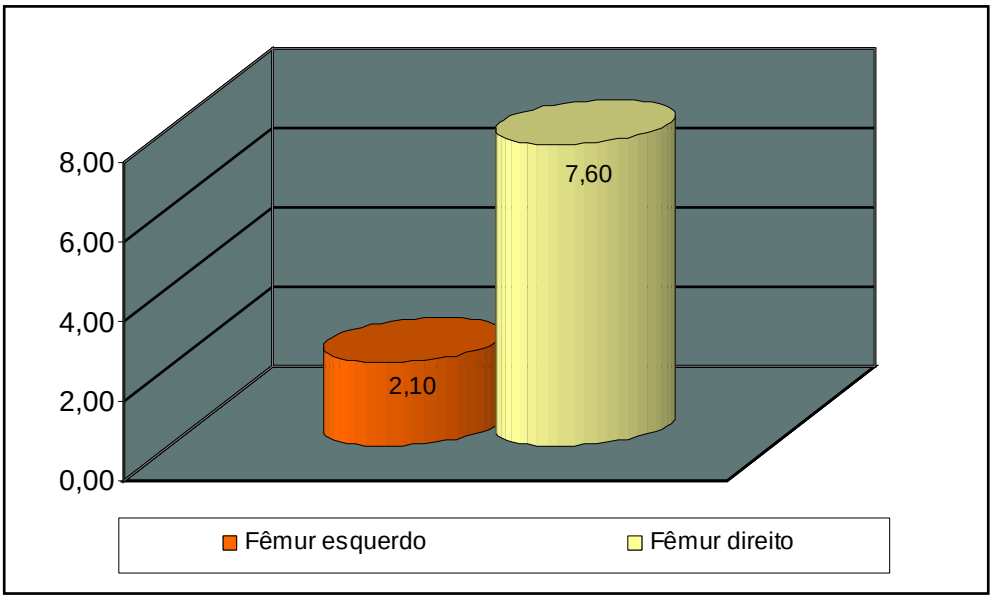
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 8 - Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os fêmures direitos (DIR) e esquerdos (ESQ) dos ratos do grupo controle (meniscectomia + sacrifício com sete meses). Comparação pelo teste de Wilcoxon (α = 0,05).

	Fêmur direito	Fêmur esquerdo
Média	7,60	2,10
Mediana	8,00	2,00
Desvio Padrão	1,265	0,568
Valor Mínimo	6	1
Valor Máximo	9	3
Número	10	10

P = 0,001*

Gráfico 2 - Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos fêmures direitos e esquerdos dos ratos do grupo controle (meniscectomia + sacrifício com sete meses).



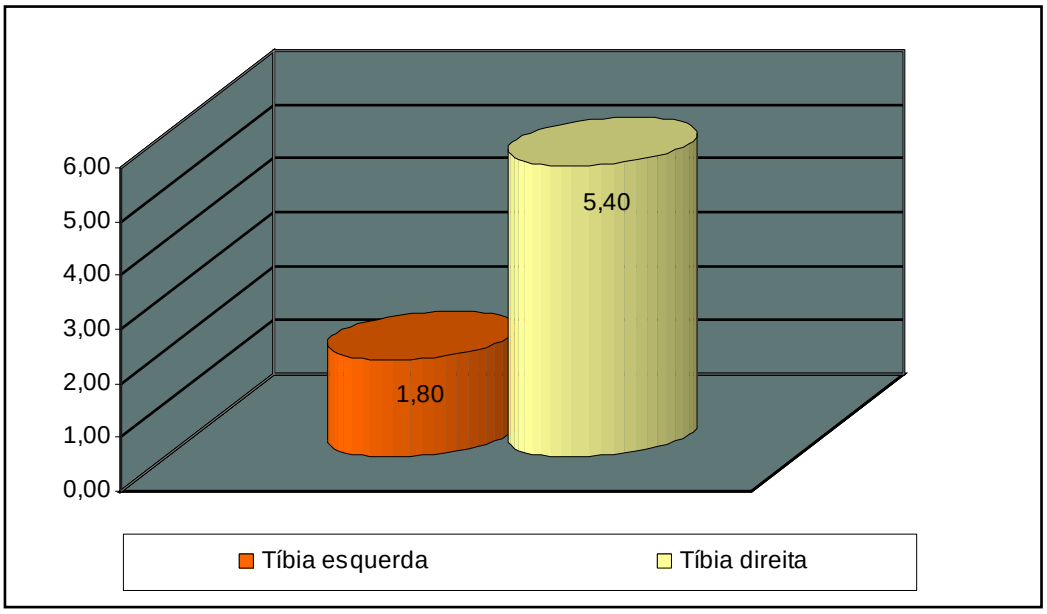
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 9 - Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias direitas (DIR) e esquerdas (ESQ) dos ratos do grupo que tomaram diacereína. Comparação pelo teste de Wilcoxon (α = 0,05).

	Tíbia direita	Tíbia esquerda
Média	5,40	1,80
Mediana	5,50	2,00
Desvio Padrão	0,966	0,632
Valor Mínimo	4	1
Valor Máximo	7	3
Número	10	10

P = 0,001*

Gráfico 3 - Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias direitas e esquerdas dos ratos do grupo que tomaram diacereína.



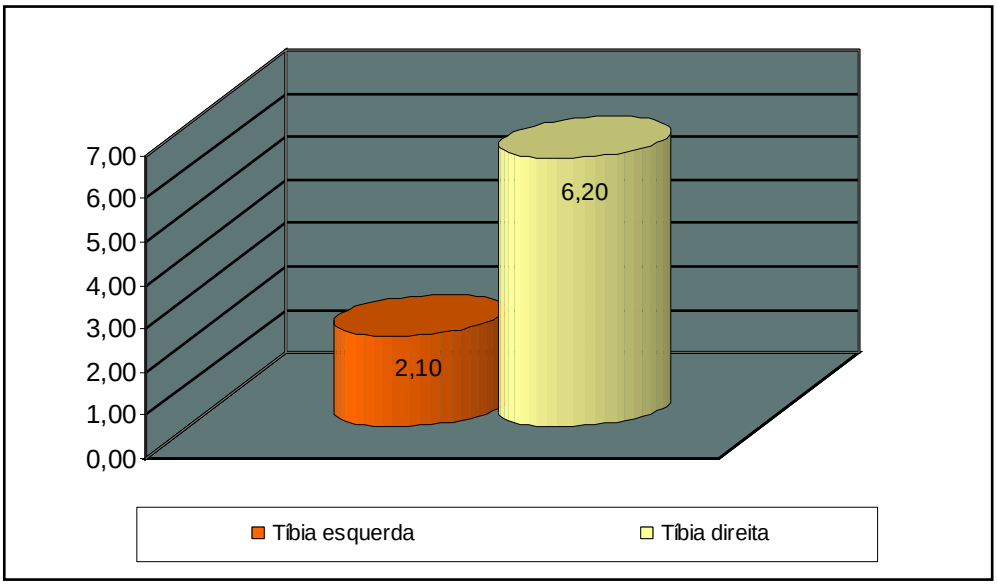
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 10 - Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias direitas (DIR) e esquerdas (ESQ) dos ratos do grupo do grupo que tomaram glicosamina. Comparação pelo teste de Wilcoxon (α = 0,05).

	Tíbia direita	Tíbia esquerda
Média	6,20	2,10
Mediana	6,00	2,00
Desvio Padrão	0,919	0,568
Valor Mínimo	5	1
Valor Máximo	8	3
Número	10	10

P = 0,001*

Gráfico 4 - Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias direitas e esquerdas dos ratos do grupo que tomaram glicosamina.



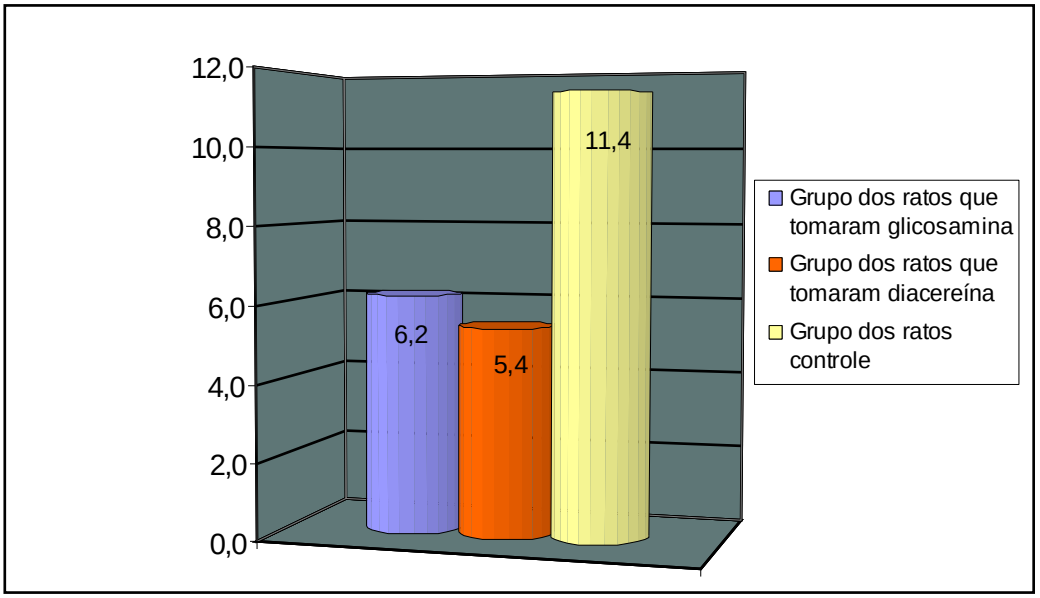
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 11 - Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias direitas (DIR) dos ratos do grupo do controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05).

	Grupo		
	Controle	Diacereína	Glicosamina
Média	11,40	5,40	6,20
Mediana	11,50	5,50	6,00
Desvio Padrão	1,430	0,966	0,919
Valor Mínimo	10	4	5
Valor Máximo	14	7	8
Número	10	10	10

P = 0,000*

Gráfico 5 - Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias direitas dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina.



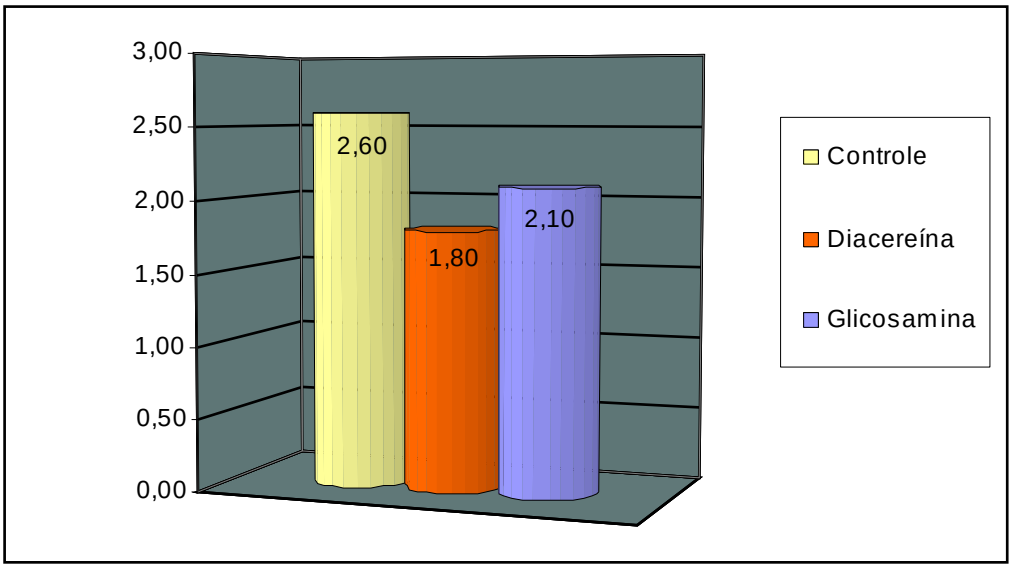
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 12 - Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre as tíbias esquerdas (ESQ) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05).

	Grupo		
	Controle	Diacereína	Glicosamina
Média	2,60	1,80	2,10
Mediana	2,50	2,00	2,00
Desvio Padrão	0,699	0,632	0,568
Valor Mínimo	2	1	1
Valor Máximo	4	3	3
Número	10	10	10

P = 0,037*

Gráfico 6 - Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas das tíbias esquerdas dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina.



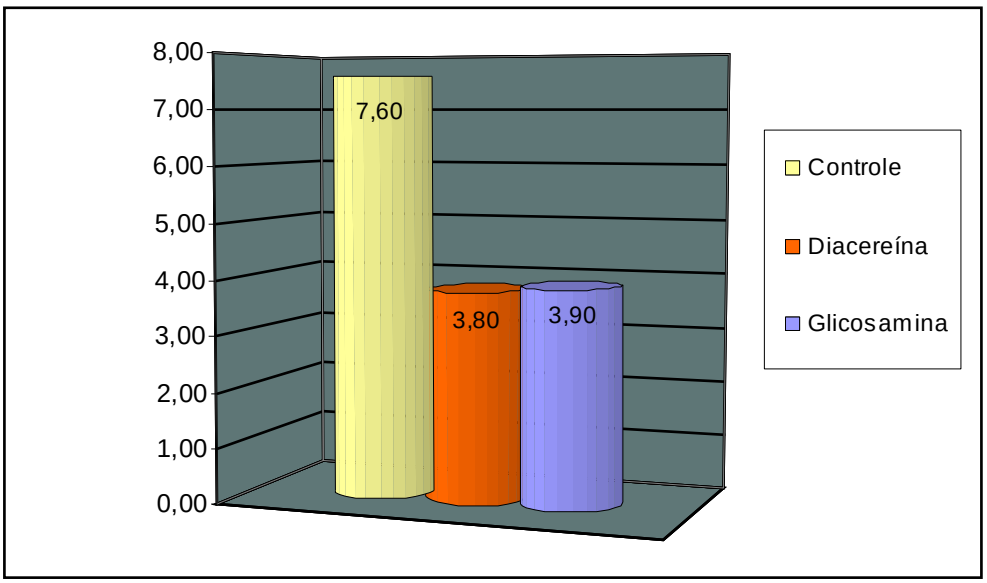
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 13 - Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os fêmures direitos (DIR) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05).

	Grupo		
	Controle	Diacereína	Glicosamina
Média	7,60	3,80	3,90
Mediana	8,00	4,00	4,00
Desvio Padrão	1,265	1,033	0,738
Valor Mínimo	6	2	3
Valor Máximo	9	5	5
Número	10	10	10

P = 0,000*

Gráfico 7 - Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos fêmures direitos dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina



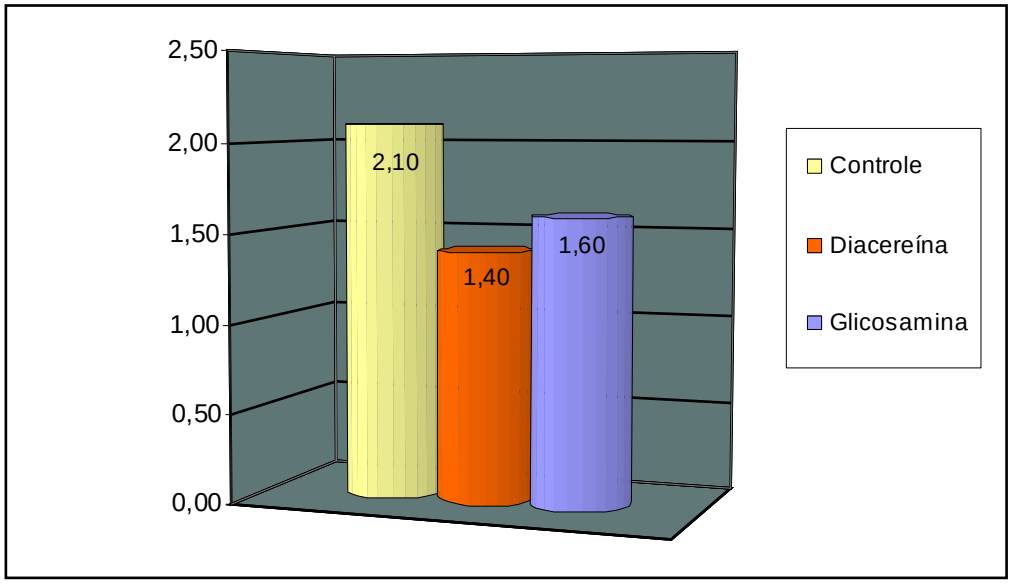
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 14: Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os fêmures esquerdos (ESQ) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05).

	Grupo		
	Controle	Diacereína	Glicosamina
Média	2,10	1,40	1,60
Mediana	2,00	1,00	2,00
Desvio Padrão	0,568	0,516	0,516
Valor Mínimo	1	1	1
Valor Máximo	3	2	2
Número	10	10	10

P = 0,038*

Gráfico 8 - Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos fêmures esquerdos dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina.



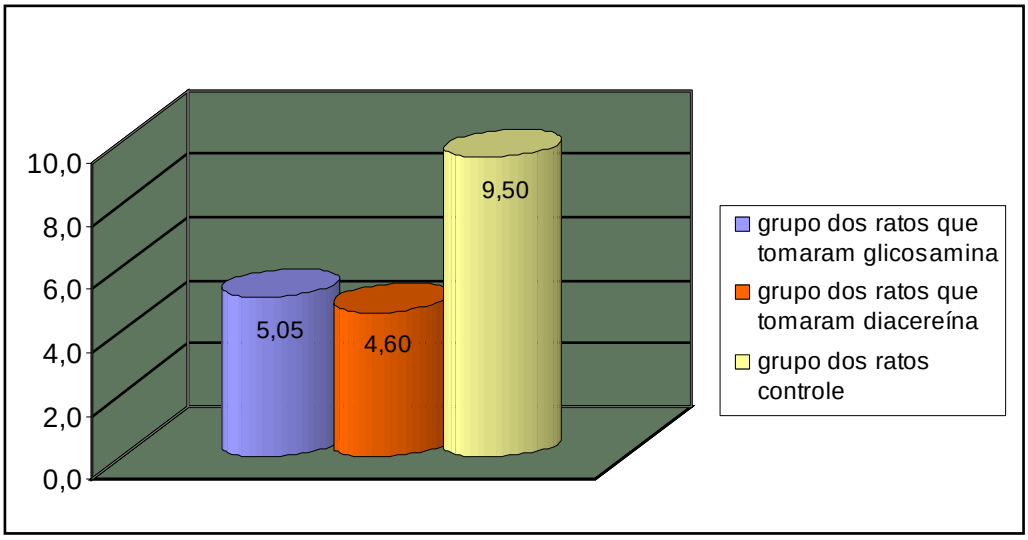
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 15 - Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os joelhos operados (DIR) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05).

	Grupo		
	Controle	Diacereína	Glicosamina
Média	9,50	4,60	5,05
Mediana	9,50	4,75	5,00
Desvio Padrão	1,291	0,843	0,685
Valor Mínimo	8	3	4
Valor Máximo	11,50	5,50	6,50
Número	10	10	10

P = 0,000*

Gráfico 9: Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos joelhos operados (DIR) dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina



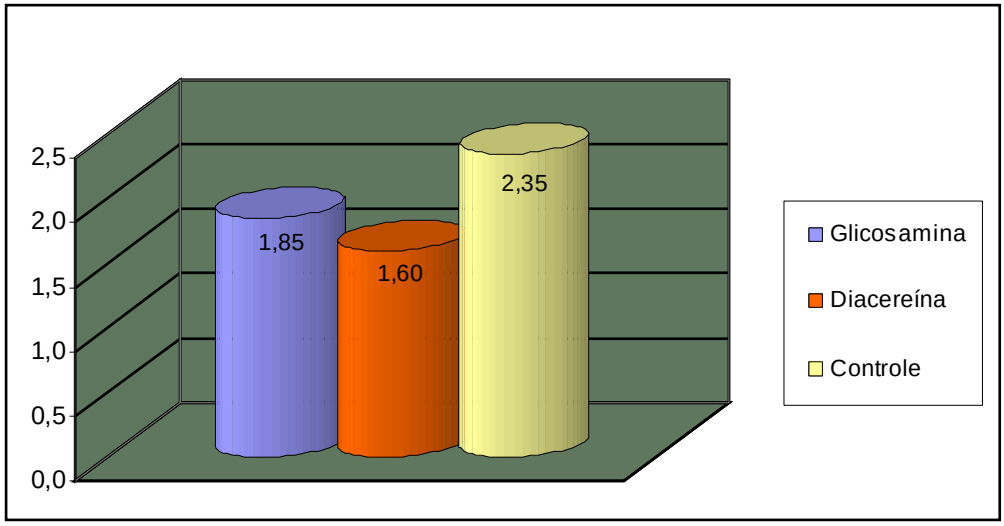
PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Tabela 16 - Estatística descritiva e comparação das alterações degenerativas entre os joelhos não operados (ESQ) dos ratos do grupo controle e dos que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05).

	Grupo		
	Controle	Diacereína	Glicosamina
Média	2,35	1,60	1,85
Mediana	2,50	1,75	2,00
Desvio Padrão	0,412	0,459	0,474
Valor Mínimo	1,50	1	1
Valor Máximo	3	2	2,50
Número	10	10	10

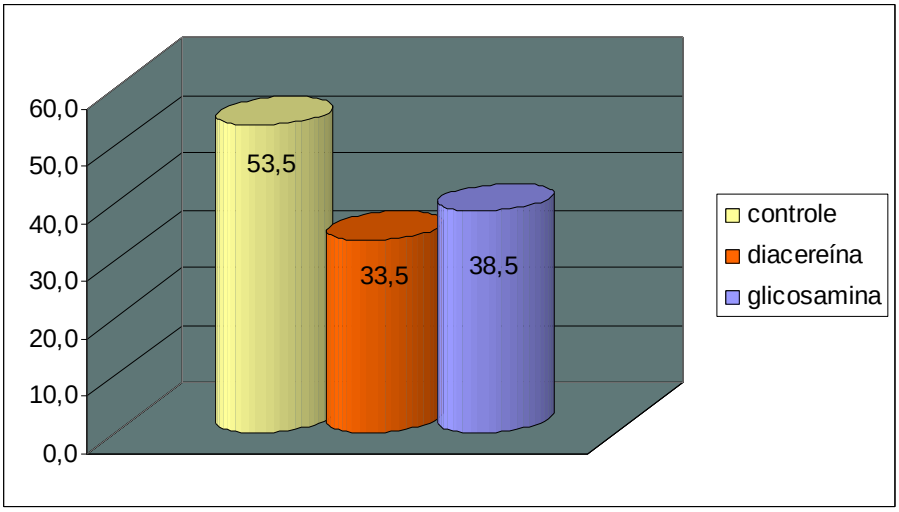
P = 0,003*

Gráfico 10 - Representação gráfica dos valores médios das alterações degenerativas dos joelhos não operados (ESQ) dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina.



PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Gráfico 11 - Representação gráfica dos valores médios dos ângulos de extensão máxima dos joelhos operados dos ratos do grupo controle e os que tomaram diacereína e glicosamina. Comparação pelo teste de Kruskal-Wallis (α = 0,05).



PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

5. DISCUSSÃO

A meniscectomia parcial ou total é hoje um dos modelos consagrados de artrose em animais de laboratório e podem reproduzir de maneira fidedigna as degenerações focais e relativamente lentas encontradas em seres humanos (Moskowitz, 1973; Lanzer e Komenda 1990)

No nosso estudo utilizamos um sistema prático de pontuação para comparações estatísticas baseado na progressão das alterações microscópicas da artrose, descrito por Mankin (1993), que iniciou com a análise da superfície apresentando-se desde normal, passando por irregular, fibrilação até erosão. .Em seguida, avaliamos a quantidade de condrócitos diminuídos (normal, pequena diminuição, grande diminuição e sem células). No terceiro passo, observamos a formação de clones de condrócitos e por último descrevemos a alcianofilia territorial e interterritorial.

A presença de cisto subcondral em geral sucede a degeneração mixóide da matriz cartilaginosa e está presente nos casos mais avançados de artrose, quando camadas inteiras estão ausentes ou completamente alteradas. Na presença desta e das demais alterações há uma artrose grave.Não coincidentemente uma alteração de pontuação menor ou igual a 2,5 caracteriza uma artrose leve, entre três e sete, moderada e, igual ou superior a 7,5, grave.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Pelos parâmetros citados acima, após o período de sete meses da meniscectomia medial total em joelhos de ratos Wistar, avaliamos os ratos do grupo controle e encontramos as maiores pontuações ou piores graus de artrose dos joelhos direitos operados em relação aos contra-laterais. Representados pelas comparações dos dados da tíbia operada em relação ao lado contra-lateral ($p=0.001^{*}$) (Tabela 7, Gráfico 1) e pelos dados do fêmur operado em relação ao não operado ($p=0.001^{*}$) (Tabela 8, Gráfico 2).

Obtivemos graus de artrose na tíbia operada semelhantes aos da literatura (Shapiro 1980; Ghosh et al., 1990; Rezende 2000) atingindo as camadas mais profundas da cartilagem.

Ghosh et al. (1990) e Rezende (2000) demonstraram alterações na cartilagem dos joelhos contra laterais (não operados) semelhantes as que encontramos no nosso trabalho. Provavelmente, o desgaste articular no joelho operado levou a sobrecarga mecânica dos joelhos não submetidos à meniscectomia. Apesar de HULTH et al. (1970) não encontrarem nenhuma alteração patológica no joelho contralateral de coelhos submetidos a meniscectomia medial, lesão de ambos os ligamentos cruzados e do colateral medial sacrificados entre cinco e 120 dias, Moskowitz et al. (1973) encontraram alterações histológicas no joelho contralateral; contudo, consideraram estes joelhos como controles normais, pelas alterações não excederem aquelas encontradas nos joelhos de coelhos normais. Bendele et al. (1996) mostraram que a patelectomia do joelho direito leva inicialmente a uma artrose mais grave do joelho contralateral (esquerdo) de cobaias, mas que mais tarde (um ano de pós-operatório) a artrose tende a ser grave bilateralmente. No nosso caso, a artrose não chegou a ser tão deletéria para o joelho contralateral; entretanto, mostrou sinais de degeneração.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Apesar do modelo experimental de meniscectomia em coelhos já ser consagrado há mais de duas décadas (Moskowitz et. al 1973; Colombo et. al, 1983), optamos pelo uso de ratos Wistar pela facilidade de manuseio do animal, bem como de manutenção de um maior número de animais (utilizamos um total de 30 animais). Outra razão é que coelhos saltam, não andam e correm como os ratos. A maioria dos estudos que apresentam bons resultados com ACP são em coelhos mantidos nas gaiolas (Shapiro 1980). Os que mostram resultados mais reservados são em carneiros (Ghosh 1990) e cães (Smith et al., 1998) que são animais maiores e liberados para a marcha.

Ratos machos foram escolhidos porque há controvérsia na literatura sobre a possibilidade de efeitos dos hormônios femininos na degeneração articular (Rosner et al., 1979) e adultos, pelo fato de ter ocorrido fechamento das cartilagens epifisárias. Segundo Silberberg (1960), o modelo experimental de artrose em ratos através da dieta rica em gorduras acentua a evolução da artrose e a intensidade pela qual se dá esta evolução dependendo da linhagem, sexo, idade de início e do tempo em que este regime é empregado. Assim, tentamos restringir ao máximo o número de variáveis que poderiam intervir nos resultados finais. O peso máximo para cada faixa etária foi limitado. Dessa forma, foram separados os ratos mais idosos do projeto impedindo que alterações degenerativas causadas pela idade avançada do animal ocorressem, apresentando um grupo adulto mais homogêneo.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Utilizamos um número de 10 animais para começarmos o estudo com pelo menos o dobro de animais previsto para dar margem de segurança, caso alguns animais adoecessem ou a droga não se mostrasse eficiente. Um limite mínimo de quatro animais por grupo pode demonstrar se as drogas são altamente eficazes (Colombo, 1983).

Em relação ao procedimento cirúrgico, não há possibilidade de se realizar a meniscectomia total sem a secção do ligamento colateral medial. Mesmo com a artrotomia, o uso de lupa ou de microscopia foi necessário. Como não desejávamos que a instabilidade fosse um dos componentes da degeneração articular, suturamos o ligamento colateral medial.

No período pós-operatório e de manutenção, todos os animais foram estimulados a deambular fora de suas gaiolas por um período de duas horas, três a quatro vezes por semana. A atividade física foi livre e estimulada pela oferta de doce de leite. Com essa prática, observamos maior degeneração articular em relação aos trabalhos que utilizaram modelos onde os animais ficaram restritos às suas gaiolas como nos modelos de coelhos (Shapiro 1980; Yoshimi 1994; Shimizu et al., 1998), Foram encontrados resultados semelhantes aos estudos que deixaram os animais livres (Schivianato et al., 1989) ou estimulados à atividade (Ghosh et al., 1993; Smith et al., 1998).

Realizamos o modelo experimental de meniscetomia, nos joelhos direitos de 10 ratos que denominamos controle, ou seja, não fizeram uso das medicações antiartrósicas e após sete meses, os animais foram

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

submetidos à eutanásia, suas patas dissecadas e encaminhadas à análise histopatológica. Idealmente, deveriam ser feitos cortes seriados da cartilagem de ambos os joelhos. Entretanto, isto seria completamente impraticável em função do número de animais que seriam incluídos no experimento. A seleção de cortes de áreas visualmente patológicas, infelizmente, é subjetiva e introduz vícios estatísticos inaceitáveis. Tentamos resolver este problema pelos cortes constantes na mesma área, bem como fazer os cortes sempre passando pelos maiores diâmetros bicondilares, na medida do possível no joelho do rato.

Segundo Colombo et al. (1983), a padronização do local para a realização das lâminas é um fator importante do ponto de vista estatístico, permitindo o uso de um número reduzido de animais caso as drogas sejam potentes.

O uso de coloração pelas técnicas de hematoxilina-eosina e alcian-blue foi escolhido, já que a artrose apresenta alterações histológicas de todas as camadas da cartilagem, a qual pode ser facilmente identificado por estas técnicas. (Mankin, 1993)

Uma vez que a determinação de desvio do aspecto “normal” na lâmina de microscopia é subjetiva, é importante que as lâminas sejam codificadas e avaliadas sem o conhecimento de qual procedimento foi realizado com o animal em questão. Todas as lâminas do estudo foram analisadas por um patologista que desconhecia a origem da lâmina.

Além de avaliar as alterações microscópicas, também fizemos uma análise macroscópica da amplitude de movimento dos joelhos

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

operados medindo o ângulo de extensão máxima (ângulo formado pelos eixo diafisário da tíbia e do fêmur). Observamos grande restrição da mobilidade articular, na tentativa de estender os joelhos, o que mostrou mais uma vez a eficácia do modelo de meniscectomia na produção de degeneração articular. Além disso, houve um envolvimento global da OA como espessamento da cápsula articular, sinovite e a formação de osteófitos. Como a via de acesso utilizada para a meniscectomia total dos joelhos foi relativamente grande para os animais, ocorreu também a rigidez por fibrose capsular e peri-capsular. Todos os joelhos operados apresentaram diminuição da amplitude de extensão do joelho em relação ao controle contra-lateral (não operados) (p=0,004*). Esta diferença foi em média 53,5 graus entre os joelhos operados e cerca de 39,5 graus no grupo não operado (Tabela 2).

Não foi possível comparar os resultados do ângulo de extensão com a literatura, pois os trabalhos avaliam as alterações microscópicas e bioquímicas da cartilagem, sem levar em conta o grau de rigidez articular.

Os ratos do grupo D receberam 50 mg/kg de diacereína diluída em leite condensado para tornar a mistura homogênea e para o rato não regurgitar a medicação (a dose foi fornecida pelo fabricante e está relacionada ao poder de absorção do animal). Os ratos fizeram o uso da medicação diariamente desde o terceiro mês até a véspera da data do sacrifício no sétimo mês de pós-operatório.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Na Tabela 9 e Gráfico 3, a tíbia direita dos ratos que tomaram diacereína, apesar de estatisticamente diferente do lado não operado (médias de 5,40 do lado operado e 1,80 do lado não operado, p=0,001*), apresentou um grau de artrose mais brando (mostraram somente diminuição do número de condrócitos), diferentemente do grupo controle que apresentou maior desgaste, ocorrendo clones de condrócitos. Aparentemente, a inibição da produção, bem como dos efeitos das IL-1, regride ou estaciona a progressão da artrose. A dose que usamos 50mg/kg/dia é considerada compatível e adequada à absorção e ao metabolismo acelerado dos ratos. Sendo assim, obtivemos resultados melhores do que outros trabalhos que realizaram lesões condrais por trauma direto e observaram a ação da diacereína em doses menores(Mazières 1993).

Bendele et al. (1996) aceleraram o modelo natural de artrose em cobaias submetidas a patelectomia e administraram diacereína na dose de 25 mg/kg/dia (metade da dose utilizada em nosso estudo) por quatro e por 12 meses. Esses autores encontraram uma artrose grave do joelho contralateral no quinto mês pós-operatório, cujo efeito benéfico da diacereína não se comprovou estatisticamente. Entretanto, após um ano de tratamento, os animais apresentaram lesões semelhantes entre os joelhos direito e esquerdo. Trabalhos que avaliaram a eficácia da diacereína na dose de 15 a 20 mg/kg não conseguiram impedir a progressão do modelo acelerado de artrose em cães após secção do LCA duas semanas depois de uma ganglionectomia L4-S1 ipsilateral

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

(BRANDT et al.1997), mas conseguiu retardar a progressão da artrose também em cães causada pela lesão isolada do LCA (SMITH et al., 1998).

Ao avaliarmos os ângulos obtidos na extensão máxima do grupo de ratos que tomaram diacereína, observamos que os joelhos operados tiveram pior amplitude (média $33,5^0$) em relação aos não operados (média 20^0) $p=0.005^*$. Porém, ao compararmos com os joelhos submetidos a meniscectomia do grupo controle (média 53,5 graus), o grupo que fez uso da diacereína apresentou melhores resultados na mobilidade articular.

A glicosamina é um substrato para a produção de glicosaminoglicanos e proteoglicanos pelas células da cartilagem. Teoricamente, sua ingestão aumentaria a regeneração da cartilagem articular e, conseqüentemente, a amplitude de movimento.

Os ratos do grupo G receberam 40 mg/kg de glicosamina diluída em leite condensado com o mesmo objetivo e período dos ratos do grupo D.

A Tabela 10 e Gráfico 4 mostram que a glicosamina conseguiu proteger a tíbia do lado operado, havendo grande retardo da degeneração do lado não operado, ou seja, ocorreu uma proteção da cartilagem do lado contra-lateral com diferença estatisticamente significante entre os lados operado e não operado (médias de 6,20 do lado operado e 2,10 do lado não operado) (p=0.001*). Nossos resultados foram similares aos trabalhos na literatura que provaram o papel da

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

glicosamina na inibição da OA, bloqueando as metilproteases, óxido nítrico, fator de necrose tumoral, não atuando diretamente na ciclooxigenase (Vidal et al., 1978; Sandy et al., 1998).

Avaliando os ângulos obtidos na extensão máxima do grupo de ratos que tomaram glicosamina, observamos que os joelhos operados tiveram pior amplitude (média 38,5 graus) em relação aos não operados (média 25,5 graus) p=0.004*. Porém, ao compararmos os joelhos submetidos à meniscectomia do grupo controle (média $53,5^0$) em relação ao grupo que fez uso a glicosamina, tivemos melhores resultados na mobilidade articular do grupo que fez uso da droga (média $38,5^0$).

A Tabela 11 e o gráfico 5 comparam as alterações histológicas encontradas nas tíbias direitas (lado operado) dos três grupos e mostram através do teste de Kruskal-Wallis que estes também são estatisticamente diferentes (p = 0,000*). Na tíbia operada, as piores alterações foram encontradas no grupo controle (modelo experimental da artrose causada pela meniscectomia) com média de 11,40. Este grupo mostrou-se significativamente diferente dos outros dois grupos.

Ao compararmos a ação da diacereína com a glicosamina na degeneração articular da tíbia direita, observamos efeitos das duas drogas na condroproteção articular e os resultados entre a diacereína (média 5,40) em relação a glicosamina (média 6,20) foram semelhantes sendo estatisticamente não significantes. Ocorreram alterações histológicas como diminuição dos números de condrócitos, fibrilações e fissuras. Os valores foram inferiores aos ratos que não fizeram o uso

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

das medicações (grupo controle), estes apresentaram graus de artrose piores, pois tiveram grande diminuição do número de células da cartilagem, clones de condrócitos,fissuras e exposição do osso subcondral. Os resultados apresentados confirmaram a eficácia das drogas no retardo da degeneração articular, apesar de não haverem diferenças entre elas nos cortes histológicos.

Na literatura, não há trabalhos comparando o efeito condroprotetor terapêutico entre a glicosamina e diacereína em modelo experimental de artrose, por isso não podemos confrontar os nossos dados com outros autores.

As tabelas 12 e o gráfico 6 comparam as alterações histológicas encontradas nas tíbias esquerdas (lado não operado) dos três grupos e, encontramos as piores alterações no grupo controle. Novamente, não houve diferença estatística entre os dois condroprotetores com a média de artrose 1,80 para o grupo da diacereína e 2,10 para o grupo da glicosamina. Observamos menores alterações degenerativas do lado não operado (ESQ.) em relação ao operado (DIR.). Semelhantes resultados foram observados na literatura traduzindo o efeito condroprotetor sistêmico das drogas.(Rezende 2000; Raiss 1985) Aparentemente, existe uma tendência da diacereína e glicosamina impedir a progressão da degeneração de uma articulação previamente saudável submetida à sobrecarga por uma meniscectomia contra-lateral. Se tivéssemos dois grupos não operados que recebessem diacereína e glicosamina oral, e estes mostrassem melhor pontuação histológica,

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

poderíamos então dizer que as mesmas também protegem contra o envelhecimento biológico, porém não administramos as duas medicações a ratos não operados.

Também comparamos os cortes histológicos dos fêmures operados e não operados em relação às tíbias operadas e não operadas entre os três grupos.. Com a somatória dos graus de artrose obtido no fêmur e tíbia, obtivemos um resultado global de degeneração articular dos joelhos operados e não operados; então, pelo teste de Kruskall-Wallis comparamos, primeiramente, os joelhos operados dos três grupos e observamos grande diferença estatística entre o grupo controle (média 9,50) e os grupos diacereína (média 4,60) e glicosamina (média 5,05). Novamente, a diacereína protegeu a cartilagem articular mais do que a glicosamina, mas sem diferença estatística.

Em todos os grupos, os joelhos não operados tiveram menor desgaste em relação aos operados, sendo que o grupo controle apresentou maior OA do que os grupos dos condroprotetores, confirmando o efeito terapêutico sistêmico das drogas nos joelhos contralaterais. Estudos não comparativos testando a eficácia da diacereína e glicosamina em modelos experimentais de artrose apresentaram resultados semelhantes ao nosso trabalho, ao avaliarem a ação isolada da diacereína(Brandt et al. 1997;Smith et al. 1999 e Hwa et al. 2001) e glicosamina (Vidal et al. 1978 e Sandy et al. 1998).

No gráfico 11, verificamos a ação das medicações entre si e em relação ao grupo controle medindo o ângulo de extensão máxima dos

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

joelhos operados. A finalidade desta análise foi observar a diferença entre a mobilidade articular de cada grupo. Os resultados mostraram grande restrição da extensão do grupo controle (média $53,5^0$) em relação aos grupos das medicações (média 36^0). Mas os joelhos dos ratos que tomaram diacereína tiveram menor rigidez e, a amplitude de extensão (média $33,5^0$) foi melhor que os dos ratos que fizeram uso da glicosamina (média $38,5^0$).

Neste estudo, observamos o desequilíbrio mecânico causado pela meniscectomia através de uma ampla via de acesso, com uma degeneração articular que foi controlada pelo uso de dois condroprotetores de diferentes ações, em doses altas e usos contínuos, introduzidos numa fase inicial da OA.

Provavelmente, a melhor eficácia da diacereína em relação a glicosamina na mobilidade articular, se deu por uma maior ação da diacereína inibindo a resposta inflamatória das citocinas na sinóvia, cápsula articular e tecidos adjacentes pelo bloqueio da IL1,e também pela diminuição da atividade da colagenase. mostrado por Brandt et al. (1997) e Ghosh et al.(1993).

A glicosamina administrada oralmente aos ratos, não apresentou sinais de toxicidade, resultados semelhantes aos estudos de Setnikar et al.(1991).

A diacereína também mostrou-se segura não havendo óbitos ou efeitos colaterais nos animais estudados, os mesmos dados foram encontrados por Pelletier (1993).

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

Apesar de existirem na literatura, inúmeros estudos experimentais e clínicos com as medicações que diminuem a degeneração articular, muitas dúvidas ainda são levantadas pelos profissionais da saúde e pesquisadores, como a dosagem ideal, o período de tratamento, os exames que poderiam ser utilizados para avaliarmos com precisão a ação das drogas. Desta forma, mais trabalhos clínicos, a longo prazo, com grande casuística seriam necessários para obtermos mais informações do mecanismo de ação e da eficácia terapêutica dos condroprotetores.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

6.CONCLUSÕES

- O uso terapêutico da diacereína e glicosamina diminuiu a rigidez articular e retardou a progressão da artrose.

- A diacereína atuou melhor na mobilidade articular do que a glicosamina, porém não houve diferença estatística entre as duas drogas no controle da degeneração articular.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABATANGELO, G.; BOTTI, P.; DEL BUE, M.; GEI, G.; SAMSON, J. C.; CORTIVO, R.; DE GALATEO, A.; MARTELLI, M. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the pond-nuki experimental model of ostearthritis in dogs. I. biochemical results. Clin. Orthop., n. 241, p. 278-85, 1989.

ADAMS, M. E. An analysis of clinical studies of the use of crosslinked hyaluronan, hylan, in the treatment of osteoarthritis. J. Rheumatol., v. 20, p. 16-8, 1993. Supplement 39.

ALTMAN, R.; BRANDT, K.;HOCHBERG, M.;MOSKOWITZ, R. Design and conduct of clinical trials of patients with osteoarthritis: Recommendations for a task force of the osteoarthritis research society. Osteoarthritis and Cartilage, v.4, p. 217-43, 1996.

AYDELOTTE, M.B.; KUETTNER, KE. Heterogeneity of articular cartilage. In: WOESSNER, J.F.; HOWELL, DS. Eds. Joint cartilage degradation. Dekker M Inc. New York, p. 139-58, 1993.

AUER, J. A.; FACKELMAN, G. E.; GINGERICH, D. A.; FETTER, A. W. Effect of hyaluronic acid naturally occuring and experimentally induced osteoarthritis. Am. J. Vet. Res., v. 41, p. 568-74, 1980

BALAZS, E. A. The physical properties of the synovial fluid and the special role of hyaluronic acid. In: HELFET, A. Disorders of the knee., Philadelphia, Lippincott, 1974. p. 63-75.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

BECCERICA, E.; FERRETTI, G.; CURATOLA, G.; CERVINI, C. Diacetylrhein and rhein: *in* vivo and *in vitro* effect on lymphocyte membrane fluidity. Pharmacol. Res., v. 22, p. 277-85, 1990.

BENDELE, A. M.; HULMAN, J. F. Effects of body weight restriction on the development and progression of spontaneous osteoarthritis in guinea pigs. Arthritis Rheum., v. 34, p. 1180-4, 1991.

BENDELE, A.M., *et al*., [Beneficial effects of treatment with diacerhein in guinea pigs with osteoarthritis]. Rev Prat. v. 46(6 Spec No), p. S35-S39, 1996.

BOITTIN, M.; RÉDINI, F.; LOYAU, G.; PUJOL, J. P. Effect de la diacerhéine (art50®) sur la synthèse de la matrice et la sécrétion de collagénase par des chondrocytes articulaires de lapin en culture. Rev. Rhum., v. 60, p. 68-76, 1993. Supplement.

BRANDT, K. D.; MANKIN, H. J. Pathogensis of osteoarthritis. In: KELLEY, W. N.; HARRIS, E. D., Jr.; RUDDY, S.; SLEDGE, C. B. Textbook of rheumatology. 4. ed. Philadelphia, Saunders, 1993. p. 1355-84. (Section XV – Osteoarthritis and Polychondritis).

BRANDT, K. D.; SMITH, G.; KANG, S. Y.; MYERS, S.; O'CONNOR, B.; ALBRECHT, M. Effects of diacerhein in an accelerated canine model of osteoarthritis. Osteoarthritis Cart., v. 5, p. 438-49, 1997.

BUCKWALTER,J.A.; STANISH, W. D.; ROSIER, R.N. The increasing need for nonoperative treatment of patients with osteoarthritis. Clinical Orthopaedics. v. 385, p. 36-45, 2001

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

BUTLER, M.; COLOMBO, C.; HICKMAN, L.; O'BYRNE, E.; STEELE, R.; STEINETZ, B.; QUINTAVALLA, J.; YOKOYAMA, N. A new model of osteoarthritis in rabbits. III. evaluation of anti-ostheoarthritic effects of selected drugs administered intraarticularly. Arthritis Rheum., v. 26, p. 1380-6, 1983.

CALKINS, E. Geratrics and the reumathic diseases in Ruddy. Kelley's Textbook of Rheumatology. 6th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2001.

CARNEY, S. L.; HICKS, C. A.; TREE, B.; BROADMORE, R. J. An in vivo investigation of the effect of anthraquinones on the turnover of aggrecans spontaneous osteoarthritis in the guinea pig. Inflamm. Res., v. 44, p. 182-6, 1995.

CHAMPION, B. R.; POOLE, A. R. Immunity to homologous type III collagen after partial meniscectomy and sham surgery in rabbits. Arthritis Rheum., v. 25, p. 274-87, 1982.

COLOMBO, C.; BUTLER, M.; HICKMAN, L.; SELWYN, M.; CHART, J.; STEINETZ, B. A new model of osteoarthritis in rabbits. II. evaluation of anti-osteoarthritic effects of selected antirheumatic drugs administered systemically. Arthritis Rheum., v. 26, p. 1132-9, 1983.

COX, J. S.; NYE, C. E.; SCHAEFER, W. W.; WOODSTEIN, I. J. The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dogs' knees. Clin. Orthop., n. 109, p. 178-83, 1975.

CS-SZABO, G.; ROUGHLEY, P.J.; PLAAS, AHK; GLANT, T.T. Large and small proteoglycans of osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. Arthritis Rheum. v. 5, p. 660-68, 1995.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

DEL ROSSO, M.; FIBBI, G.; MAGNELLI, L.; PUCCI, M.; DINI, G.; GRAPPONE, C.; CALDINI, R.; SERNI, U.; COLOMBO, F.; BORELLA, F. Modulation of urokinase receptors on human synovial cells and osteoarthritic 24.chondrocytes by diacetylrhein. Int. J. Tissue React., v. 12, p. 91-100, 1990.

DIEPPE, P.; CUSHNAGHAM, J.; JASANI, MK.;WATT, I. A two year, placebo controlled trial of nonsteroid antiflamatory therapy in osteoarthritis of the knee joint. Br J Rheumatol, v.32, p. 595-600, 1993.

DOUGADOS M. *et al*. Evaluation of the structure-modifying effects of diacerein in hip osteoarthritis. Echodiah, a three-year, placebo-controlled trial. Art Rheum., v. 44(11), p. 2539-47, 2001.

DOUGADOS M. *et al*. The Group for the Respect of Ethics and Excellence in Science. Recommendations for the registration of drugs used in the treatment of osteoarthritis. Ann Rheum Dis. v. 55, p. 552-57, 1996.

FAGNANI, F.; BOUVENOT,G.; VALAT, J.P.; BARDIN,T. Medico-economic analysis of diacereína with or without standard therapy in the treatment of osteoarthritis. Cemka, Bourg la Reine, France.

FENTON, L.; CHLEBEK, B. A.; PETERS, T.L.; CARON, J.P.; ORTH, M.W. Glucosamine Hcl reduces equine articular cartilage degradation in explan culture. Osteoarthritis and Cartilage (2000) 8, 258-265

FORRESTER, J. V.; LACKIE, J. M. Effect of hyaluronic acid on neutrophil adhesion. J. Cell. Sci., v. 50, p. 329-44, 1981.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

GHOSH, P.; READ, R.; NUMATA, Y.; SMITH, S.; ARMSTRONG, S.; WILSON, D.; The effects of intraarticular adminstration of hyaluronan in a model of early osteoarthritis in sheep. II. Cartilage composition and proteoglycan metabolism. Semin. Arthritis Rheum., v. 22, p. 31-42, 1993. Supplement.

GHOSH, P.; SUTHERLAND, J.; BELLENGER, C.; READ, R.; DARVODELSKY, A. The influence of weight-bearing exercise on articular cartilage of meniscectomized joints. an experimental study in sheep. Clin. Orthop., n. 252, p. 101-13, 1990.

GINGERICH, D. A.; AUER, J. A.; FACKELMAN, G. E. Force plate studies on the effect of exogenous hyaluronic acid on joint function in equine arthritis. J. Vet. Pharmacol. Ther., v. 2, p. 291-8, 1979.

GINGERICH, D. A.; AUER, J. A.; FACKELMAN, G. E. Effect of exogenous hyaluronic acid on joint function in experimentally induced equine osteoarthrits: dosage titration studies. Res. Vet. Sci., v. 30, p. 192-7, 1981.

GOTOH, S.; ONAYA, J. I.; ABE, M.; MIYAZAKI, K.; HAMAI, A.; HORIE, K.; TOKUYASU, K. Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. Ann. Rheum. Dis., v. 52, p. 817-22, 1993.

GUCCIONE, A.A.; FELSON, D.T.;ANDERSON, J.J. The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. J Am Public Health. v. 84, p. 351-358, 1994.

HULTH, A.; LINDBERG, L.; TELHAG, H. Experimental osteoarthritis in rabbits. preliminary report. Acta Orthop. Scand. v. 41, p. 522-30, 1970.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

HWA, S.Y.; BURKHARDT, D.; LITTLE, C.; GHOSH, P. The effects of orally administered diacerein on cartilage and subchondral bone in an ovine model of osteoarthritis. J Rheumatol 28:825-834, 2001.

KARZEL, K.; DOMENJOZ, R.; Effects of hexosamine derivatives and uronic acid derivatives on glycosaminoglycane metabolism of fibroblast cultures. Pharmacology. v.5, p. 337, 1971.

KATO, Y.; MUKUDAI, Y.; OKIMURA, A.; SHIMAZU, A.; NAKAMURA, S. Effects of hyaluronic acid on the release of cartilage matrix proteoglycan and fibronectin from the cell matrix layer of chondrocyte cultures: interactions between hyaluronic acid and chondroitin sulfate glycosaminoglycan. J. Rheumatol., v. 22, p. 158-9, 1995. Supplement 43.

KRAUSE, W. R.; POPE, M. H.; JOHNSON, R. J.; WILDER, D. G. Mechanical changes in the knee after meniscectomy. J. Bone Joint Surg.[Am], v. 58, p. 599-604, 1976.

KUTZIM, H; UBER C-markiertes glukosamin. Report of the nuclear medicine laboratory. Bonn, Germany, University Clinic of Bonn, 1970.

LANZER, W. L.; KOMENDA, G. Changes in articular cartilage after meniscectomy. Clin. Orthop., n. 252, p. 41-8, 1990.

LA VILLA, G.; MARRA, F.; LAFFI, G.; BELLI, B.; MEACCI, E.; FASCETTI, P.; GENTILINI, P. Effects of rhein on renal arachidonic acid metabolism and renal function in patients with congestive heart failure. Eur. J. Clin. Pharmacol., v. 37, p. 1-5, 1989.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

LEQUESNE, M. Symptomatic slow-acting drugs in osteoarthritis: a novel therapeutic concept? Rev Rheum. v. 61, p.1.517-27, 1994.

LOPES, VAZ A. Double-bilnd clinical evalution of the relative efficacy of ibuprofen and glucosamine sulphate in the management of osteoarthrosis of the knee in out-patients. Curr Med Res Opin. v. 8, p. 145, 1982.

MARSHALL, J. L. Periarticular osteophytes. Initiation and formation in the knee of the dog. Clin. Orthop., n. 62, p. 37-47, 1969.

MARTEL-PELLETIER, J.; MINEAU, F.; JOLICOEUR, F. C.; CLOUTIER, J. M.; PELLETIER, J. P. *In vitro* effects of diacerhein and rhein on interleukin-1 and tumor necrosis factor-α systems in human ostearthritic synovium and chondrocytes. J. Rheumatol., v. 25, p. 753-62, 1998.

MAYOR, M. D.; MOSKOWITZ, R. W.: Metabolic studies in experimentally-induced degenerative joint disease in the rabbit. J. Rheumatol., v. 1, p. 17-23, 1974.

MAZIÈRES, B.; BERDAH, L.; THIÉCHART, M.; VIGUIER, G. Étude de la diacetylrheine sur un modèle post-contusif d'arthrose expérimentale chez le lapin. Rev. Rheum. [Ed. Fr.], v. 60, p. 77-81, 1993. Supplement.

MAZIÈRES, B.; BLANCKAERT, A.; THIÉCHART, M.; VIGUIER, G. La diacerhéine administrée "curativement" dans un modèle expérimental d'arthrose post-contusive chez le lapin. Rev. Prat., v. 46, p. 42-5, 1996. Supplement 19.

MCALINDON, T. E.; LAVALLEY, M.P.; GULIN J.P.; FELSON D.T. Glucosamine and chondroitin treatment for osteoarthritis. A systematic

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

quality assessment and meta-analysis. JAMA. v. 283, P. 1469-1475, 2000.

MCDEVITT, C. A.; MUIR, H. Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog. J. Bone Joint Surg. [Br], v. 58, p. 94-101, 1976.

MEHRABAN, F.; KUO, S. Y.; RIERA, H.; CHANG, C.; MOSKOWITZ, R. W. Prostromelysin and procollagenase genes are differentially up-regulated in chondrocytes from the knees of rabbits with experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum., v. 37, p. 1189-97, 1994.

MIAN, M.; AZZARÀ, A; BENETTI, D.; RUOCCO, L.; BERTELLI, A.; AMBROGI, F. Studies “in vitro” of the effects of rhein on the chemotaxis of human leukocytes. Int. J. Tissue React., v. 9, p. 459-63, 1987.

MIAN, M.; BENNETTI, D.; ROSINI, S.; FANTOZZI, R. Effects of diacerhein on the quantity and phagocytic activity of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages. Pharmacology, v. 39, p. 362-6, 1989.

MIAN, M.; BENNETTI, D.; ROSINI, S.; FANTOZZI, R. Rhein reduces proteglycan loss during the autolytic breakdown of cultured cartilage. Int. J. Tissue React., v. 11, p. 117-22, 1989.

MIAN, M.; BRUNELLESCHI, S.; TARLI, S.; RUBINO, A.; BENETTI, D.; FANTOZZI, R.; ZILLETTI, L. Rhein: an anthraquinone that modulates superoxide anion production from human neutrophils. J. Pharm. Pharmacol., v. 39, p. 845-7, 1987.

MIAN, M.; TROMBI, L.; ROSINI, S.; BENETTI, D.; CARACCIOLO, F.; CARULLI, G.; AZZARÀ, A; AMBROGI, F. Experimental studies on diacerhein: effects on the phagocytosis of neutrophil cells from

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

subcutaneous carrageenan-induced exudate. Drugs Exp. Clin. Res., v. 13, p. 695-8, 1987.

MOON, M. S.; WOO, Y. K; KIM, Y. I. Meniscal regeneration and its effects on articular cartilage in rabbit knees. Clin. Orthop., n. 227, p. 298-304, 1988.

MOORE, A. R.; GREENSLADE, K. J.; ALAM, C. A. S.; WILLOUGHBY, D. A. Effects of diacerhein on granuloma induced cartilage breakdown in the mouse. Osteoarthritis Cart., v. 6, p. 19-23, 1998.

MORIGA, M.; AONO, M.; MURAKAMI M.; UCHINO, H. The activity of Nacetylglucosamine kinase in rat gastric mucosa. Gastroenterol Jpn. v. 15, p. 7, 1980.

MOSKOWITZ, R. W.; DAVIS, W.; SAMMARCO, J.; MARTENS, M; BAKER, J.; MAYOR, M.; BURNSTEIN, A. H.; FRANKEL, V. H. Experimentally induced degenerative joint lesions following partial meniscectomy in the rabbit. Arthritis Rheum., v. 16, p. 397-405, 1973.

MOSKOWITZ, R. W.; HOWELL, D. S.; GOLDBERG, V. M.; MUNIZ, O.; PITA, J. C. Cartilage proteoglycan alterations in an experimentally induced model of rabbit osteoarthritis. Arthritis Rheum., v. 22, p. 155-63, 1979.

MUIR, H. Molecular approach to the understanding of osteoarthrosis. Ann. Rheum. Dis., v. 36, p. 199-208, 1977.

NOACK,W.;FISCHER,M.;FORSTER K.;ROVATI L. C.;SETNIKAR I.; Osteoarthritis and Cartilage 2, 51-59, (1994).

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

O'CONNOR, B. L.; PALMOSKI, M. J.; BRANDT, K. D. Neurogenic acceleration of degenerative joint lesions. J. Bone Joint Surg. [Am], v. 67, p. 562-72, 1985.

PAVELKÁ, K.; GATTEROVÁ, J.; GOLLEROVA, V.; URBANOVA, Z.; SEDLACKOVA, M.; ALTMAN, R.D. A 5-year randomized controlled, double-blind study og glycosaminoglycan polysulphuric acid complex (Rumalon) as a structure modifying therapy in osteoarthritis of the hip and knee. Osteorthritis Cartilage. v 8, p. 335-42, 2000.

PAVELKÁ, K.; GATTEROVÁ, J.; OLEJAROVA, M.; MACHACEK, S.; GIACOVELLI, G.; ROVETI, LC.; Arch Intern Med. v. 162, 2113-23, 2002.

PELLETIER, J.P.; MC COLLUM, R.; DI BATTISTA, J.; LOOSE, L.D., CLOUTIER, J.M.; MARTEL-PELLETIER, J. Regulation of normal and osteoarthritic chondrocyte IL-1 receptor. Arthritis Rheum. v. 11, p. 1.517-27, 1993.

PELLETIER, J.P.; YARON, M.; HARAOUI, B.; COHEN, P. Efficacy and safety of diacereína in osteoarthritis of the knee: a double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. v. 43, p. 2339-48, 2000.

PELUSO, G. F.; PERBELLINI, A.; TAJANA, G. F. The effect of high and low molecular weight hyaluronic acid on mitogen-induced lymphocyte proliferation. Curr. Ther. Res., v. 47, p. 437-43, 1990.

POMARELLI, P.; BERTI, M.; GATTI, M. T.; MOSCONI, P. A non steroidal anti-inflamatory drug that stimulates prostaglandin release. Farmaco Sci. v. 35, p. 836-42, 1980.

POND, M. J.; NUKI, G. Experimentally-induced osteoarthritis in the dog. Ann. Rheum. Dis., v. 32, p. 387-8, 1973.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

QIU, G.X.; GAO, S. N.; GIACOVELLI, G.; ROVATI, L.; SETNIKAR, I. Efficacy And Safety Of Glucosamine sulfate versus ibuprofen in patients with knee osteoarthritis v.48, p. 469-474, 1998.

REZENDE M.U. Efeito do ácido hialurônico e da diacereína na artrose: modelo experimental em ratos. [Tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. p2-68. 2002.

RODEN, L. Effect of hexosamines on the synthesis of chondrointin sulphuric acid in vitro. Arkh Kemi. v. 10, p. 345, 1956.

ROSNER, I. A.; GOLDBERG, V. M.; GETZY, L.; MOSKOWITZ, R. W. Effects of estrogen on cartilage and experimentally induced osteoarthritis. Arthritis Rheum. v. 22, p. 52-8, 1979.

RYDELL, N. W.; BUTLER, J.; BALAZS, E. A. Hyaluronic acid in synovial fluid. VI. effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of arthritis in track horses. Acta Vet. Scand., v. 11, p. 139-55, 1970.

SAKAKIBARA, Y.; MIURA, T.; IWATA, H.; KIKUCHI, T.; YAMAGUCHI, T.; YOSHIMI, T.; ITOH, H. Effect of high-molecular-weight sodium hyaluronate on immobilized rabbit knee. Clin. Orthop., n. 299, p. 282-92, 1994.

SATO, H.; TAKAHASHI, T.; IDE, H.; FUKUSHIMA, T.; TABATA, M.; SEKINE, F.; KOBAYASHI, K.; NEGISHI, M.; NIWA, Y. Antioxidant activity of synovial fluid, hyaluronic acid and two subcomponents of hyaluronic acid. Arthritis Rheum., v. 31, p. 63-71, 1988.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

SCHIAVINATO, A.; LINI, E.; GUIDOLIN, D.; PEZZOLI, G.; BOTTI, P.; MARTELLI, M.; CORTIVO, R.; DE GALATEO, A.; ABATANGELO, G. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. II. morphological findings. Clin. Orthop., n. 241, p. 286-99, 1989.

SCHÖNGEN, R. N.; GIANNETTI, B. M.; VAN DE LEUR, E.; REINARDS, R.; GREILING, H. Effect of diacetylrhein on the phagocytosis of polimorphonuclear leucocytes and its influence on the biosynthesis of hyaluronate in synovial cells. Arzneim. Forsch., v. 38, p. 744-8, 1988.

SAKAKIBARA, Y.; MIURA, T.; IWATA, H.; KIKUCHI, T.; YAMAGUCHI, T.; YOSHIMI, T.; ITOH, H. Effect of high-molecular-weight sodium hyaluronate on immobilized rabbit knee. Clin. Orthop., n. 299, p. 282-92, 1994.

SCHIAVINATO, A.; LINI, E.; GUIDOLIN, D.; PEZZOLI, G.; BOTTI, P.; MARTELLI, M.; CORTIVO, R.; DE GALATEO, A.; ABATANGELO, G. Intraarticular sodium hyaluronate injections in the Pond-Nuki experimental model of osteoarthritis in dogs. II. morphological findings. Clin. Orthop., n. 241, p. 286-99, 1989.

SCHÖNGEN, R. N.; GIANNETTI, B. M.; VAN DE LEUR, E.; REINARDS, R.; GREILING, H. Effect of diacetylrhein on the phagocytosis of polimorphonuclear leucocytes and its influence on the biosynthesis of hyaluronate in synovial cells. Arzneim. Forsch., v. 38, p. 744-8, 1988.

SETNIKAR, I.; GIACHETTI, C.; ZANOLOGO, G. Absorption, distribution and excretion of radioactivity after a single intravenous or oral administration of (14C) glucosamine to the rat. Pharmatherapeutica, v. 3, p. 538-50, 1984.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

SETNIKAR, I.; CEREDA, R.; PACINI, M.A.; REVEL, L. Antireactive properties of chondroprotective drugs. Arzneimittelforschung. v. 41, p. 157-61, 1991.

SHAPIRO, F.; GLIMCHER, M. J. Induction of osteoarthrosis in the rabbit knee joint: histologic changes following meniscectomy and meniscal lesions. Clin. Orthop., n. 147, p. 287-95, 1980.

SHIMIZU, C.; YOSHIOKA, M.; COUTTS, R. D.; HARWOOD, F. L.; KUBO, T.; HIRASAWA, Y.; AMIEL, D. Long-term effects of hyaluronan on experimental ostearthritis in the rabbit knee. Osteoarthritis cart., v. 6, p. 1-9, 1998.

SILBERBERG, M.; SILBERBERG, R. Osteoarthrosis in mice fed diets enriched with animal or vegetable fat. Arch. Patol., v. 70, p. 385-90, 1960.

SMITH, G. N., Jr.; MYERS, S. L.; BRANDT, K. D.; MICKLER, E. A. Effect of intraarticular hyaluronan injection in experimental canine osteoarthritis. Arthritis Rheum., v. 41, p. 976-85, 1998.

SMITH, G. N., Jr.; MYERS, S. L.; BRANDT, K. D.; MICKLER, E. A.; ALBRECHT, M. E. Diacerhein treatment reduces the severity of osteoarthritis in the canine cruciate-deficiency model of arthritis. Arthritis Rheum., v. 42, p. 545-54, 1999.

SMITH, M. M.; GHOSH, P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. Rheumatol. Int., v. 7, p. 113-22, 1987.

SWEET, M.; THONAR, E.; IMMELMAN, A.; SOLOMON, L. Biochemical changes in progressive osteoarthritis. Ann Rheum Dis. v. 36, p. 387-98,

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

TAMURA T., OHMORI K.: RHEIN. An active metabolite of diacerein, suppresses the interleukin-1alpha-induced proteoglycan degradation in cultured rabbit articular chondrocytes. J Pharmacol 85:101-104, 2001.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

TOYOSHIMA, H. The influence of synovectomy on articular cartilage of rabbit knee and preventive effects of hyaluronic acid on degenerative changes of the cartilage. J. Tokyo Wom. Med. Coll., v. 48, p. 890-910, 1978.

TYLER, J.; Articular cartilage cultured with catabolin(pig interleukin-1) synthesizes a decreased number of normal proteoglycan molecules. J. Biochem. v. 227, p. 77-84, 1985.

VASAN, N. Proteoglycans in normal and severely osteoarthritic human cartilage. J Biochem. v. 187, p. 781-7, 1980.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; WITZEL, S. S.; YOSHINARI, N. H. Quantificação do colágeno XI em cartilagem articular dos coelhos com osteoartrose. Rev. Bras. Reumatol., v. 39, p. 137-42, 1999.

VIDAL, Y.; PLANA, R.; BIZARRI, D.; ROVATI, A.L. Articular cartilage pharmacology. In vidro studies on GS and non steroidal anti-inflammatory drugs. Pharmacol Res Comm. v. 10, p. 557-69, 1978.

VIDAL, Y.; PLANA, R.; KARZEL, K. Glucosamine sulfate: its role in the articular metabolism. 2. Studies on rat and human articular cartilage. Fortschr Med. v. 98, p. 801-6, 1980.

WALKER, P. S.; ERKMAN, M. J.The role of menisci in force transmission across the knee. Clin. Orthop., n.109, p.184-92, 1975.

WANCKET, L.M.; BARAGI, V.; BOVE, S.;KILGORE, K. Anatomical localization of cartilage degradation markers in a surgically induced rat osteoarthritis model. Toxicol Pathol. v. 33(4), p. 484-9, 2005.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com

WILLIAMS, J. M.; PLAZA, V.; HUI, F.; WEN, C.; KUETTNER, K. E.; HOMANDBERG, G. A. Hyaluronic acid suppresses fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis: II. *In vivo*. Osteoarthritis Cart., v. 5, 235-40, 1997.

YARON, M.; SHIRAZI, I.; YARON, I. Effets anti-interleukine 1 de la diacerhéine in vitro. Rev. Prat., v. 47, p. 20-3, 1997. Supplement 17.

YASUI, T.; AKATSUKA, M.; TOBETTO, K.; HAYAISHI, M.; ANDO, T. The effect of hyaluronan on interleukin-1α-induced prostaglandin E_2 production in human osteoarthritic synovial cells. Agents Actions, v. 37, p. 155-6, 1992.

YOSHIMI, T.; KIKUCHI, T.; OBARA, T.; YAMAGUCHI, T.; SAKAKIBARA, Y.; ITOH, H.; IWATA, H.; MIURA, T. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental ostearthrosis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. Clin. Orthop., n. 298, p. 296-304, 1994.

YOSHIOKA, M.; SHIMIZU, C.; HARWOOD, F. L.; COUTTS, R. D.; AMIEL, D.The effects of hyaluronan during the development of ostearthritis. Osteoarthritis Cart., v. 5, p. 251-60, 1997.

PDF Creator - PDF4Free v2.0 http://www.pdf4free.com