

ANDRÉ LUÍS LUGNANI DE ANDRADE

**Expressão do Fator de Transcrição HIF-1 α em Condrócitos
Humanos Cultivados em Condições Normais de Oxigênio**

CAMPINAS

2006

ANDRÉ LUÍS LUGNANI DE ANDRADE

**Expressão do Fator de Transcrição HIF-1 α em Condrócitos
Humanos Cultivados em Condições Normais de Oxigênio**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica,
área de concentração em Clínica Médica*

ORIENTADOR: PROF. DR. IBSEN BELLINI COIMBRA

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Na 24e Andrade, André Luís Lugnani de
Expressão do fator de transcrição HIF-1 α em condrócitos humanos cultivados em condições normais de oxigênio / André Luís Lugnani de Andrade . Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Ibsen Bellini Coimbra
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Células. 2. Fator 1Induzível Hipoxia. 3. Interleucina-1.

I. Coimbra, Ibsen Bellini. II. Universidade Estadual de Campinas.

Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Expression of Hypoxia induction factor 1 α in human chondrocytes cultivated in normoxia

Keywords: • Cells

- Hypoxia-Inducible Factor 1
- Interleukin-1

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

**Banca examinadora: Prof Dr Ibsen Bellini Coimbra
Prof Dr Nilson Roberto Severino
Profa. Dra. Maria Beatriz Puzzi**

Data da defesa: 31-08-2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) Nilson Roberto Severino _____
2. Prof(a). Dr(a). Maria Beatriz Puzzi _____
3. Prof(a). Dr(a). Ibsen Bellini Coimbra _____

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica Básicas Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2006

DEDICATÓRIA

Aos momentos felizes na companhia dos meus pais, Régis e Sonia, que passaram a ser menos frequentes durante este período.

A minha esposa, Carolina, pelo amor e apoio, sem os quais não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra, pela confiança e oportunidade, proporcionando novos conhecimentos que mudaram a minha forma de ver a pesquisa básica.

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto, que apoiou e cedeu a estrutura de seu laboratório para a realização desta pesquisa; e seus orientandos, que foram muito importantes no meu aprendizado.

À amiga Jussara, por suas críticas e opiniões sinceras, por sua imensa ajuda.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação, Angélica, Cristiane e Luciano, pela imensa ajuda na realização dos experimentos.

Ao amigo Edimar Fávaro, pelo apoio na decisão de iniciar e persistir na pesquisa básica.

Aos colegas ortopedistas e seus pacientes, sem os quais não haveria material para a realização deste projeto.

	PÁG.
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
1- INTRODUÇÃO	16
1.1- A Cartilagem Articular	17
1.1.1- Macroscopia da Cartilagem Articular.....	17
1.1.2- Microscopia da Cartilagem Articular.....	18
1.1.3- Fisiologia da Cartilagem Articular.....	19
1.2- Fator Induzido por Hipóxia	20
1.3- Osteoartrite	22
1.3.1- Incidência / Epidemiologia da Osteoartrite.....	22
1.3.2- Fisiopatologia.....	23
1.3.3- Clínica.....	24
1.3.4- Tratamento.....	24
2- OBJETIVOS	26
2.1- Objetivo Geral	27
2.2- Objetivos Específicos	27
3- MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1- Coleta de cartilagem e armazenamento dos condrócitos	29
3.2- Cultura e estímulo dos condrócitos	30
3.3- Extração de RNA e síntese de cDNA	30
3.4- Reação em cadeia de polimerase em Tempo Real	31
3.5- Extração das proteínas nucleares e citoplasmáticas	36
3.6- Western Blotting	36

4- RESULTADOS	39
4.1- Expressão de mRNA do HIF-1α em condrócitos estimulados com IL-1 e TNF-α associados ou não com meloxicam	40
4.1.1- A expressão de mRNA do HIF em condrócitos estimulados com IL-1 e/ou meloxicam.....	40
4.1.2- A expressão de mRNA do HIF em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou meloxicam.....	41
4.2- Expressão da proteína HIF-1α em condrócitos estimulados com IL-1 e TNF-α associados ou não com meloxicam/ parecoxibe	42
4.2.1- A expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com IL-1 e/ou meloxicam.....	42
4.2.2- A expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou meloxicam.....	43
4.2.3- A expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou parecoxibe.....	44
5- DISCUSSÃO	45
5.1- HIF-1α	46
5.2- Cultura em suspensão	47
5.3- Expressão de HIF-1α mRNA	47
5.4- Expressão de HIF-1α	48
5.5- Osteoartrite	49
5.6- Estímulo com citocinas	51
5.7- Inibidores da COX-2	53
5.8- Considerações finais	53
6- CONCLUSÕES	55
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Ampère
AA	Ácido araquidônico
AINH	Antiinflamatório não hormonal
ATP	Adenosina trifosfato
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CTAD	Domínio C terminal
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CO₂	Dióxido de carbono
DMEM	Meio Dulbecco modificado
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreito I
FBS	Soro fetal bovino
Glut-1	Glutation-1
HIF	Fator induzido por hipóxia
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1	Interleucina-1
IL-11	Interleucina-11
LDH	Desidrogenase láctica

MEM	Meio essencial mínimo
MMP	Metaloproteinase
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NOS	Óxido nítrico sintetase
OA	Osteoartrite
ODD	Degradação dependente do oxigênio
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Inibidor de protease
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGK	Fosfoglicerato quinase
pVHL	Proteína de von Rippel Lindau
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas do oxigênio
RT	Transcrição reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
siRNA	RNA interferente
TBS	Tampão tris salino
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
V	Volts
VEGF	Fator de crescimento endovascular
W	Watts
2-DG	2-deoxiglicose

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Seqüência dos primers utilizados para a realização de PCR em tempo real para os genes HIF1A e ACTB.....	32

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Desenho esquemático da proteína HIF-1 α e as funções de cada um de seus domínios.....	21
Figura 2- Condições de ciclagem da reação de PCR em tempo real.....	33
Figura 3- Curva padrão para a reação de PCR em tempo real para amplificação dos genes ACTB e HIF1A.....	34
Figura 4- Curva de dissociação da reação de PCR em tempo real.....	35
Figura 5- Expressão de mRNA do HIF em condrócitos estimulados com IL-1 e/ou meloxicam.....	40
Figura 6- Expressão de mRNA do HIF em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou meloxicam.....	41
Figura 7- Expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com IL-1 e/ou meloxicam.....	42
Figura 8- Expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou meloxicam.....	43
Figura 9- Expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou parecoxibe.....	44

RESUMO



Introdução: Os condrócitos da cartilagem articular vivem em um ambiente com baixa concentração de oxigênio. Nestas condições, a proteína do fator induzido por hipóxia (HIF-1 α) mantém-se estável e ativa genes que são fundamentais na homeostase do oxigênio. A expressão do HIF-1 α aumenta, em joelhos com osteoartrite (OA), principalmente nas áreas mais afetadas pela degeneração. Os condrócitos são capazes de produzir mediadores inflamatórios, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que estimulam a produção de prostaglandinas, metaloproteinases e óxido nítrico e relacionam-se com o início e com a progressão da osteoartrite. Os antiinflamatórios são drogas frequentemente utilizadas no tratamento sintomático da OA.

Material e Método: condrócitos humanos de joelhos osteoartríticos cultivados em suspensão e em condições normais de oxigênio foram divididos em quatro grupos: 1) controle, 2) estimulados com IL-1 ou TNF- α , 3) estimulados com meloxicam ou parecoxibe e 4) estimulados com meloxicam ou parecoxibe associados a IL-1 ou TNF- α . Os grupos foram submetidos à extração de RNA (ácido ribonucléico) e de proteína nuclear. O RNA foi convertido em cDNA, sendo então realizada a reação de PCR em tempo real para verificar a expressão do HIF-1 α . As proteínas nucleares foram extraídas, quantificadas e analisadas pela técnica de Western Blotting.

Resultados: Foi detectada a expressão de HIF-1 α e cDNA de HIF-1 α em todos os grupos de condrócitos cultivados em suspensão em tensões normais de oxigênio, não havendo diferenças significativas entre os grupos.

Discussão: a meia-vida do HIF-1 α é extremamente curta em normóxia e marcadamente prolongada em hipóxia, por isso muitos pesquisadores acreditam não ser possível a detecção da proteína do HIF-1 α em condrócitos cultivados em condições normais de oxigênio. Neste estudo foi possível constatar a expressão do HIF-1 α em normóxia, possivelmente devido ao modelo de cultura utilizado. O estímulo com IL-1, TNF- α e inibidores da COX-2 não alterou a expressão de HIF-1 α . Condrócitos oriundos de articulações osteoartríticas avançadas poderiam apresentar resistência à ação das citocinas.

ABSTRACT



Introduction: The chondrocytes of joint surface live in low concentration of oxygen environment. In this condition, the hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) becomes stable and regulates the expression of genes that are important for oxygen homeostasis. The expression of HIF-1 α mRNA is augmented in chondrocytes from osteoarthritic knees, especially in more degenerated areas. Chondrocytes are capable of producing inflammatory mediators, such as interleukin 1 (IL-1) and tumoral necrosis factor α (TNF- α), that stimulate the production of prostaglandin, metalloproteinases and nitric oxide, correlated with the onset and progression of osteoarthritis. Antiinflammatory drugs are frequently used in the treatment of symptoms of osteoarthritis. Material e Methods: human chondrocytes from osteoarthritic knees were cultivated in suspension and in normal tension of oxygen. The cells were divided in 4 groups: control, stimulated with IL-1 or TNF- α , stimulated with meloxicam or parecoxib and the last one stimulated with meloxicam or parecoxib and IL-1 or TNF- α . Nuclear protein and RNA were extracted from these cells. cDNA was synthesized from RNA and real time PCR was performed with this product in order to determine HIF-1 α expression. Nuclear protein was analyzed using the Western-Blotting method. Results: HIF-1 α and HIF-1 α mRNA was detectable in all cell groups, and there was not a statistic significant difference between them. Discussion: As half live of HIF-1 α is extremely short when in normoxic and greater in hypoxic conditions, many researchers believe it is not possible to detect this protein in chondrocytes cultivated in normoxic environment. Our results presented expression of HIF-1 α in normal oxygen tensions, probably due to the fact that chondrocytes were cultivated in suspension. As chondrocytes were obtained from advanced osteoarthritic knees and in such conditions the cells can be more resistant to the action of cytokines, this could explain why IL-1, TNF- α and antiinflammatory did not result in modification of HIF-1 α .

1- INTRODUÇÃO

Entre os mais incríveis materiais que a natureza construiu está a cartilagem articular, com sua capacidade de aliar a baixa fricção e a capacidade de suportar carga, permitindo que os homens possam se locomover livremente e sem dor (Brooks, 2002).

1.1- A Cartilagem Articular

A cartilagem articular é formada de cartilagem hialina, que cobre o osso subcondral nas articulações diartrodiais, sendo por definição composta somente por fibras colágenas tipo II, além de proteoglicanos agregados que em conjunto com o líquido sinovial permitem mínima fricção, além de absorver e dissipar a carga. Quando submetida a carga, a cartilagem se deforma, readquirindo em seguida sua forma original ao cessar a carga (Buckwalter, 2000).

Aproximadamente 2% da cartilagem hialina é composta por células, sendo o restante da cartilagem composta de matriz extracelular sintetizada por estas células chamadas de condrócitos (Poole et al., 2001). A água contribui com 65-80% do peso da cartilagem, 10-30% é composto pelas fibrilas colágenas e 5-10% por proteoglicanos (Sledge, 2001).

O colágeno forma a rede fibrilar que proporciona a resistência tênsil e forma da cartilagem. Os proteoglicanos dão a resistência à compressão assim como, controlam o fluxo de água através da matriz. As proteínas não colágenas estabilizam e aumentam o tamanho dos agregados de proteoglicanos e participam das relações entre a matriz e os condrócitos (Poole, et al., 2001).

1.1.1- Macroscopia da Cartilagem Articular

Macroscopicamente, a cartilagem articular é um tecido branco-azulado e translúcido, que não possui vasos sanguíneos, sendo suas células, os condrócitos, nutridos por água de solvatação pelo líquido sinovial (Junqueira).

1.1.2- Microscopia da Cartilagem Articular

Microscopicamente, a cartilagem articular é organizada de acordo com seu papel funcional. Embora apresente no máximo alguns milímetros, a cartilagem apresenta uma organização complexa que pode ser dividida em quatro zonas (Poole et al., 1982) (Buckwalter, 2000):

1. Superficial ou de deslizamento: camada delgada de delgadas fibrilas diretamente em contato com a cavidade sinovial, com condrócitos achatados e alongados paralelos à superfície articular e abaixo das fibrilas.
2. Média ou de transição: condrócitos arredondados dispersos em matriz interterritorial com fibrilas colágenas mais calibrosas e orientação mais aleatória.
3. Profunda ou radial: a células se assemelham com a da zona de transição, porém se alinham em colunas. Possui as maiores fibrilas de colágeno, maior concentração de proteoglicano e menor concentração de água.
4. Cartilagem calcificada: delgada zona de cartilagem calcificada que separa a cartilagem hialina do osso subcondral. Fibrilas colágenas penetram da zona profunda até o tecido ósseo.

Em relação aos condrócitos, a matriz extracelular se organiza em: região pericelular, que corresponde a uma área de 2 μ m margeando a célula e é composta de proteoglicanos, agrecanos, decorina e poucas fibras colágenas; a região territorial, que reveste toda a região pericelular em todas as camadas e apresenta maior concentração de fibras colágenas. Na camada profunda existe uma região interterritorial que representa a matriz mais distante dos condrócitos e provavelmente onde se encontram produtos de degradação de agrecanos (Buckwalter, 2000).

1.1.3- Fisiologia da Cartilagem Articular

Os condrócitos são as células responsáveis pela síntese da matriz cartilaginosa, assim como pelas enzimas responsáveis pela sua degradação, tais como as colagenases, proteinases e catepsina. O estímulo para a síntese da matriz cartilaginosa provém das alterações abruptas e repetitivas a que os condrócitos são submetidos. Além de estímulos mecânicos, algumas citocinas e fatores de crescimento podem regular as funções de síntese e proliferação da cartilagem articular (Sledge, 2001).

Por outro lado, os condrócitos têm baixo *turnover* e são distribuídos esparsamente na matriz, e devido a estas características, a cartilagem articular apresenta capacidade limitada de reparação (Tew et al., 2001).

A natureza avascular da cartilagem torna hostil o ambiente no qual os condrócitos vivem, principalmente devido a baixas tensões de oxigênio (Pfander et al., 2006), que chegam a próximo de zero em alguns casos (Lund-Olesen, 1970). As baixas tensões de oxigênio devem-se à discrepância entre o suprimento arterial de oxigênio à articulação e a demanda metabólica dos tecidos (Treuhart et al., 1971). O oxigênio chega à cartilagem articular através de difusão pelo osso subcondral e pelo líquido sinovial, estimulado pelos movimentos articulares (Lee et al., 1997). Devido ao longo caminho de difusão envolvido, a provisão de oxigênio e glicose pode ser particularmente crítica (Lee, et al., 1997). As baixas tensões de oxigênio levam os condrócitos a produzir energia através da via glicolítica anaeróbica com aumento do consumo de glicose, produção de lactato e baixo consumo de oxigênio (Lane et al., 1977).

Quando ocorre inflamação da membrana sinovial e derrame articular, na osteoartrite, a pressão intra-articular eleva-se e mecanicamente, obstruem segmentos de vasos retinaculares (Kiaer et al., 1988). O aumento da resistência à drenagem do vascular pode diminuir a perfusão e oxigenação tecidual (Kiaer, et al., 1988). Por outro lado, degeneração da cartilagem articular na OA causa fibrilação no tecido, e algumas vezes microfraturas no osso subcondral. Este processo provavelmente rompe o gradiente de oxigênio na cartilagem e produz aumento das tensões de oxigênio na cartilagem. A presença de maior tensão de oxigênio pode facilitar a produção de espécies reativas de

oxigênio (ROS), as quais sabidamente tem papel de sinalização e podem contribuir na modulação da expressão gênica do condrócito (Martin et al., 2004). Em condições fisiológicas de tensão de oxigênio, os condrócitos seguem as duas vias energéticas, aeróbica e anaeróbica (Lane, et al., 1977).

1.2- Fator Induzido por Hipóxia

O fator induzido por hipóxia (HIF) é um fator de transcrição gênica heterodimérico composto de duas proteínas *basic helix-loop-helix* (bHLH): HIF- α e HIF- β . Existem três isoformas de HIF- α que são estruturalmente semelhantes. A isoforma HIF-3 α , ao contrário de HIF-1 α e HIF-2 α , está associada a mecanismos de regulação negativa da transcrição gênica induzida pelo HIF (Wang et al., 1995a, Wang et al., 1993).

As duas subunidades são constitutivamente expressas, entretanto, enquanto a subunidade HIF- β é estável tanto em normóxia quanto em hipóxia, a HIF- α é rapidamente degradada se o ambiente for de normóxia (Maxwell et al., 1999, Wang, et al., 1995a).

O heterodímero HIF- α/β liga-se na região promotora (5'-G/ACGTG-3') dos elementos responsivos à hipóxia presentes em diversos genes, tais como: O domínio bHLH da molécula é responsável pela ligação ao DNA, o PAS (PER ARNT SIM) pela dimerização nuclear e o domínio C-terminal da subunidade HIF- α (CTAD) interage com os coativadores gerais de transcrição gênica, como a proteína de ligação p300/CREB e p160/SCR1. Um domínio de degradação oxigênio-dependente (ODD) é essencial para a degradação proteolítica do HIF e está presente nas subunidades HIF-1 α e HIF-2 α (Gaber et al., 2005, Schipani, 2005) (figura 1).

Em condições de normóxia enzimas prolil-hidroxilases promovem a hidroxilação de resíduos de prolina (Pro402 e Pro564) localizados no domínio ODD e ocorre também acetilação de uma lisina (Lys532). Os resíduos de prolina hidroxilados são reconhecidos pelo fator de Von Hippel-Lindau (pVHL), que facilita a degradação do HIF α através da via ubiquitina-proteasoma. Outra forma de inibir a ativação do HIF α é através

da ação do fator inibidor do HIF-1 α (FIH), uma oxigenase dependente dos co-substratos ferro, oxigênio molecular e 2-oxigluterato, e que pode atuar de duas maneiras distintas: 1) recrutando deacetilases, que reprimem o remodelamento da cromatina; 2) promovendo a hidroxilação de um resíduo de asparagina (Asn 803), localizado no domínio CATD, impedindo a ligação dos coativadores gerais p300/CREB e p160/SCR1. Na falta de quaisquer um destes co-substratos a reação de hidroxilação é inibida e o HIF α torna-se estável (Gaber, et al., 2005, Schipani, 2005).

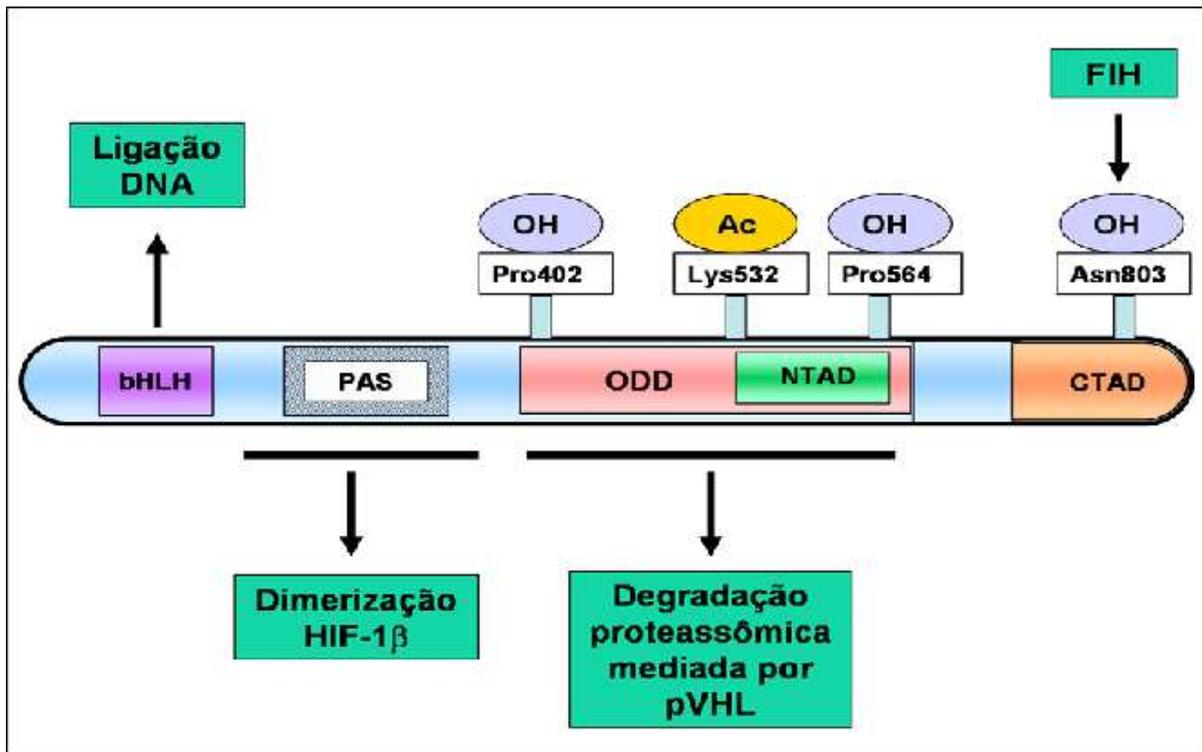


Figura 1- Proteína HIF-1 α . Desenho esquemático da proteína HIF-1 α , com suas regiões e respectivas funções: bHLH (*basic helix-loop-helix*) – ligação no DNA, PAS (Per ARNT Sim) – dimerização com HIF-1 β , ODD (domínio de degradação dependente do oxigênio) – degradação pela pVHL (proteína de von Hippel Lindau), NTAD (porção N terminal) e CTAD (porção C terminal) – domínios de transativação transcripcional e ligação do FIH (Fator inibidor do HIF).

Quando não ocorre hidroxilação e acetilação do HIF α , este se associa à proteína de choque térmico 90 (HSP90), que facilita então o desenvolvimento de um complexo estável e transcricionalmente ativo com o HIF β .

O HIF coordena respostas celulares adaptativas em ambientes de hipóxia, como o ambiente em que se encontram os condrócitos (Gaber, et al., 2005, Schipani, 2005). Estudos indicam que o HIF participa do processo de esquelotogênese de forma crítica para a sobrevivência dos condrócitos, regulando negativamente a proliferação destas células e promovendo o acúmulo de matriz cartilaginosa. É possível que a hipóxia, e conseqüente ativação do HIF-1 α sejam fatores permissivos na diferenciação dos condrócitos, bem como no comprometimento das células mesenquimais em relação à linhagem condrocítica (Schipani, 2005). O HIF-1 α é um fator de transcrição que age como o principal regulador da adaptação celular a hipóxia (Pfander, et al., 2006), tendo um papel de sobrevida e manutenção da homeostase na normalmente hipóxica cartilagem articular (Yudoh et al., 2005).

1.3- Osteoartrite

A osteoartrite (OA) é uma condição humana e todo *Homo sapiens*, que viver o suficiente, desenvolverá a OA (Schurman et al., 2004). Esta doença resulta de eventos mecânicos e biológicos que atrapalham o equilíbrio normal entre degradação e síntese de matriz extracelular pelos condrócitos (Mollenhauer et al., 2002).

A OA acomete todos os tecidos das articulações diartrodiais e manifesta-se por alterações morfológicas, bioquímicas e biomecânicas. Quando clinicamente evidente, a OA é caracterizada por dor articular, aumento da sensibilidade, limitação de movimento, crepitação, derrame ocasional e variável grau de inflamação (Mollenhauer, et al., 2002).

1.3.1- Incidência / Epidemiologia da Osteoartrite

A osteoartrite é a maior causa de incapacidade (Brooks, 2002), está presente em todo o mundo, em todos os grupos étnicos e ocorre mais freqüentemente em mulheres.

Acomete cerca de um terço da população acima dos 45 anos, podendo chegar a 75% em algumas populações acima dos 65 anos (Buckwalter et al., 2004). A incapacidade e o impacto psicossocial custam aos países de 1 a 2,5% do produto interno bruto (March et al., 1997).

Muitos fatores estão associados ao desenvolvimento da OA : fatores genéticos, idade, deformidades articulares, lesões articulares, atividade ocupacional ou esportiva, obesidade, densidade mineral e deficiência de estrogênio; e outros fatores estão associados à progressão da doença: deficiência nutricional, deformidades angulares associadas ou não com obesidade, momento em varo, edema medular, lesões meniscais, fraqueza do quadríceps, densidade mineral óssea, entre outros. Muitos destes fatores podem ser modificados e, conseqüentemente, evitar ou retardar a progressão da doença (Sharma et al., 2006).

1.3.2- Fisiopatologia

Uma observação considerada importante, inicialmente feita em 1743 por Willian Hunter e confirmada por inúmeros investigadores nos últimos 50 anos, colaborou com o entendimento de que a cartilagem articular seria uma superfície de carga inerte e que a degeneração articular seria decorrente do desgaste pelo uso e pela idade (Buckwalter, 1997). Este ponto de vista implica na limitação do uso e carga, que nada ou pouco pode ser feito para prevenir a OA e que o tratamento mais indicado para o tratamento da osteoartrite avançada e sintomática seria a substituição articular (Buckwalter, 1997). Os condrócitos são as únicas células que compõem a cartilagem articular e em condições fisiológicas mantém equilíbrio entre atividade anabólica e catabólica da matriz extracelular (Goldring et al., 2004b, Hedbom et al., 2002). Um distúrbio neste equilíbrio resulta na perda de componentes da matriz cartilaginosa e deterioração na estrutura e função da cartilagem (Goldring, et al., 2004b, Hedbom, et al., 2002). A perda de cartilagem e sua degeneração estimulam a produção de proteinases, particularmente as metaloproteinases, que estimulam o catabolismo da matriz. Embora na osteoartrite não haja sinais tão evidentes de inflamação como na artrite reumatóide, há evidências de que o processo

inflamatório esteja envolvido no processo desta doença. Interleucina-1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) são encontrados no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite e estes fatores promovem a síntese de enzimas proteolíticas e de outros fatores catabólicos e antianabólicos. Além disso, a IL-1 e TNF- α estimulam a produção de enzimas críticas para a produção de óxido nítrico sintetase (NOS), ciclooxigenase-2 (COX-2) e prostaglandinas (PGE). A expressão de NOS e COX-2 é significativa na OA, mas baixa ou ausente na cartilagem normal (Hedbom, et al., 2002).

1.3.3- Clínica

A dor é um sintoma freqüente, de início insidioso, levando os pacientes retardar o tratamento. A intensidade varia e geralmente é exacerbada com a carga e o movimento, e aliviada com o repouso. Associada a dor os pacientes queixam ainda de rigidez, edema, deformidade e perda de função (Solomon, 2001). Uma vez que os pacientes desenvolvem a OA, provavelmente eles sofrerão da doença pelo resto da vida, sendo que a dor e a incapacidade geralmente aumentarão (Buckwalter, 2000).

1.3.4- Tratamento

Todos os tratamentos disponíveis para a OA são paliativos, sendo os antiinflamatórios não hormonais (AINH) as medicações mais utilizadas no seu tratamento da (Schurman, et al., 2004). A ação dos AINHs está relacionada à inibição da enzima ciclooxigenase (COX). Existem formas distintas de COX: a COX-1 é constitutiva e está relacionada à homeostase tecidual; a COX-2 é induzida por células inflamatórias e é responsável pela produção dos mediadores prostanóides da inflamação (Rang et al., 2004). As reações gastrointestinais são os efeitos colaterais mais freqüentes dos AINHs, devido à inibição da síntese de prostaglandinas que estimulam funções citoprotetoras na mucosa gástrica (Masferrer et al., 2000). Há uma evidência forte que AINHs seletivos para COX-2 resultam em menor incidência de efeitos colaterais gastrointestinais (Vane, 2000). Entre

estas drogas, o meloxicam e o parecoxibe são as únicas disponíveis no mercado brasileiro para uso parenteral.

O meloxicam tem seletividade para COX-2 em relação à COX-1 de 10 (Vane, 2000), e o parecoxibe quando metabolizado em valdecoxibe por estearase hepática tem seletividade de 30 (Stichtenoth, 2004).

Os tratamentos atuais para a OA podem aliviar os sintomas, mas não evitam a progressão da doença (Sharma, et al., 2006). A progressão da doença para estágios avançados e incapacitantes leva à indicação de artroplastia (Torres et al., 2006).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar a expressão do HIF-1 α em condrócitos cultivados em normóxia.

2.2- Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a expressão do mRNA HIF-1 α em condrócitos estimulados com IL-1 e TNF- α associados ou não com meloxicam.
- 2- Avaliar a expressão da proteína HIF-1 α em condrócitos estimulados com IL-1 e TNF- α associados ou não com meloxicam e Parecoxibe.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Coleta de cartilagem e armazenamento dos condrócitos

Pacientes com osteoartrite clínica e radiográfica submetidos a artroplastia total do joelho foram consultados antes da cirurgia sobre o interesse em participar do estudo: leram, entenderam e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Após o procedimento de artroplastia a porção de cartilagem, que normalmente seria descartada, foi armazenada em frasco de vidro estéril com soro fisiológico e encaminhada ao laboratório de cultura de células.

No laboratório de cultura de células o material foi lavado duas vezes com solução de Hanks com concentração de penicilina de 200 ui/ e estreptomicina 200 ug/ml (Gibco 10378-016). A cartilagem articular foi separada do osso, ligamentos, gordura, e demais tecidos e dividida com bisturi em fragmentos menores que 1mm³. Após esta divisão a cartilagem foi colocada em meio de DMEM (Dulbecco Medium Eagle Modified – Gibco 12100-046) com tripsina (Gibco 25200-056) e colagenase (Gibco 17101-015) a 2 mg/ml cada, durante uma hora e meia a 37°C e CO₂ a 5%. O meio foi desprezado após centrifugação de 450 x g por 5 minutos e o tecido foi novamente colocado em digestão em solução de DMEM (Gibco 12100-046) com FBS (Gibco 10270-106) a 10%, colagenase (Gibco 17101-015) a 0,5 mg/ml, penicilina a 100 ui/ml, estreptomicina a 100ug/ml (Gibco 10378-016), vitamina MEM (Gibco 11120-052) a 1% e glutamina (Gibco 25030-149) a 1% e mantido durante a noite a 37°C e CO₂ a 5%.

O produto da digestão do tecido foi passado em filtro de nylon para descarte de restos de tecido não digeridos e centrifugado a 450 x g por 5 minutos a 5°C. O material centrifugado foi ressuscitado em 5 ml de meio DMEM (Gibco 12100-046) e centrifugado nas condições já citadas após separação de pequena alíquota para fins de contagem de células. As células precipitadas foram ressuscitadas em FBS (Gibco 10270-106) com DMSO (Dimetil Sulfóxido) a 10% na proporção de 2ml/5.10⁶ células e foram congeladas em nitrogênio líquido até a realização dos experimentos.

3.2- Cultura e estímulo dos condrócitos

Os condrócitos foram cultivados em placas de cultura revestidas com PolyHema em solução DMEM (Gibco 12100-046) com FBS (Gibco 10270-106) a 10%, penicilina a 100 ui/ml, estreptomicina a 100ug/ml (Gibco 10378-016), vitamina MEM (Gibco 11120-052) a 1% e glutamina (Gibco 25030-149) a 1% durante dois dias a 37°C e CO₂ a 5%.

Os condrócitos foram divididos em grupos de 5.10^6 células e os experimentos realizados no quarto dia de cultura. O primeiro experimento foi realizado com quatro grupos de condrócitos, sendo o primeiro um grupo controle sem estímulo, o segundo estimulado com IL₁ (Pierce RIL185) na concentração final de 10ng/ml, o terceiro estimulado com meloxicam a 0,9ng/ml e o último grupo estimulado com IL₁ (Pierce RIL185) a 10ng/ml e meloxicam a 0,9ng/ml. Os condrócitos ficaram sob estímulo por 6 horas a 37°C e CO₂ a 5%. O segundo experimento iniciou-se no terceiro dia, quando a concentração de FBS (Gibco 10270-106) foi trocada de 10% para 0,1%; na manhã do quarto dia de cultura, os grupos de condrócitos foram tratados da seguinte forma: o primeiro grupo controle sem estímulo, o segundo estimulado com TNF α (R&D 210FA) a 10ng/ml, o terceiro estimulado com meloxicam a 0,9 ng/ml e o quarto grupo estimulado com TNF α (R&D 210FA) a 10ng/ml e meloxicam a 0,9 ng/ml. Os condrócitos foram estimulados por 4 horas a 37°C e CO₂ a 5%. O terceiro experimento foi realizado como o segundo, porém foi utilizado como AINH: o parecoxibe a 10ng/ml no lugar do meloxicam, o qual foi utilizado somente para estudo ao nível de proteína nuclear.

3.3- Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total dos condrócitos foi extraído através do reagente comercial TRIzol® (Invitrogen 15596-026). Resumidamente, 1 ml de Trizol (Invitrogen 15596-026) foi adicionado às células precipitadas, aguardou-se 5 minutos em temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos e adicionou-se em seguida 0,2 ml de clorofórmio. A solução obtida foi agitada manualmente por 15 segundos e

incubada por 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a solução dividiu-se em duas fases, sendo transferida para outro tubo a fase aquosa que contém o RNA. Foram adicionado 0,5 ml de álcool isopropílico, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos e a seguir foram centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado uma vez com 1 ml de álcool etílico a 75%. A amostra foi misturada no vortex e centrifugada a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado a vácuo e o precipitado de RNA foi dissolvido em água livre de RNase e encubado por 10 minutos a 55°C.

O RNA extraído foi quantificado em luz ultravioleta (UV) em espectrofotômetro (260/280 nm; DU Series 500, Beckman) e estocado a -80°C até seu uso.

As amostras de cDNA foram sintetizadas a partir de 2 µg de RNA total usando o sistema de Transcrição Reversa com primers hexâmeros randômicos (5 µM; Amersham) em uma mistura de 20 µL contendo: tampão RT (Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM), dNTP's 250 µM cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen); 5 mM DTT (Invitrogen); 28,4 U de inibidor de RNase (RNAguard™; Amersham); e 200 U da enzima transcriptase reversa (M-MLV -*Moloney Murine Leukemia Virus*- RT; kit Superscript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen) (Condino-Neto et al., 2000).

3.4- Reação em cadeia de polimerase em Tempo Real

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem).

Foram desenhados primers *sense* e *antisense* para os genes HIF1A (NM_001530) e ACTB (NM_001101), que codificam as proteínas HIF-1α e β-actina, respectivamente (Tabela 1). Para a amplificação de ambos os genes a concentração final

dos primers *sense* e *antisense* na solução utilizada para a reação de PCR em tempo real foi de 300mM,

Tabela 1- Seqüência dos primers utilizados para a realização de PCR em tempo real para os genes HIF1A e ACTB

Gene	Primer <i>sense</i>	Primer <i>antisense</i>
HIF1A	cca aag ttg aat cag aag at	aag ata tga ttg tgt ctc ca
ACTB	gct cgt cgt cga caa cgg ctc	caa aca tga tct ggg tca tct tct c

HIF1A – Gene do HIF-1 α ; ACTB – Gene da β -actina.

As condições de ciclagem seguiram as especificações do equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem) (Figura 2).

Para obter resultados reprodutíveis e com exatidão foi construída uma curva padrão e o valor de inclinação da reta (“slope”) permitiu o cálculo de eficiência da reação (R2) (Figura 3). Também foi realizada a curva de dissociação para verificar a especificidade do produto formado (Figura 4).

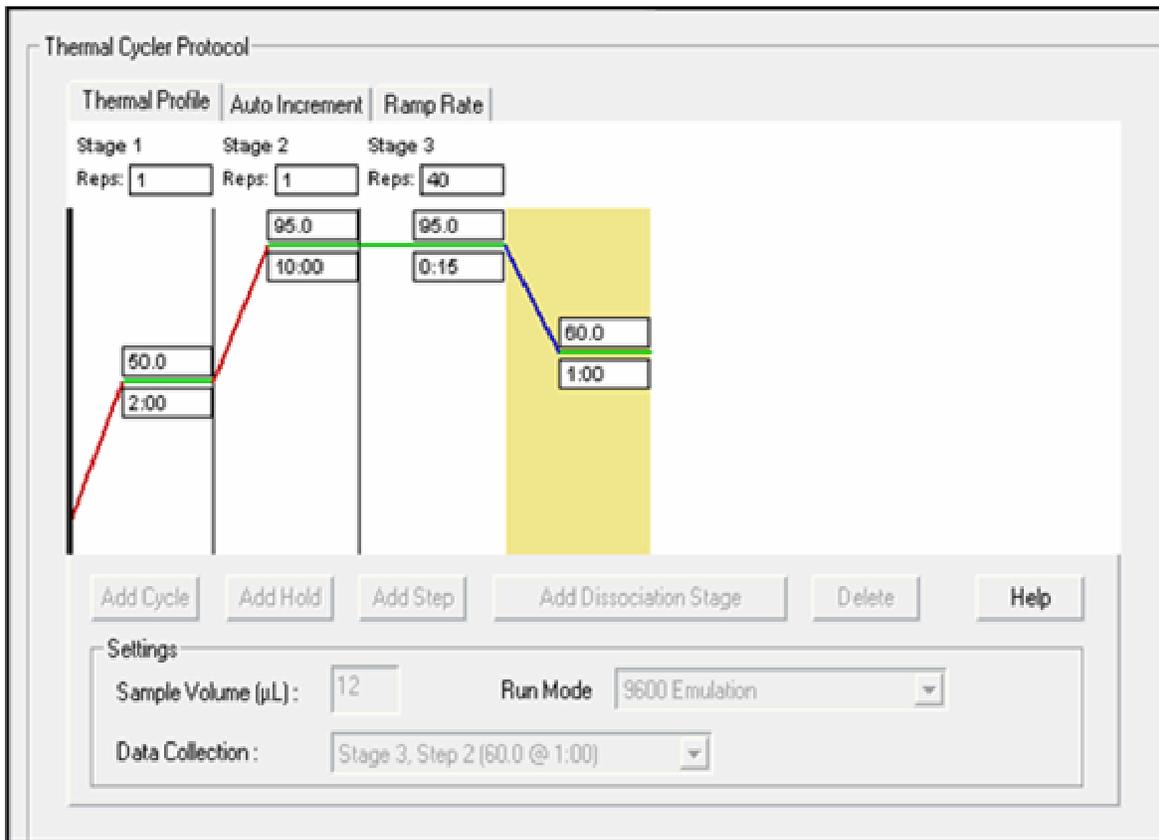


Figura 2- Condições de ciclagem da reação de PCR em tempo real. O terceiro estágio (Stage 3) compreende uma repetição de 40 ciclos e os dados de fluorescência são coletados durante o período em que a reação permanece em 60°C em cada ciclo (destacado em cinza).

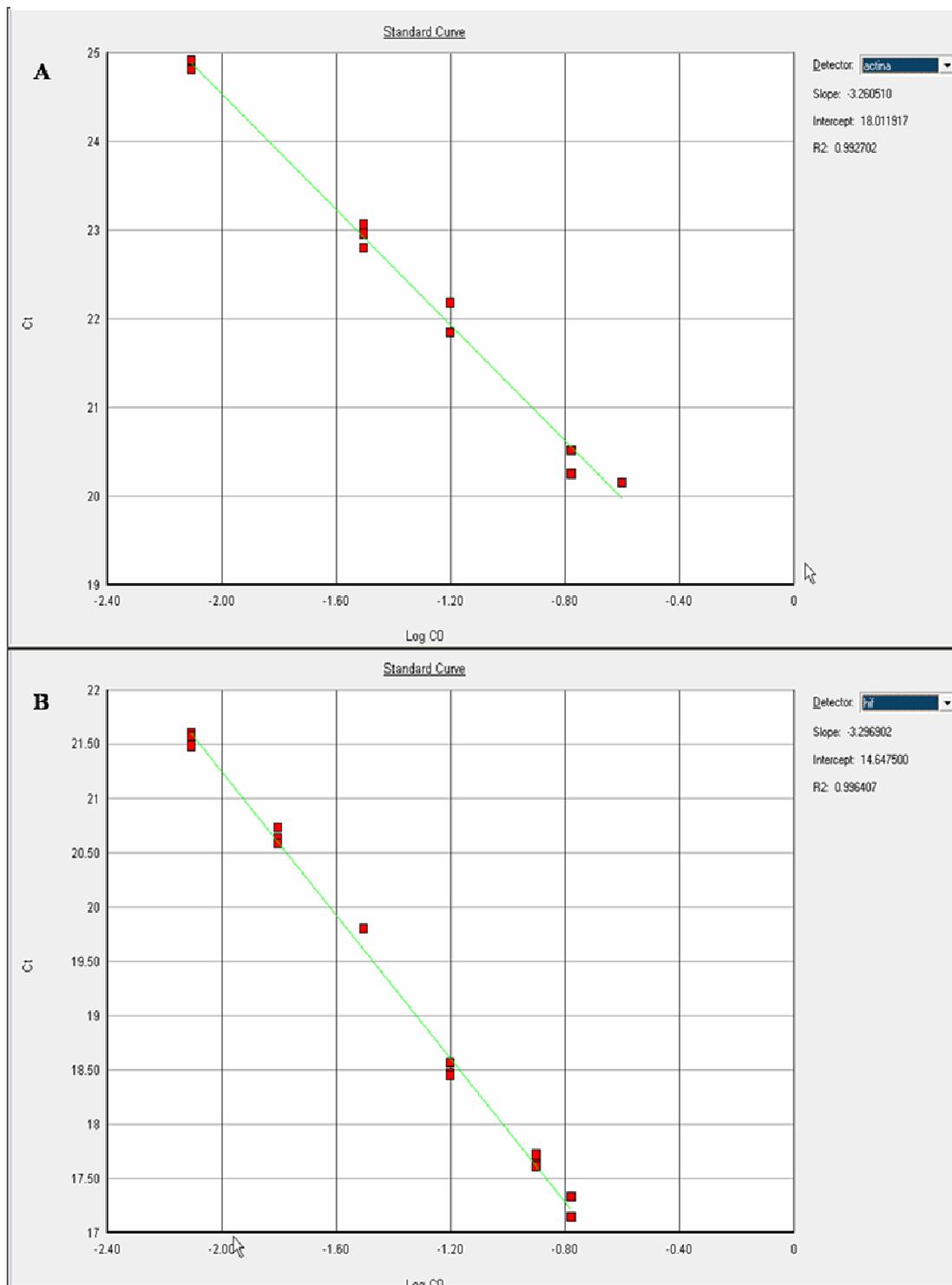


Figura 3- Curva padrão para a reação de PCR em tempo real para amplificação dos genes ACTB e HIF1A. A: Curva padrão para o gene ACTB, com “slope” igual a -3,260510 e R2 igual a 0,992702. B: Curva padrão para o gene HIF1A, com “slope” igual a -3,296902 e R2 igual a 0,996407.

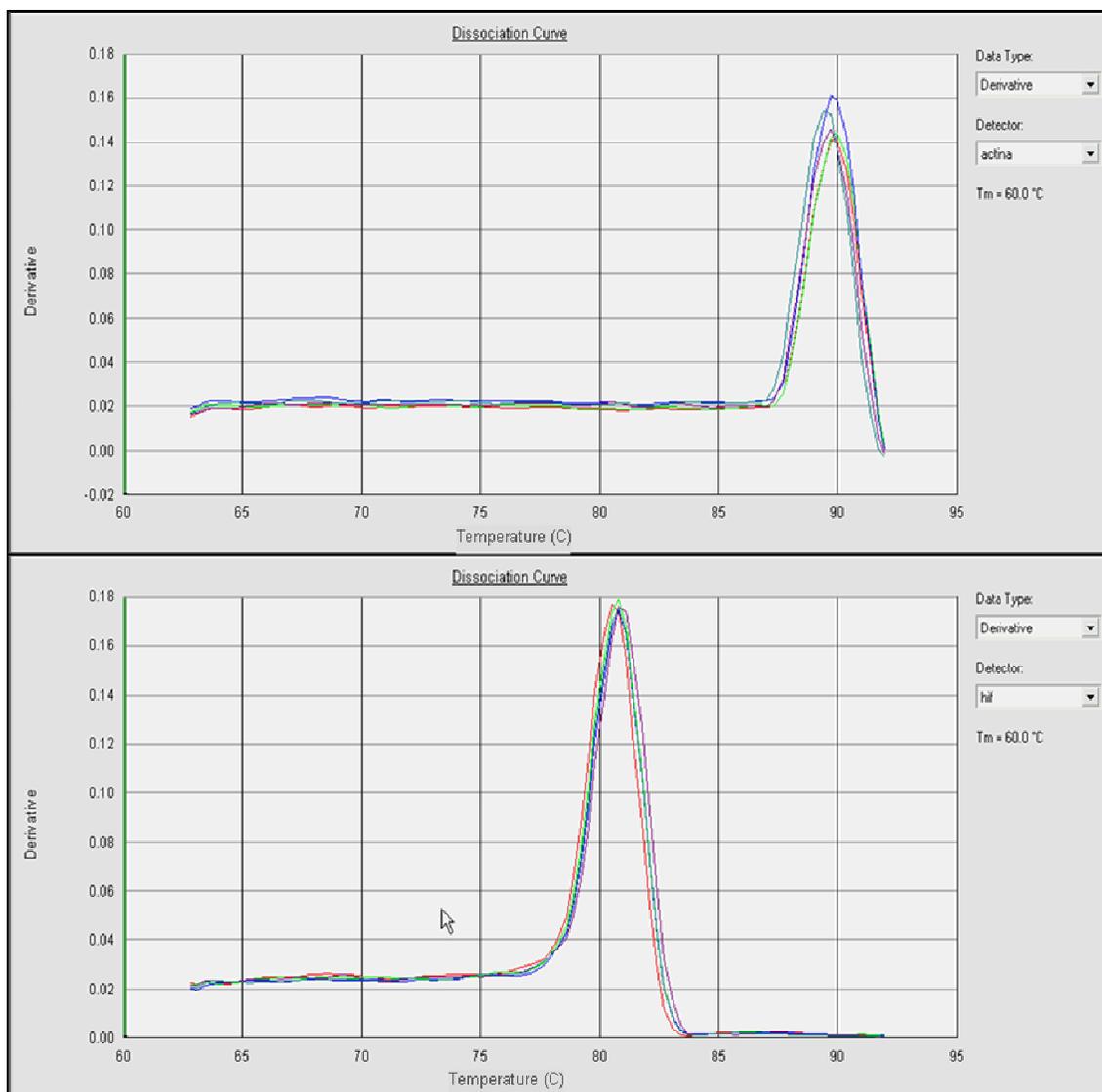


Figura 4- Curva de dissociação da reação de PCR em tempo real. A: Curva de dissociação para o gene ACTB. B: para o gene HIF1A. Em ambas as curvas observa-se apenas um pico, equivalente a 89,9°C para ACTB e 81° para HIF1A.

3.5- Extração das proteínas nucleares e citoplasmáticas

Após o tempo determinado para estímulo dos condrócitos em cultura, foram extraídas proteínas nucleares, utilizando-se a técnica do CellLytic Nuclear EXTRACTION KIT (Sigma NXTRACT), conforme descrito abaixo.

Os condrócitos foram centrifugados a 450 x g por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi homogeneizado em 2ml de PBS (Tampão salino de fosfato) adicionado de 2µl de calpaína (Calbiochem 208719) e 2µl de PI (inibidor de protease) e novamente centrifugado a 450 x g por 5 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante retirado a vácuo. O precipitado obtido nesta etapa foi homogeneizado em 500µl tampão de lise, 5µl de 0,1M de DTT (Ditiotreitol) e 5 µl de PI. Esta solução foi mantida no gelo por 15 minutos, seguida da adição 30 µl de Igepal 0,6% e agitada no Vortex por 10 segundos. A solução foi centrifugada a 10000 x g por 30 segundos e o precipitado foi ressuscitado em 50µl de tampão de extração com 0,5µl de PI, 0,5µl de 0,1M de DTT e 0,5µl de calpaína (Calbiochem 208719). Esta solução foi agitada no Vortex a 4°C por 15-30 minutos e então centrifugada a 20000 x g por 5 minutos a 4°C. A proteína nuclear contida no sobrenadante foi quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), aliqüotada e armazenada a -80°C.

3.6- Western Blotting

As proteínas nucleares extraídas e armazenadas foram descongeladas e posteriormente separadas em gel de acrilamida a 40%, medindo 1,5mm de espessura. Este gel é formado de uma parte superior, gel de empacotamento, contendo Tris a 0,5 M e uma parte inferior, o gel de corrida, composto de Tris a 1,5 M. O gel foi colocado em solução de corrida por 10 minutos a 125V, 33mA e 4W.

Foram preparadas amostras de 30µg de proteína nuclear adicionadas a 3µl de 2 x SDS e completadas com água para volume final de 30µl. As amostras foram aquecidas a 95°C por 1 minuto e 30 segundos e cada amostra é colocada em um dos poços do gel de acrilamida, sendo reservado um poço para o marcador de peso molecular. A eletroforese foi

iniciada com 30V por 30 minutos para nivelamento das amostras e após com 125V, 33mA e 4 W por aproximadamente 45 segundos. Após a eletroforese as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em cuba e solução de transferência a 100mA e 5°C durante a noite.

A membrana de nitrocelulose é bloqueada com TBS (Tampão Tris Salino), leite em pó desnatado a 5% e Tween a 0,15% com agitação por 1h30', sendo então adicionado anticorpo primário Anti-HIF-1 α (BD Biosciences 610959) na proporção 1:200 e mantido em agitação e 4°C durante a noite.

A membrana foi lavada com TBS com Tween 0,15% três vezes sendo por 15', 10' e 10' respectivamente. A membrana é colocada em solução TBS com leite em pó desnatado a 5%, Tween a 0,15% e anticorpo secundário (Amersham Biosciences NA931) na proporção 1:2000 em agitação por 2 horas. A membrana é lavada com TBS com Tween 0,15% três vezes sendo por 15', 10' e 10' respectivamente.

A membrana é colocada em solução do Kit ECL (Amersham RPN2135) sob movimentos lentos por 1'30'' e coberta com papel-filme de PVC. Na câmara escura, a membrana é colocada em contato com filme de radiografia com tempos de exposição diferentes e finalmente o filme é revelado. No filme revelado é marcado o local das bandas do marcador de peso molecular e as bordas da membrana. As imagens das bandas obtidas foram escaneadas e digitalizadas.

Para a normalização a membrana de nitrocelulose é colocada em TBS com leite desnatado a 5% e Tween a 0,15% sob agitação por duas horas e seguido de exposição ao anticorpo anti- β -actina na proporção de 1:5000 sob agitação por 1h30'. A membrana é lavada com TBS com tween 0,15% três vezes sendo por 15', 10' e 10' respectivamente. Após a membrana é colocada em solução com TBS com leite em pó desnatado a 5%, Tween a 0,15% e anticorpo secundário na proporção 1:2000 em agitação por 2 horas. A membrana é lavada com TBS com tween 0,15% três vezes sendo por 15', 10' e 10' respectivamente.

A membrana é colocada em solução do Kit ECL sob movimentos lentos por 1 minuto e 30 segundos e coberta com papel-filme de PVC. Na câmara escura, a membrana é colocada em contato com filme de radiografia com tempos de exposição diferentes e finalmente o filme é revelado. No filme revelado é marcado o local das bandas do marcador de peso molecular e as bordas da membrana. As imagens das bandas obtidas foram digitalizadas.

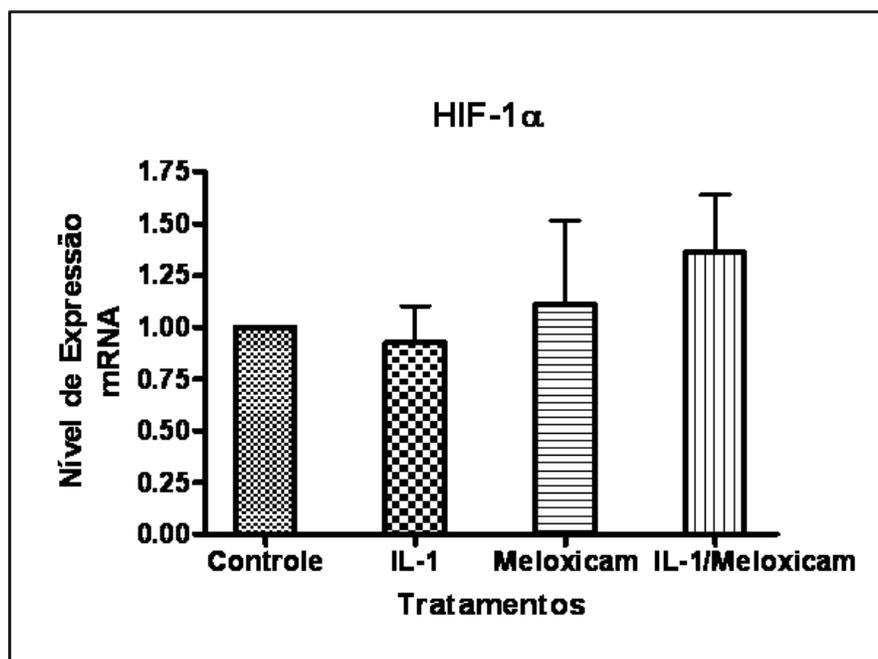
Como controle positivo foi utilizada proteína extraída de células de linhagem HeLa estimuladas com cloreto de cobalto e como controle negativo foram utilizados fibroblastos cultivados em monocamada.

As imagens digitalizadas são processadas e normalizadas no programa Image Master Total Lab 2.01 – Amersham.

4- RESULTADOS

4.1- Expressão de mRNA do HIF-1 α em condrócitos estimulados com IL-1 e TNF- α associados ou não com meloxicam

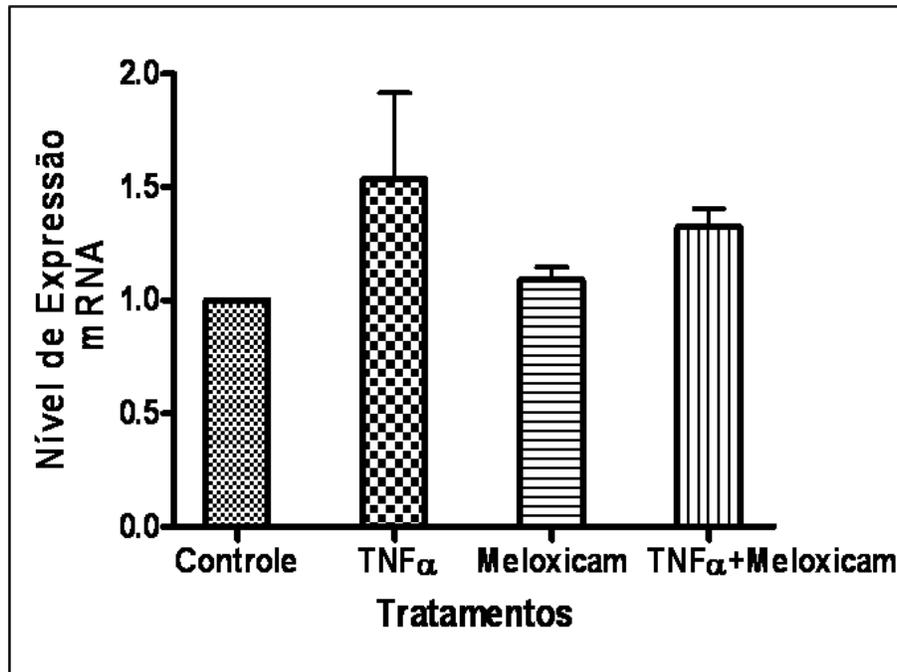
4.1.1- A expressão de mRNA do HIF em condrócitos estimulados com IL-1 e/ou meloxicam



Condrócitos provenientes de articulações osteoartíticas não estimulados, e estimulados com IL-1, meloxicam ou IL-1 associado ao meloxicam não alteraram significativamente a expressão de mRNA do HIF quando avaliado pelo método de PCR em tempo real (Figura 5).

Figura 5- Expressão relativa de mRNA do HIF em condrócitos estimulados com IL-1 e/ou meloxicam. Condrócitos humanos de cartilagem osteoartíticas divididos em grupos: controle, estimulados com IL-1 (10ng/ml), meloxicam (0,9ng/ml), e IL-1 e meloxicam por seis horas. Três experimentos independentes foram realizados e não apresentaram diferenças significativas.

4.1.2- A expressão de mRNA do HIF em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou meloxicam

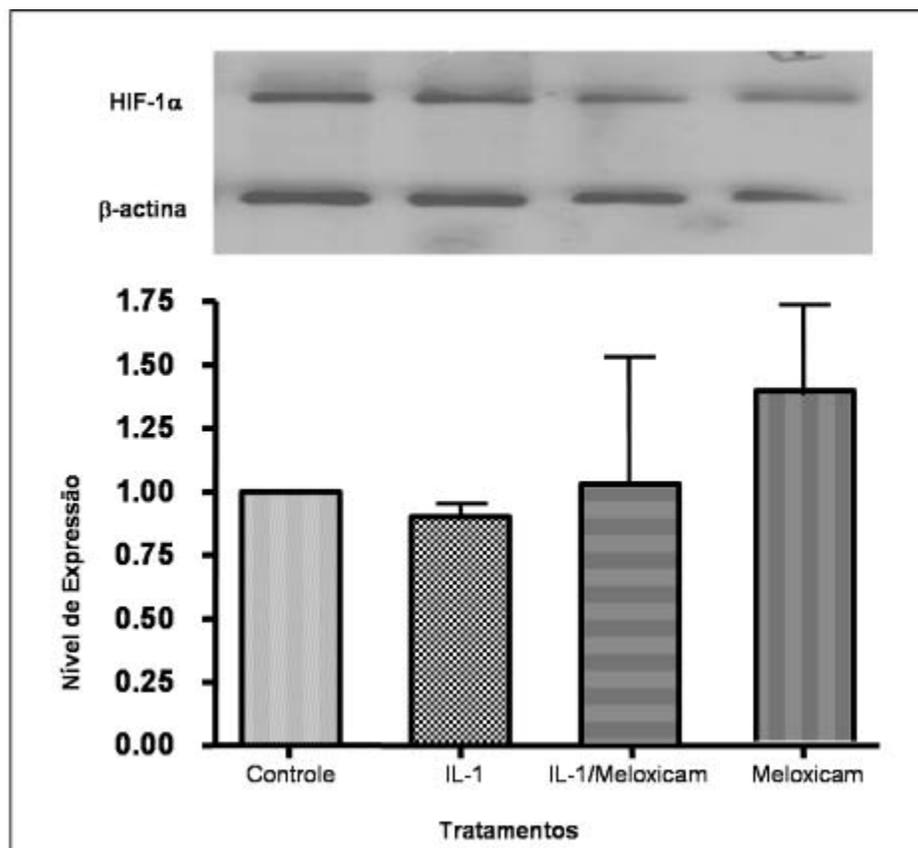


Condrócitos provenientes de articulações osteoartíticas não estimulados, e estimulados com TNF- α , meloxicam ou TNF- α associado ao meloxicam não alteraram significativamente a expressão de mRNA do HIF quando avaliado pelo método de PCR em tempo real (Figura 6).

Figura 6- Expressão relativa de mRNA do HIF-1 em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou meloxicam. Condrócitos humanos de cartilagem osteoartíticas divididos em grupos: controle, estimulados com TNF- α (10ng/ml), meloxicam (0,9ng/ml), e TNF- α e meloxicam por quatro horas. Três experimentos independentes foram realizados e não apresentaram diferenças significativas.

4.2- Expressão da proteína HIF-1 α em condrócitos estimulados com IL-1 e TNF- α associados ou não com meloxicam/ parecoxibe

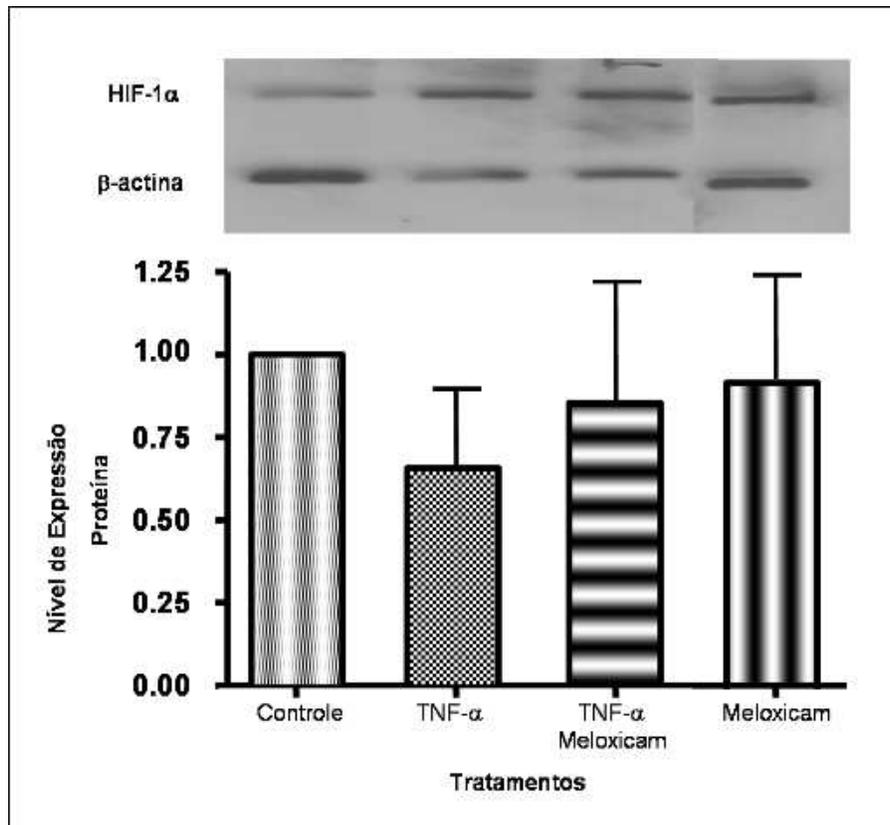
4.2.1- A expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com IL-1 e/ou meloxicam



Condrócitos provenientes de articulações osteoartíticas não estimulados, e estimulados com IL-1, meloxicam ou IL-1 associado ao meloxicam não alteraram significativamente a expressão protéica de HIF-1 α quando avaliado pela técnica de Western Blotting (Figura 7).

Figura 7- Expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com IL-1 e/ou meloxicam. Condrócitos humanos de cartilagem osteoartíticas divididos em grupos: controle, estimulados com IL-1 (10ng/ml), meloxicam (0,9ng/ml), e IL-1 e meloxicam por seis horas. Três experimentos independentes foram realizados e não apresentaram diferenças significativas.

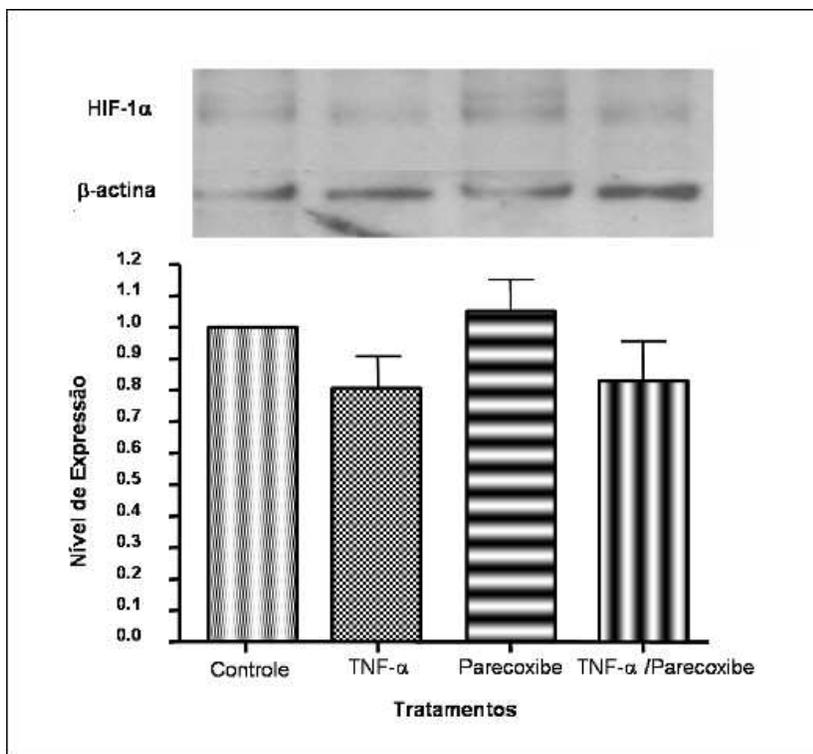
4.2.2- A expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou meloxicam



Condrócitos provenientes de articulações osteoartíticas não estimulados, e estimulados com TNF- α , meloxicam ou TNF- α associado ao meloxicam não alteraram significativamente a expressão protéica de HIF-1 α quando avaliado pela técnica de Western Blotting (Figura 8).

Figura 8- Expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou meloxicam. Condrócitos humanos de cartilagem osteoartíticas divididos em grupos: controle, estimulados com TNF- α (10ng/ml), meloxicam (0,9ng/ml), e TNF- α e meloxicam por quatro horas. Três experimentos independentes foram realizados e não apresentaram diferenças significativas.

4.2.3- A expressão protéica de HIF-1 α em condrócitos estimulados com TNF- α e/ou parecoxibe



Condrócitos provenientes de articulações osteoartíticas não estimulados, e estimulados com TNF- α , parecoxibe ou TNF- α /parecoxibe não alteraram significativamente a expressão protéica de HIF-1 α quando avaliado pela técnica de Western Blotting (Figura 9)

Figura 9- Expressão protéica de HIF-1 α em condrcitos estimulados com TNF- α e/ou parecoxibe. Condrócitos humanos de cartilagem osteoartíticas divididos em grupos: controle, estimulados com TNF- α (10ng/ml), parecoxibe (10ng/ml), e TNF- α e parecoxibe por quatro horas. Três experimentos independentes foram realizados e não apresentaram diferenças significativas.

5- DISCUSSÃO

5.1- HIF-1 α

HIF-1 α é um fator de transcrição bHLH que age como principal fator de regulação à adaptação das células a hipóxia (Wang, et al., 1995a, Wang, et al., 1993, Wang et al., 1995b). O HIF-1 α ativa muitos genes que respondem às variações das tensões de oxigênio: como a eritropoietina (EPO), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e várias enzimas da via glicolítica como a lactato desidrogenase (LDH), entre outras (Forsythe et al., 1996, Rajpurohit et al., 1996, Semenza et al., 1994, Wang, et al., 1993).

HIF-1 é uma proteína dimérica, que consiste de uma subunidade HIF-1 α e HIF-1 β (Wang, et al., 1995a). A subunidade HIF-1 β é constitutivamente expressa em diferentes tipos celulares e pode ser comum aos diferentes fatores de transcrição, entretanto o HIF-1 α é único para o HIF (Iyer et al., 1998). A expressão do HIF-1 α é altamente sensível a hipóxia e é responsável pela atividade do HIF-1 (Wang, et al., 1993).

É bem conhecido o fato da cartilagem articular não ser vascularizada, nem innervada, conseqüentemente todo o metabolismo dos condrócitos é operado em baixas tensões de oxigênio (Archer et al., 2003). Desta forma, estas células são bem adaptadas à falta de oxigênio e mantêm ao máximo os níveis de oxigênio para os processos vitais (Rajpurohit, et al., 1996). HIF-1 tem um papel de sobrevivência dos condrócitos e manutenção da homeostase na naturalmente hipóxica cartilagem articular (Coimbra et al., 2004) (Yudoh, et al., 2005). A degeneração da cartilagem articular na OA causa fibrilação no tecido e, algumas vezes, microfraturas no osso subcondral. Este processo provavelmente rompe o gradiente de oxigênio na cartilagem, produzindo aumento das tensões de oxigênio. A presença de maior tensão de oxigênio pode facilitar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais sabidamente tem papel de sinalização e podem contribuir na modulação da expressão gênica do condrócito (Martin, et al., 2004). O estudo de condrócitos humanos cultivados em normóxia torna-se relevante com a possibilidade de aumento das tensões de oxigênio nas cartilagens osteoartríticas. Assim foi optado por estudar a expressão do HIF-1 α em condrócitos provenientes de articulações osteoartríticas em tensões normais de oxigênio.

5.2- Cultura em suspensão

Foi escolhido o método de cultura em suspensão utilizando-se um hidrogel, Polyhema, para revestir as placas de cultura. O cultivo sem este revestimento permite às células aderirem ao frasco, diferenciar-se de sua forma original, tornando-se alongadas e deixando de expressar os elementos da matriz extracelular, culminando na perda do fenótipo condrocítico. Em suspensão, os condrócitos permanecem com seu formato arredondado, unem-se em grupos e permanecem expressando elementos da matriz extracelular, inclusive formando nódulos de células com produção de matriz extracelular. O fenótipo condrocítico, neste sistema, é preservado por mais de seis meses (Reginato et al., 1994).

5.3- Expressão de HIF-1 α mRNA

O cultivo de condrócitos, que são originados de um tecido relativamente hipóxico, no sistema de cultivo em suspensão pode tornar o ambiente, principalmente a parte central dos agrupamentos, hipóxico (Stokes et al., 2002). Condrócitos humanos cultivados em monocamada, após 11 dias, diminuem a expressão de mRNA do HIF-1 α quando comparada com a cultura em suspensão. Esta diminuição pode ser explicada pela desdiferenciação celular, assim como pelo fato das células deixarem de se agrupar e perderem sua forma arredondada para apresentar aspecto fibroblástico, alongado e com maior contato com o meio (Stokes, et al., 2002), conseqüentemente maior exposição às moléculas de oxigênio.

Condrócitos originários de cartilagem articular provenientes de áreas mais degeneradas de osteoartrite apresentam maior expressão de mRNA do HIF-1 α , assim como quando estimulados com IL-1 em hipóxia (Yudoh, et al., 2005). Nossos resultados não apresentaram variações significativas da expressão de mRNA do HIF-1 α após estímulo com IL-1, TNF- α e meloxicam. Estes resultados são os mesmos obtidos por inúmeros pesquisadores que não obtiveram diferenças na expressão de mRNA do HIF-1 α em experimentos utilizando diferentes linhagens de células (PC-3, A549, NIH 3T3) tratadas

com IL-1, TNF- α e meloxicam (Jung et al., 2003b, Liu et al., 2002a); e por Yudoh et al (2005) utilizando condrócitos humanos estimulados com IL-1 em normóxia (Yudoh, et al., 2005). Embora existam evidências que a expressão de mRNA do HIF-1 α pode se alterar em situações específicas, de forma geral, os mecanismos regulatórios do HIF ocorrem através da degradação da proteína HIF-1 α no citoplasma (Gaber, et al., 2005, Schipani et al., 2001).

5.4- Expressão de HIF-1 α

O fator de transcrição HIF-1 α é rapidamente degradado em normóxia por proteases (Maxwell, et al., 1999) e são poucos os trabalhos que relatam a expressão do HIF-1 α em condrócitos cultivados em normóxia (Coimbra, et al., 2004, Yudoh, et al., 2005).

O HIF-1 α não é detectável em células HeLaS3 cultivadas em normóxia. Quando estas células são colocadas em hipóxia há acúmulo rápido de HIF-1 α nos primeiros 30 minutos, sendo detectável aos 2 minutos de exposição a hipóxia. Após 30 minutos há acúmulo gradual e atinge o nível máximo com 60 minutos de exposição. A ligação do HIF-1 α no DNA torna-se evidente com quatro minutos de exposição, aumenta rapidamente por um período de uma hora e atingindo pico com quatro horas de exposição a hipóxia. Células HeLaS3 submetidas a hipóxia não aumentaram a expressão de NF- κ B e outros fatores ligados a atividade inflamatória após exposição a hipóxia por mais de 60 minutos, mostrando que o processo inflamatório não está relacionado com o aumento do HIF-1 α na primeira hora de exposição a hipóxia. Após um período de uma hora de hipóxia, células HeLaS3 foram colocadas em normóxia. Nos primeiros quatro minutos, em condições normais de oxigênio, o HIF-1 α continuava a aumentar e com oito minutos de exposição começava a diminuir e tornava-se indetectável aos 32 minutos de exposição. Durante a reoxigenação o NF- κ B e tioredoxina aumentam a expressão do primeiro ao oitavo minuto, sendo que o aumento ocorre pouco antes na tioredoxina que no NF- κ B. Sugerindo ocorrer um estresse oxidativo durante a reoxigenação (Jewell et al., 2001).

Coimbra et al (2004) avaliou a expressão do HIF-1 α em condrócitos humanos provenientes de articulações osteoartríticas, estes expressavam HIF-1 α em normóxia e quando colocados em hipóxia havia um aumento discreto da expressão do HIF-1 α . Yudoh et al (2005) também avaliou a expressão de HIF-1 α em condrócitos humanos provenientes de articulações osteoartríticas e os condrócitos expressavam HIF-1 α em hipóxia, mas não expressavam em normóxia. Estes dois experimentos foram realizados com metodologias diferentes, sendo que Coimbra et al (2004) utilizou cultura em suspensão e Yudoh et al (2005) utilizou cultura em monocamada. Foi realizada cultura em suspensão e normóxia de condrócitos humanos provenientes de articulações osteoartríticas e o HIF-1 α estava presente em todos os grupos estudados, sendo estes resultados os mesmos encontrados por Coimbra et al (Coimbra, et al., 2004). A expressão do HIF-1 α em normóxia pode ser devido a preservação do fenótipo dos condrócitos, que constitutivamente expressam HIF-1 α (Coimbra, et al., 2004). A cultura em monocamada altera profundamente o padrão de expressão gênica do condrócito, diminuindo significativamente a expressão de mRNA de colágeno II e agregcano, e aumentando a expressão de colágeno I (Stokes, et al., 2002). Outra possibilidade seria o modelo de cultura utilizado, em suspensão, onde os condrócitos tendem a se agruparem e as células mais centrais destes agrupamentos podem ficar privadas das demandas de oxigênio(Stokes, et al., 2002).

5.5- Osteoartrite

A IL-1 e TNF- α podem ser expressas por condrócitos e fibroblastos (Hedbom, et al.) e parecem ser as citocinas proinflamatórias mais diretamente relacionadas no processo patológico da OA (Fukui et al., 2001, Hedbom, et al., 2002). A IL-1 β sofre ação da caspase I, enzima de conversão da IL-1, e torna-se ativa (Fukui, et al., 2001). Na superfície da célula, o TNF- α sofre a ação da enzima de conversão do TNF- α e torna-se ativo (Fukui, et al., 2001). Estas citocinas ativadas agem de forma similar e sinergicamente na destruição da cartilagem articular, através da ativação de várias vias inflamatórias, como a do NF- κ B, que culminam na expressão de metaloproteinases (MMPs), COX e NOS

(Goldring et al., 2004a). Além da ação direta sobre as vias inflamatórias, estas citocinas modulam a expressão de outras citocinas proinflamatórias (Hedbom, et al., 2002).

O paracetamol geralmente é a droga de escolha para o tratamento da OA, porém pacientes com dor moderada a grave podem necessitar um efeito analgésico maior para o alívio de seus sintomas. Os AINHs podem fazer parte da primeira opção de tratamento nestas condições (Moskowitz, 2001), sendo na prática os medicamentos mais utilizados no tratamento sintomático da OA (Lianxu et al., 2006, Schurman, et al., 2004).

A atividade terapêutica dos AINHs se baseia na sua atividade inibitória sobre a COX, que catalisa a síntese de endoperoxidasas cíclicas pelo ácido araquidônico para produzir prostaglandinas. Há duas isoformas da enzima COX: COX-1 que é constitutivamente expressa em muitos tecidos, realizando uma função de síntese de prostaglandinas as quais fazem parte da atividade celular normal. A COX-2 é expressa em células envolvidas em processos inflamatórios, sendo responsável pela síntese de prostanóides (Chun et al., 2004). Baseado em estudos, *in vitro* e *in vivo*, de modelos fisiológicos da atividade da COX, tem sido proposto que os efeitos adversos associados aos AINHs, como os gastrointestinais, podem ser explicados pela inibição da COX-1; e os efeitos desejáveis seriam devido aos efeitos antiinflamatórios associados a inibição da COX-2 (Valat et al., 2001). Os inibidores seletivos da COX-2 apresentam a vantagem de diminuir os efeitos adversos gastrointestinais (Hochberg, 2001). O meloxicam, nimesulida e etodolac foram identificados na década de 1980s como um potente antiinflamatório com baixa atividade ulcerogênica e baixa atividade sobre a síntese de prostaglandinas em estômago de rato. Depois da descoberta da COX-2, estas três fármacos foram considerados como inibidores seletivos para COX-2 (Vane et al., 1996).

O meloxicam é em torno de 10 vezes mais potente para COX-2 que para COX-1 no sangue periférico (Vane, 2000) Já o parecoxibe é um pró-fármaco que necessita ser metabolizado e transformado em valdecoxibe pelas esterases hepáticas para se tornar ativo. O valdecoxibe é em torno de 30 vezes mais potente para COX-2 que para COX-1 (Stichtenoth, 2004). O meloxicam e o parecoxibe são os dois fármacos seletivos para COX-2 disponíveis comercialmente no Brasil para uso parenteral, tendo sido esta razão da escolha para o uso destes fármacos neste estudo.

Além da utilização no tratamento da dor na osteoartrite, sabe-se que os AINHs tem capacidade de inibir o crescimento tumoral decorrente da inibição da angiogênese tumoral, demonstrada pela diminuição do número de vasos formados (Milas et al., 1991). Isto ocorre mesmo em ratos atímicos e tumores não imunogênicos, sugerindo que inibição da angiogênese não se deve a fatores imunológicos (Milas, et al., 1991). Os antiinflamatórios seletivos agem através da inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) reduzindo a angiogênese, inibindo o crescimento das células dos vasos neoformados e bloqueando a produção, pelas células tumorais, de fatores de crescimento angiogênico (Leahy et al., 2002, Masferrer, et al., 2000, Sawaoka et al.). A inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1) não altera a angiogênese (Masferrer, et al., 2000). A inibição da COX-2 inibe a expressão de fator de crescimento endovascular (VEGF) (Liu et al., 2000, Zhong et al., 2004) e de HIF-1 α (Zhong, et al., 2004), inibindo o crescimento tumoral. A inibição do VEGF pode ser decorrente da inibição do HIF-1 α (Fukui, et al., 2001, Gaber, et al., 2005, Semenza, 2001).

5.6- Estímulo com citocinas

A expressão do fator de transcrição HIF-1 α pode ser induzida pelas citocinas IL-1 e TNF- α (Coimbra, et al., 2004, Haddad et al., 2001, Hellwig-Burgel et al., 1999, Jung et al., 2003a, Jung, et al., 2003b). O mecanismo pelo qual ocorre esta indução parece estar relacionado com outro fator de transcrição, o Fator Nuclear Kappa do Linfócito B (NF- κ B). O NF- κ B está relacionado as respostas inflamatórias como a produção de COX-2, NOS-2 e metaloproteinases (Lianxu, et al., 2006, Schmedtje et al., 1997). Condrócitos tratados com IL-1 e TNF- α ativam o NF- κ B que induzem a expressão de COX-2, NOS-2 e MMPs, e quando administrado RNA interferente (siRNA) para silenciar a expressão gênica do NF- κ B a expressão de COX-2, NOS-2 e metaloproteinases é significativamente diminuída (Lianxu, et al., 2006). O tratamento com IL-1 e TNF- α aumenta a expressão de HIF-1 α em diferentes linhagens de células, este aumento não ocorre quando utilizado inibidor da COX-2 ou ainda, com o uso de moléculas que têm a capacidade de inibir a ativação da via do NF- κ B (Jung, et al., 2003a). A administração de PGE₂, mesmo na

presença de inibidores da COX-2, eleva a expressão de HIF-1 α (Liu, et al., 2002a) . Assim era esperado que ocorresse aumento de HIF-1 α em condrócitos estimulados com IL-1 e TNF- α , e que este aumento pudesse ser inibido pela ação de inibidores de COX-2. Células HepG2 estimuladas com IL-1 β aumentam a expressão de HIF-1 α no núcleo em normóxia e quando estimuladas com TNF- α não alteram a expressão de HIF-1 α , por outro lado, ambas aumentam a atividade de ligação do HIF-1 α no DNA celular (Hellwig-Burgel, et al., 1999).

Células NIH 3T3 tratadas com TNF- α induziram o aumento de HIF-1 α em extrato de proteína nuclear, sem alterar a expressão de mRNA de HIF-1 α ; o acúmulo de HIF-1 α no núcleo decorreu da estabilização da proteína HIF-1 α no citoplasma via NF- κ B (Jung, et al., 2003a). Em células epiteliais alveolares o TNF- α aumenta a expressão do HIF-1 α em hipóxia, mas sem estímulo e em normóxia o HIF-1 α não é detectável (Haddad, et al., 2001). Coimbra et al (2004), utilizando a mesma metodologia, demonstrou que o TNF- α aumentava a expressão de HIF-1 α em normóxia, e que este aumento era discreto quando os condrócitos eram cultivados em hipóxia (Coimbra, et al., 2004). Neste estudo o TNF- α não alterou significativamente a expressão do HIF-1 α em condrócitos humanos cultivados em normóxia. Células de articulações osteoartríticas podem expressar IL-11, citocina antiinflamatória, que apresenta a capacidade de inibir a expressão de COX-2 secundária ao estímulo com TNF- α (Alaeddine et al., 1999), e conseqüentemente a expressão de HIF-1 α .

Poucas publicações estudaram os efeitos de IL-1 sobre o HIF-1 α em condrócitos. Martin et al (2004) concluiu que condrócitos bovinos cultivados em monocamada e exposto a IL-1 não aumentou significativamente a atividade de ligação do HIF-1 α no DNA em hipóxia e normóxia (Martin, et al., 2004). Yudoh et al (2005) observou que condrócitos humanos cultivados em monocamada e estimulado com IL-1 aumentam a expressão de HIF-1 α quando em hipóxia, enquanto que esta proteína é indetectável mesmo após estímulo com IL-1 em normóxia (Yudoh, et al., 2005). Murata et al trataram com IL-1 condrócitos humanos provenientes de joelhos osteoartríticos, cultivados em monocamada e tratados com IL-1 observaram o aumento da expressão de HIF-1 α somente após 24 horas (Murata et al., 2006). Condrócitos provenientes de cartilagem OA avançada podem

expressar antagonista do receptor de IL-1 e retardar a expressão de HIF-1 α secundária ao tratamento com IL-1 (Murata et al., 2003, Murata, et al., 2006, Towle et al., 1997). Em nossos experimentos a IL-1 não alterou significativamente a expressão do fator HIF-1 α em condrócitos humanos osteoartríticos.

5.7- Inibidores da COX-2

A ativação da fosfolipase A₂ pelo TNF- α gera a produção de ácido araquidônico (AA) (Heller et al., 1994), TNF- α estimula também na síntese de COX-2 que age a nível de AA para síntese de PGE₂ (Alaeddine, et al., 1999, Heller, et al., 1994). TNF- α induz a síntese de IL-1, que também age na síntese de PGE₂ (Jung, et al., 2003b, Vassalli, 1992). Liu et al (2002) utilizando células PC-3ML, que hiperexpressam COX-2, cultivadas em normóxia e tratadas com meloxicam diminuíam a expressão de HIF-1 α (Liu et al., 2002b). Quando tratadas com PGE₂ a expressão do HIF-1 α aumentava mesmo na presença de meloxicam (Kirschenbaum et al., 2001, Liu, et al., 2002b). Células epiteliais de pulmão tratadas com IL-1 aumentam a expressão de HIF-1 α , sendo que este aumento ocorre pela via do NF- κ B e quando as células estimuladas com IL-1 são tratadas com inibidores da COX-2 não ocorre aumento do HIF-1 α (Jung, et al., 2003a). Condrócitos tratados com meloxicam e parecoxibe não apresentaram mudanças na expressão do HIF-1 α . O meloxicam agiria inibindo o estímulo do TNF- α e IL-1 através do bloqueio da COX-2. Como não ocorreu estímulo por estas citocinas, era previsível que não ocorresse alteração da expressão de HIF-1 α . nos grupos tratados com meloxicam. O parecoxibe é uma pró-droga e foi utilizada somente em experimentos com TNF- α , pois previamente não se esperava efeito sobre a expressão do HIF-1 α .

5.8- Considerações finais

Os resultados obtidos nos experimentos podem ter sido influenciados por características da cartilagem articular obtida de pacientes submetidos a artroplastias, como o grau de degeneração, e por medicações que os pacientes doadores fizeram uso antes e

durante a cirurgia. Como foi trabalhado com cultura primária de condrócitos, cada experimento corresponde a um grau de degeneração articular, diferentes níveis de inflamação e, muitas vezes, estas células já poderiam estar sob a ação de AINHs, insulina, corticóides, entre outros medicamentos. Estes dados não foram coletados no momento da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido; e grande parte das cartilagens captadas foi conseguida em outras cidades, o que dificultou a obtenção destes dados retrospectivamente. Provavelmente a coleta destes dados passará a ser rotina e poderão ser utilizados nos próximos estudos do grupo.

As peças cirúrgicas manipuladas no laboratório, na maioria das vezes, era de articulações em estágios avançados de OA e, conseqüentemente, o número de células obtidos era reduzido. Isto reflete também o perfil do grau de osteoartrite dos pacientes submetidos a artroplastia no nosso meio.

HIF-1 α tem um papel importante, na osteoartrite, na manutenção da viabilidade dos condrócitos durante a fase catabólica da cartilagem articular (Yudoh, et al., 2005). HIF-1 α provavelmente age como um fator induzido pelo estresse celular promovendo a sobrevivência dos condrócitos no ambiente hostil da OA (Pfander, et al., 2006).

6- CONCLUSÕES

- Condrócitos humanos provenientes de articulações osteoartíticas expressaram HIF-1 α e HIF-1 α mRNA quando cultivados em normóxia e suspensão.
- A expressão de HIF-1 α mRNA em condrócitos cultivados em normóxia e suspensão não alterou significativamente quando estimulados com IL-1 e TNF- α associados ou não com meloxicam.
- A expressão da proteína HIF-1 α em condrócitos cultivados em normóxia e suspensão não alterou significativamente quando estimulados com IL-1 e TNF- α associados ou não com meloxicam e parecoxibe.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Alaaeddine, N, Di Battista, JA, Pelletier, JP, Kiansa, K, Cloutier, JM, Martel-Pelletier, J. Differential effects of IL-8, LIF (pro-inflammatory) and IL-11 (anti-inflammatory) on TNF-alpha-induced PGE(2)release and on signalling pathways in human OA synovial fibroblasts. *Cytokine* 1999; 11(12):1020-30.

Archer, CW, Francis-West, P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35(4):401-4.

Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 1976; 72:248-54.

Brooks, PM. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14(5):573-7.

Buckwalter, JA. Tecidos Musculoesqueléticos e Sistema Musculoesquelético. In: Weinstein, SLB, J.A. (ed). *Ortopedia de Turek- Princípios e sua Aplicação*. Brasil: Manole; 2000. pp. 13-68.

Buckwalter, JA, Brown, TD. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004(423):7-16.

Buckwalter, JA, Mankin, H.J. Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthrosis, Repair, Regeneration, and Transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79-A(4):612-32.

Chun, KS, Surh, YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6): 1089-100.

Coimbra, IB, Jimenez, SA, Hawkins, DF, Piera-Velazquez, S, Stokes, DG. Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12(4):336-45.

Condino-Neto, A, Newburger, PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *Blood* 2000; 95(11):3548-54.

Forsythe, JA, Jiang, BH, Iyer, NV, Agani, F, Leung, SW, Koos, RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9):4604-13.

Fukui, N, Purple, CR, Sandell, LJ. Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury. *Current rheumatology reports* 2001; 3(6):496-505.

Gaber, T, Dziurla, R, Tripmacher, R, Burmester, GR, Buttgerit, F. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis* 2005; 64(7):971-80.

Goldring, MB, Berenbaum, F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res* 2004a(427 Suppl): S37-46.

Goldring, SR, Goldring, MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004b(427 Suppl):S27-36.

Haddad, JJ, Land, SC. A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha. *FEBS Lett* 2001; 505(2):269-74.

Hedbom, E, Hauselmann, HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(1):45-53.

Heller, RA, Kronke, M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol* 1994; 126(1):5-9.

Hellwig-Burgel, T, Rutkowski, K, Metzen, E, Fandrey, J, Jelkmann, W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; 94(5):1561-7.

Hochberg, MC. What have we learned from the large outcomes trials of COX-2 selective inhibitors? The rheumatologist's perspective. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19 (6 Suppl 25):S15-22.

Iyer, NV, Leung, SW, Semenza, GL. The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: HIF1A structure and evolutionary conservation. 1998.

Jewell, UR, Kvietikova, I, Scheid, A, Bauer, C, Wenger, RH, Gassmann, M. Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J* 2001; 15(7):1312-4.

Jung, Y, Isaacs, JS, Lee, S, Trepel, J, Liu, ZG, Neckers, L. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J* 2003a; 370(Pt 3):1011-7.

Jung, YJ, Isaacs, JS, Lee, S, Trepel, J, Neckers, L. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 2003b; 17(14):2115-7.

Junqueira, LCC, J. Tecido Cartilagenoso. In: Junqueira, LCC, J. (ed). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. pp. 104-10.

Kiaer, T, Kristensen, KD. Intracompartmental pressure, PO₂, PCO₂ and blood flow in the human skeletal muscle. *Arch Orthop Trauma Surg* 1988; 107(2):114-6.

Kirschenbaum, A, Liu, X, Yao, S, Levine, AC. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Urology* 2001; 58(2 Suppl 1):127-31.

Lane, JM, Brighton, CT, Ottens, HR, Lipton, M. Joint resurfacing in the rabbit using an autologous osteochondral graft. *J Bone Joint Surg Am* 1977; 59(2):218-22.

Leahy, KM, Ornberg, RL, Wang, Y, Zweifel, BS, Koki, AT, Masferrer, JL. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 2002; 62(3):625-31.

Lee, PJ, Jiang, BH, Chin, BY, Iyer, NV, Alam, J, Semenza, GL, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272(9):5375-81.

Lianxu, C, Hongti, J, Changlong, Y. NF-kappaBp65-specific siRNA inhibits expression of genes of COX-2, NOS-2 and MMP-9 in rat IL-1beta-induced and TNF-alpha-induced chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14(4):367-76.

Liu, LX, Lu, H, Luo, Y, Date, T, Belanger, AJ, Vincent, KA, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2002a; 291(4):908-14.

Liu, XH, Kirschenbaum, A, Lu, M, Yao, S, Dosoretz, A, Holland, JF, et al. Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem* 2002b; 277(51):50081-6.

Liu, XH, Kirschenbaum, A, Yao, S, Lee, R, Holland, JF, Levine, AC. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer in vivo. *J Urol* 2000; 164(3 Pt 1):820-5.

Lund-Olesen, K. Oxygen tension in synovial fluids. *Arthritis Rheum* 1970; 13(6):769-76.

March, LM, Bachmeier, CJ. Economics of osteoarthritis: a global perspective. *Baillieres Clin Rheumatol* 1997; 11(4):817-34.

Martin, G, Andriamanalijaona, R, Grassel, S, Dreier, R, Mathy-Hartert, M, Bogdanowicz, P, et al. Effect of hypoxia and reoxygenation on gene expression and response to interleukin-1 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2004; 50(11):3549-60.

Masferrer, JL, Needleman, P. Anti-inflammatories for cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(23):12400-1.

Maxwell, PH, Wiesener, MS, Chang, GW, Clifford, SC, Vaux, EC, Cockman, ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399(6733):271-5.

Milas, L, Hunter, N, Furuta, Y, Nishiguchi, I, Runkel, S. Antitumour effects of indomethacin alone and in combination with radiotherapy: role of inhibition of tumour angiogenesis. *Int J Radiat Biol* 1991; 60(1-2):65-70.

Mollenhauer, JA, Erdmann, S. Introduction: molecular and biomechanical basis of osteoarthritis. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(1):3-4.

Moskowitz, RW. The role of anti-inflammatory drugs in the treatment of osteoarthritis: a United States viewpoint. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19(6 Suppl 25):S3-8.

Murata, M, Trahan, C, Hirahashi, J, Mankin, HJ, Towle, CA. Intracellular interleukin-1 receptor antagonist in osteoarthritis chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res* 2003(409): 285-95.

Murata, M, Yudoh, K, Nakamura, H, Kato, T, Inoue, K, Chiba, J, et al. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2006.

Pfander, D, Swoboda, B, Cramer, T. The role of HIF-1alpha in maintaining cartilage homeostasis and during the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(1):104.

Poole, AR, Kojima, T, Yasuda, T, Mwale, F, Kobayashi, M, Laverty, S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001 (391 Suppl):S26-33.

Poole, AR, Pidoux, I, Reiner, A, Rosenberg, L. An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage. *J Cell Biol* 1982; 93(3):921-37.

Rajpurohit, R, Koch, CJ, Tao, Z, Teixeira, CM, Shapiro, IM. Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. *J Cell Physiol* 1996; 168(2):424-32.

Rang, HP, Dale, MM, Ritter, JM, Moore, PK. *Farmacologia*: Churchill Livingstone. 2004.

Reginato, AM, Iozzo, RV, Jimenez, SA. Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate. *Arthritis Rheum* 1994; 37(9):1338-49.

Sawaoka, H, Tsuji, S, Tsujii, M, Gunawan, ES, Sasaki, Y, Kawano, S, et al. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 1999; 79(12):1469-77.

Schipani, E. Hypoxia and HIF-1 alpha in chondrogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16 (4-5):539-46.

Schipani, E, Ryan, HE, Didrickson, S, Kobayashi, T, Knight, M, Johnson, RS. Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival. *Genes Dev* 2001; 15(21):2865-76.

Schmedtje, JF, Jr., Ji, YS, Liu, WL, DuBois, RN, Runge, MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272(1):601-8.

Schurman, DJ, Smith, RL. Osteoarthritis: current treatment and future prospects for surgical, medical, and biologic intervention. *Clin Orthop Relat Res* 2004(427 Suppl): S183-9.

Semenza, GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 2001; 7(8):345-50.

Semenza, GL, Roth, PH, Fang, HM, Wang, GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1994; 269(38):23757-63.

Sharma, L, Kapoor, D, Issa, S. Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18(2):147-56.

Sledge, CBR, A.H.; Walsh, D.A., Blake, D.R. Biology of the Normal Joint. In: Ruddy, SHJ, D.E.; Sledge, C.B. (ed). *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: Elsevier Science; 2001. pp. 1-26.

Solomon, L. Clinical Features of Osteoarthritis. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Philadelphia: Elsevier Science; 2001. pp. 1409-18.

Stichtenoth, DO. The second generation of COX-2 inhibitors: clinical pharmacological point of view. *Mini Rev Med Chem* 2004; 4(6):617-24.

Stokes, DG, Liu, G, Coimbra, IB, Piera-Velazquez, S, Crowl, RM, Jimenez, SA. Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(2):404-19.

Tew, S, Redman, S, Kwan, A, Walker, E, Khan, I, Dowthwaite, G, et al. Differences in repair responses between immature and mature cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 2001(391 Suppl):S142-52.

Torres, L, Dunlop, DD, Peterfy, C, Guermazi, A, Prasad, P, Hayes, KW, et al. The relationship between specific tissue lesions and pain severity in persons with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006.

Towle, CA, Hung, HH, Bonassar, LJ, Treadwell, BV, Mangham, DC. Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5(5):293-300.

Treuhart, PS, DJ, MC. Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases. *Arthritis Rheum* 1971; 14(4):475-84.

Valat, JP, Accardo, S, Reginster, JY, Wouters, M, Hettich, M, Lieu, PL. A comparison of the efficacy and tolerability of meloxicam and diclofenac in the treatment of patients with osteoarthritis of the lumbar spine. *Inflamm Res* 2001; 50 Suppl 1:S30-4.

Vane, JR, Botting, RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol Suppl* 1996; 102:9-21.

Vane, SJ. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. *Thorax* 2000; 55 Suppl 2:S3-9.

Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411-52.

Wang, GL, Jiang, BH, Rue, EA, Semenza, GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. Proc Natl Acad Sci U S A 1995a; 92(12):5510-4.

Wang, GL, Semenza, GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(9):4304-8.

Wang, GL, Semenza, GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 1995b; 270(3):1230-7.

Yudoh, K, Nakamura, H, Masuko-Hongo, K, Kato, T, Nishioka, K. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. Arthritis Res Ther 2005; 7(4):R904-14.

Zhong, H, Willard, M, Simons, J. NS398 reduces hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-1 activity: multiple-level effects involving cyclooxygenase-2 dependent and independent mechanisms. Int J Cancer 2004; 112(4):585-95.