

AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE UM POLISSACARÍDEO DE GOMA GUAR COMPARADO A HILANO G- F20

Pedro Henrique Carvalho dos Santos
Francisco Airton Castro da Rocha

Universidade Federal do Ceará – pedrocarvalhosh@hotmail.com

Introdução: Osteoartrite é um tipo de doença das articulações que resulta da degeneração da cartilagem e do osso subjacente. Os sintomas mais comuns são rigidez e dor nas articulações. Em estudo anterior, caracterizamos um polissacarídeo de goma guar (GG) com efeito analgésico e condroprotetor em osteoartrite experimental. Comparamos a segurança e biocompatibilidade do GG com hilano G-F20 (Syn), agente de viscosuplementação comercializado mundialmente. Método: Administramos GG, Syn ou salina intra-articular (i.a) no joelho de camundongos avaliando dor (hipernocicepção - teste de Von Frey), migração celular e níveis de citocinas (às 6h) no lavado articular e processamos as juntas para histopatologia (HE). Resultados: GG e Syn promovem leve influxo celular agudo às 6 h, que desaparece às 24 h, sem promover hipernocicepção. Níveis de IL-6 i.art. foram 25.3 ± 11.5 , 542.9 ± 393.4 e 617.9 ± 262.6 após salina, Syn e GG, respectivamente; CXCL-1(análogo de IL-8) foi de 23.8 ± 1.1 , 144 ± 33.3 e 288 ± 58.6 após salina, Syn e GG, respectivamente; IL-1 foi de 16.3 ± 1.7 , 47 ± 12.6 e 11.4 ± 4.1 para salina, Syn e GG, respectivamente, havendo maior liberação de IL-6 e CXCL-1 no GG comparado a Syn e ambos comparados a salina. Nível de IL-1 foi levemente maior no grupo Syn que salina. Conclusão: Ambos GG e Syn têm boa biocompatibilidade in vivo e promovem liberação de IL-6 e CXCL-1 na junta. A toxicidade in vitro, medida pela IC50, é significativamente menor para o GG, comparado a Syn, revelando melhor perfil de segurança comparativo para o GG.

Palavras-chave: Viscosuplementação, polissacarídeo, osteoartrite

1 Introdução

A osteoartrite (OA) é uma doença articular crônica degenerativa que pode ser desencadeada por fatores mecânicos, por exemplo trauma, e biológicos (JOHNSON & HUNTER, 2014). A fisiopatologia da OA sugere que tais fatores desequilibram os processos de síntese e degradação na cartilagem e osso subcondral, desta maneira, contribuindo para o acometimento da membrana sinovial, ligamentos e músculos periarticulares, ou seja, uma insuficiência global da articulação. Os sinais clínicos observados são dor, deformidade e disfunção articular. O tratamento da OA envolve o uso de medicamentos, intervenções cirúrgicas e métodos alternativos (MCALINDON *et al.*, 2014; HAWKER, MIAN, BEDNIS, & STANAITIS, 2011).

Entre as alternativas medicamentosas, o uso de fármacos intra-articular, tais como corticosteroides, analgésicos e agentes de viscosuplementação (MCALINDON *et al.*, 2011), tem aumentado nos últimos anos e seu desenvolvimento tem sido estimulado, isso devido às vantagens obtidas com o seu uso na prática clínica, visto que eles oferecem boa biodisponibilidade e eficácia, redução dos efeitos sistêmicos e adversos, e menor custo (EVANS, KRAUS, & SETTON, 2014). Por outro lado, a administração desses medicamentos é feita somente por médico. Portanto, dificultando a autoadministração.

A goma guar (GG) é um polissacarídeo encontrado no endosperma da semente de *Cyamopsis tetragonolobus*, que é uma leguminosa (CASTRO *et al.*, 2016). Essa galactomanana possui características imprescindíveis para o desenvolvimento de biomateriais, por exemplo biodegradabilidade, biocompatibilidade, renovabilidade e baixo custo de obtenção (THOMBARE, JHA, MISHRA, & SIDDIQUI, 2016). Além disso, ela possui um grande valor comercial, uma vez que é usada na composição de alimentos (MUDGIL, BARAK, & KHATKAR, 2014), dermocosméticos, suplementos, explosivos e papéis (THOMBARE, JHA, MISHRA, & SIDDIQUI, 2016).

Outra importante área de aplicação da goma guar é na indústria de medicamento, ela é usada como adjuvante e/ou princípio ativo no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas (THOMBARE, JHA, MISHRA, & SIDDIQUI, 2016). Neste contexto, estudos revelam que ela possui propriedades laxativas (TAKAHASHI *et al.*, 2009), hipocolesterolemiantes (BUTT, SHAHZADI, SHARIF, & NASIR, 2007), hipoglicemiantes (TAKAHASHI *et al.*, 2009), anti-inflamatória e anti-tumorigênese (GAMAL-ELDEEN, AMER, & HELMY, 2006). Finalmente, estudos do nosso grupo em OA experimental têm revelado que administração intra-

articular da goma guar exibe atividade analgésica similar àquela obtida com a administração de Hylan G-F20 (CASTRO, FEITOSA, DA CUNHA, & DA ROCHA, 2007), e atividade condroprotetora (CASTRO *et al.*, 2016). Mostramos ainda que o efeito farmacológico da goma guar não depende somente de suas propriedades viscoelásticas (CASTRO, FEITOSA, DA CUNHA, & DA ROCHA, 2007), mas de sua estrutura química também (Castro *et al.*, 2016). Quanto aos estudos toxicológicos da goma guar “*in vitro*” e “*in vivo*”, ela é classificada como atóxica, posto que não revelaram efeitos genotóxicos (ZEIGER, ANDERSON, HAWORTH, LAWLOR, & MORTELMAN, 1999) e/ou carcinogênicos (*National Toxicology Program* 1982), nem toxicidade sistêmica quando administrado por via oral em altas doses em ratos (MUDGIL, BARAK, & KHATKAR, 2014) ou humanos (ALAN *et al.*, 1998).

Como o objetivo do uso da goma guar na osteoartrite é intra-articular faz-se necessário o estudo da toxicidade no ambiente articular. Entretanto, devido à indisponibilidade de métodos regulatórios para o estudo de fármacos administrados intra-articular, nós padronizamos um método e utilizamos o *Synvisc one* (Hylan GF-20), um agente de referência usado no tratamento da OA, a título de validação do estudo. Sendo assim, nós revelamos que administração intra-articular de goma guar possui biocompatibilidade, tal como o *Synvisc one* (Syn).

2. Metodologia

2.1 Animais

Todos os procedimentos com animais e protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética local em experimentação animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Brasil. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal e o número de animais utilizados. Os animais foram alojados em salas com temperatura controlada com ciclos de claro / escuro de 12 h e acesso gratuito à água e alimentos. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (*National Institutes of Health Publication*).

2.2 Materiais químicos

A goma de guar (GG) foi adquirida da Sigma Chem, EUA e foi purificada (Castro, Feitosa, da Cunha e da Rocha, 2007). A

Synvisc One (Syn) foi adquirida na Novartis®, no Brasil.

2.3 Toxologia *in situ*

2.3.1 Avaliação da Hipernocicepção Conjunta

Para avaliação da hipernocicepção articular pelo método eletrônico de von Frey, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura) com um piso de grade de arame, 20 a 30 minutos antes do teste. Durante este período de adaptação, as patas foram pressionadas duas a três vezes. Antes da estimulação da pata direita, os animais estavam quietos, sem movimentos exploratórios ou defecação e não descansando nas patas.

Nestes experimentos, usamos um medidor de pressão que consistia em uma força de mão. O equipamento utilizado foi um transdutor equipado com uma ponta de polipropileno de 0,5 mm² (anestesiômetro eletrônico von Frey, Insight Equipamentos Científicos Ltda., Ribeirão Preto, SP). O investigador, cego ao protocolo de tratamento, foi treinado para aplicar a ponta de polipropileno perpendicularmente à área central da pata traseira com um aumento gradual da pressão. O teste consistiu em tocar a pata traseira direita para provocar um reflexo de flexão seguido de uma resposta clara do *flinch* após a retirada da pata.

No teste de pressão-medidor eletrônico, a intensidade do estímulo foi registrada automaticamente quando a pata foi retirada. A estimulação da pata foi repetida até o animal apresentar três medidas semelhantes. Os resultados são expressos como a média do limiar mecânico (g) após três estimulações (pulsões) em cada ponto de tempo (DE MELO LEITE *et al.*, 2014).

2.3.2 Coleta de exsudados sinoviais e análise de fluxo celular e dos níveis de citocinas nos extratos conjuntos

Às 6 h, 24h, 7 dias ou 24 dias após a injeção do medicamento, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400 mg / kg intraperitoneal-i.p.) e eutanasiados por luxação cervical. A cavidade sinovial das articulações do joelho foi então lavada duas vezes com 02 ml de solução salina contendo 10 mM de EDTA. Os exsudatos sinoviais foram coletados por aspiração e a contagem celular total foi realizada usando uma câmara de Neubauer. Após centrifugação (500 g / 10 min), os sobrenadantes foram armazenados a -80 °

C e usados para a determinação da liberação de citocinas.

As concentrações de interleucina (IL) -1b, IL-6 e CXCL-1 foram medidas nos exsudados sinoviais obtidos às 6 h, 24h, 7 dias ou 24 dias após a injeção de drogas, usando um kit ELISA comercialmente disponível (R & D Systems, São Paulo, SP, Brasil).

2.3.3 Histopatologia

Após a fixação em solução de 10% v / v de formaldeído, e descalcificação (ácido fórmico a 5% v / v em solução de formaldeído a 10% v / v), a articulação inteira, que compreende as extremidades distal femoral e tibial proximal, foi processada para incorporação em parafina e coloração com hematoxilina-eosina e safranina-O. O material foi seccionado em série a 5 µm no plano sagital da superfície articular, desde o limite externo até o interno dos côndilos. Em cada décima seção (50 µm de distância), uma seção foi removida para coloração, com dez seções diferentes para cada amostra.

A análise foi feita para ambos os côndilos e expressa como um resultado para cada amostra. A classificação histopatológica semi-quantitativa foi realizada por dois patologistas independentes cegos para alocação em grupo de acordo com o sistema de classificação e estadiamento de histopatologia da Osteoartrite Research Society International (OARSI) (PRITZKER *et al.*, 2006). A pontuação final máxima possível (média das medidas feitas pelos dois patologistas) foi de 24. Os resultados são expressos como valores médios (intervalo intercuartil - IQR) para cada grupo de tratamento. Também foi avaliada a sinovia.

A classificação histopatológica semi-quantitativa foi realizada por um patologista independente cegado à alocação grupal de acordo com a presença de proliferação sinovial, infiltração celular, fibrose e estágio da doença, variando de 0 a 3 (0, ausente, 1, leve, 2, moderada, e , 3 grave) para cada parâmetro. O escore total máximo foi 12. Os resultados são expressos como o valor médio (variação) para cada grupo de seis animais.

2.3.4 Manipulação farmacológica

A fim de investigar o efeito toxicológico de GG, grupos de camundongos receberam injeções intra-articulares (i.a.) de preparações salinas, Syn ou GG. O volume total injetado foi (200 µg / 25 µl) e (100 µg / 25 µl) para preparações de Syn e GG, respectivamente. A dor articular, nestes grupos, foi avaliada 6 h, 24h, 7 dias e 28 dias após a injeção de preparações de Syn ou GG. O influxo celular, como inflamação refletida, foi medido às 6 h, 24h, 7 dias e 28 dias após a injeção de drogas em camundongos. Em outro conjunto de experiências, na tentativa de avaliar o

dano sinovial e cartilaginosa provocado pela galactomanana, a sinovia e a cartilagem foram avaliadas às 6 h, 24h, 7 dias e 28 dias após a injeção do medicamento.

2.4 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM) ou mediana (intervalo), conforme apropriado. As diferenças entre médias e medianas foram analisadas utilizando análise de variância unidirecional seguida do teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis, respectivamente. <0.05 foi considerado significativo.

3. Resultados e Discussões

3.1 Migração Celular

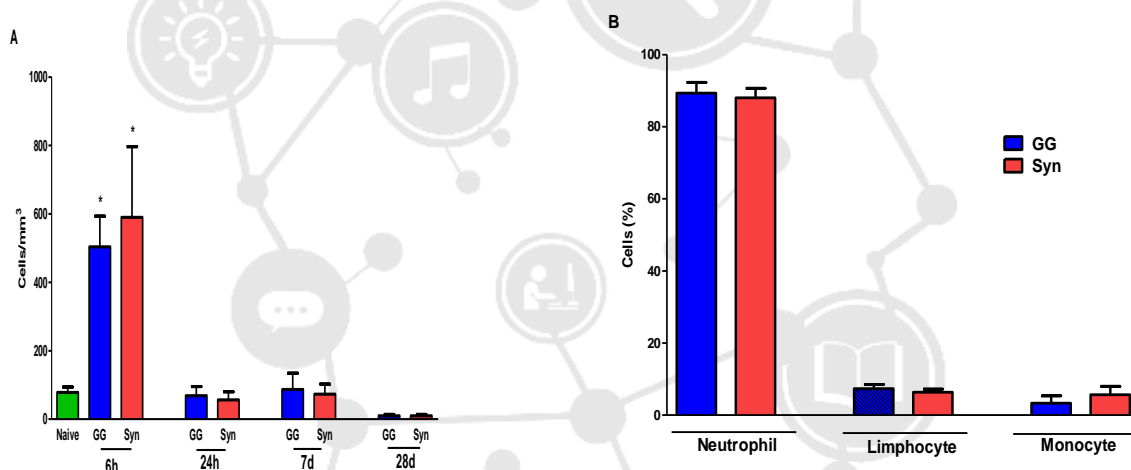


Figura 1. Afluxo de leucócitos após administração intra-articular (i.a.) de GG (100 μ g) ou Syn (200 μ g) em juntas de ratos. O grupo controle recebeu solução salina i.a. (A) A contagem total de leucócitos no lavado articular foi avaliada após 6 h, 24h, 7 dias e 28 dias. (B) A contagem de células diferenciais no lavado articular foi avaliada às 6 h.

A figura 1a mostra que a administração de GG ou Syn nas articulações dos animais induziu influxo celular para a cavidade articular mais intenso após 6 horas, em comparação com os animais que receberam solução salina, com predominância (85%) de células polimorfonucleares (Fig.1b). Após 24h, 7 dias e 28 dias, a contagem de células nos exsudados das juntas foi insignificante.

De acordo com esses dados, nossos resultados também demonstraram que a administração de GG promoveu uma infiltração de células leve, embora significativa e dependente da dose, em comparação com as juntas nas quais foi injetada solução salina (CASTRO, FEITOSA, DA CUNHA E FA, 2007).

Além disso, a análise dos esfregaços corados mostrou que as células polimorfonucleares eram predominantes nos exsudados das articulações. Acreditamos que a ligeira migração celular obtida nas primeiras 6 horas é devida ao trauma da administração intra-articular.

No entanto, outros fatores podem ter contribuído para a migração celular. No caso da goma de guar, os métodos de purificação empregados podem ter deixado algum resíduo de proteína que, embora seja mínimo, é possível desencadear uma leve migração de células. No caso de Syn, temos o trauma da administração, mas também a presença de proteínas que podem desencadear uma ligeira inflamação, tipicamente definida como joelhos inchados, dolorosos e doloridos que ocorrem dentro de 48 horas após a injeção (JUNI *et al.*, 2007). Assim, os dados obtidos em nosso estudo indicam que o influxo celular induzido por GG foi comparável aos resultados obtidos com a administração de Syn, usado em condições similares.

3.2 Dor nas articulações

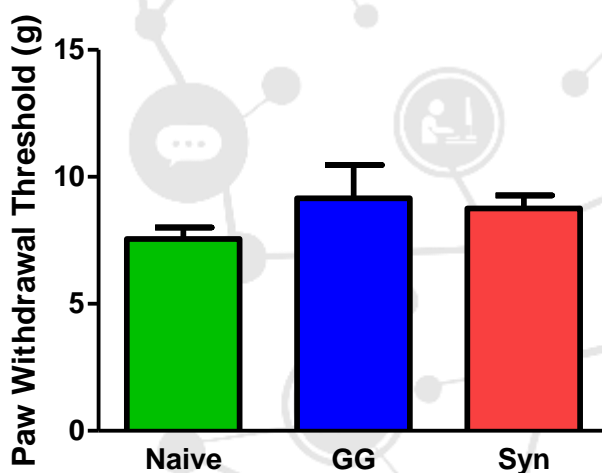


Figura 2. Dor nas articulações provocada pela administração intra-articular (i.a.) de GG (100 ug) ou Syn (200 µg) em juntas de ratos. O grupo controle recebeu solução salina i.a. A dor das articulações foi medida utilizando o teste von frey para ratos (ver texto para detalhes). O limiar de retirada de hipernocicepção (g) estimulado pela flexão foi avaliado 5 h após a injeção do medicamento.

A figura 2 mostra comportamento de dor em ratos submetidos a administração de GG ou Syn. Verifica-se claramente que o componente da dor, representado por uma diminuição do limiar mecânico de retirada da pata, não foi desenvolvido em ambos os grupos durante as primeiras 5 horas após a administração conjunta, em comparação com as juntas nas quais foi injetada solução salina. Além disso, após este período, não houve uma diminuição progressiva no limiar mecânico em camundongos

submetidos a administração de GG ou Syn (dados não mostrados).

Diferente do efeito na migração celular, o comportamento da dor não foi observado pela administração de GG (Fig. 2). Juntamente com os resultados atuais, nosso grupo revelou que o GG purificado, independentemente de ser uma solução ou um gel, não promoveu dor nas articulações, em comparação com as articulações com solução salina (Castro, Feitosa, da Cunha e FA da Rocha 2007). Semelhante ao que aconteceu com o GG, a administração do Syn não desencadeia o comportamento da dor.

Uma das possíveis razões para não observar a dor nas primeiras horas, seria que a dor relacionada à administração de Hylan está associada à administração repetida (IWATA *et al.*, 2004). O possível mecanismo de dor seria que a administração repetitiva de Syn desencadeasse a produção de anticorpos com consequente reação imune e sensibilização dos nociceptores periarticulares. No entanto, a administração repetida não foi investigada aqui.

3.3 Avaliação das Citocinas

| Grupo | IL-1 β | IL-6 | CXCL-1 |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Controle | 16.30 \pm 1.694 | 25.39 \pm 11.56 | 23.88 \pm 1.125 |
| Syn | 47.57 \pm 12.60* | 542.9 \pm 303.4* | 144.0 \pm 33.35* |
| GG | 11.43 \pm 4.154 | 617.9 \pm 262.6* | 288.0 \pm 58.65* |

Tabela 1. Liberação de citocinas provocada pela administração intraarticular (i.a.) de GG (100 g) ou Syn (200 μ g) em juntas de ratos. O grupo controle recebeu salina i.a. Os níveis de citocinas (pg / mL) em exsudados das articulações foram medidos após 6 h utilizando o método ELISA.

Os níveis de CXCL-1 e IL-6 estavam aumentados em ambos os grupos após 6 h da administração. Entretanto, para IL-1 β , somente o Syn aumentou o nível dela. Como os ratos e os camundongos não produzem IL-8, mas somente os seres humanos. Nós resolvemos investigar CXCL-1 que exerce a mesma função de IL-8 nos camundongos.

Os dados revelaram que administração de GG ou Syn pode desencadear uma sinovite, mas essa sinovite se resolve após 24 horas.

Como descrito na literatura, IL-1, IL-6 e CXCL-1 são citocinas que exercem papel importante no desenvolvimento de sinovite em artropatias (SCHETT, DAYER, & MANGER, 2016; DAVIES, & CHOY, 2014; GEORGANAS, LIU, PERLMAN, HOFFMANN, THIMMAPAYA, & POPE, 2000). Como observado acima, essas citocinas estão envolvidas também na sinovite aguda desencadeada pela administração do Syn.

Esse dado é importante, visto que, embora eventos adversos locais após a administração de Syn sejam bem descritos na literatura (JÜNI *et al.*, 2007; REICHENBACH *et al.*, 2007), esse trabalho é o primeiro a demonstrar as citocinas envolvidas no mecanismo de sinovite induzida pelo Syn. Sendo assim, uma única injeção é suficiente para desencadear a liberação de citocinas pró-inflamatórias e consequente sinovite.

Acreditamos que a presença de proteínas no Syn ative os sinoviócitos tipo A e B presentes na membrana sinovial, e consequentemente eles quando ativados liberam IL-1, IL-6 e CXCL-1. Além disso, essas citocinas quando liberadas podem induzir a liberação delas mesmas. Por exemplo: IL-1 quando liberada no ambiente articular, ela é capaz de induzir a expressão de IL-6 e IL-8 nos fibroblastos sinoviais (GEORGANAS, PERLMAN, HOFFMANN, THIMMAPAYA, & POPE, 2000). Além disso, ela é capaz de induzir a quimiotaxia de células inflamatórias que são importantes fontes de IL-1 (SCHETT, DAYER & MANGER, 2016). Contudo, tal mecanismo não foi investigado em nosso estudo. Já a GG não foi capaz de induzir a liberação de IL-1 β .

Como a GG foi purificada antes da administração, reduzimos drasticamente a quantidade de proteínas contaminantes. Contudo, é possível que existam resquícios de substâncias usadas na purificação ou, até mesmo, produtos da proteólise, os quais podem ainda estar induzindo a quimiotaxia de células inflamatórias e ativando os sinoviócitos, os quais liberam IL-6 e CXCL-1 quando ativadas.

3.4 Dano Articular

A tabela 2 apresenta a análise histopatológica da cartilagem femoral e tibial, realizada segundo critérios da OARSI (PRITZKER *et al.*, 2006) em animais sacrificados 24 horas, 7 dias e 28 dias após a injeção intra-articular da GG ou Syn. Os resultados das análises não revelaram lesões graves, tais como: escavações na zona média da cartilagem e a formação de osteófitos centrais e nem lesões que conferem menor grau, tais como: edema, fibrilação da superfície e alterações celulares e reparos com fibrocartilagem.

Além disso, ambos os cõndilos estavam intactos independente da amostra e do tempo de avaliação. Finalmente, os escores finais dos fêmures e das tíbias apresentaram medianas semelhantes, ou seja, 0 para estágio e grau. A injeção intra-articular pode desencadear uma sinovite como visto acima. Entretanto, ela poderia provocar condrotoxicidade.

Os fatores que podem desencadear essa toxicidade são os mais variados, por exemplo: a concentração do fármaco, os corticosteróides, em doses mais elevadas, estão associados com danos significativos nos condrócitos e conseqüentemente no tecido cartilaginoso, por exemplo: diminuição dos níveis de colágeno tipo II, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, fissuras, degeneração e morte celular (WERNECKE, BRAUN, & DRAGOO, 2015).

Outro ponto seria que os fármacos, quando injetados intra-articular, são administrados em bolus, e os condrócitos não são vascularizados, sendo assim o fármaco é distribuído por difusão no tecido. Portanto, existe um retardo no alcance da concentração tóxica, mas, por outro lado, se prolonga o efeito tóxico do fármaco, caso ele possua. Também o ambiente articular e os elementos articulares são sensíveis às variações de pH e viscosidade. Estudos têm revelado que alterações no pH e adjuvantes utilizados nas formulações analgésicas podem ser os responsáveis pela condrotoxicidade observada (EVANS, KRAUS, & SETTON, 2014).

Ainda o fármaco administrado intra-articular exerce um efeito direto sobre o condrócito, ou seja, fármacos tóxicos não são metabolizados gerando moléculas com menor potencial de toxicidade, fato que é observado quando administramos por via oral. Entretanto, para aqueles fármacos que os metabólitos gerados são os responsáveis pela toxicidade, a via intra-articular apresentaria essa vantagem de não gerá-los ou gerá-los em baixas concentrações, visto que o fármaco que foi retirado do ambiente articular via sistema linfático, esse sim será metabolizado, mas gerando metabólitos em menor quantidade, quando comparado a qualquer outra via.

Além disso, esses metabólitos tóxicos chegarão novamente no ambiente articular em quantidades insignificantes. Finalmente, como visto acima, GG e Syn liberam citocinas inflamatórias, e nós sabemos que IL-6, IL-1 e IL-8 são mediadores envolvidos no dano na cartilagem. Tal mecanismo envolveria a ativação de enzimas proteolítica, citocinas e vias de sinalização responsáveis pelo dano articular (SCHETT, DAYER, & MANGER, 2016; SRIRANGAN, & CHOY, 2010). Como podemos

observar em nossos dados, a administração de única dose de GG ou Syn em baixas doses não provoca alterações morfológicas no tecido cartilaginoso e nem nos condrócitos, logo não são condrotóxicas nas doses utilizadas.

É evidente que tal resultado não invalida a existência de toxicidade após injeções repetitivas. Entretanto, essa possibilidade é mínima, visto que intervalos entre as doses de até 7 dias não induzem dano articular. Além disso, sua administração repetitiva tem um efeito condroprotetor (ROCHA *et al.*, 2016).

| Tempo | Grupo | Grade | Stage | Score |
|----------|-------|---------|---------|---------|
| 24 horas | Naive | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| | GG | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| | Syn | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| 7 dias | GG | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| | Syn | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| 28 dias | GG | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |
| | Syn | 0 (0-0) | 0 (0-0) | 0 (0-0) |

Tabela 2. Efeito de GG ou síntese nas alterações histopatológicas da articulação dos ratos

Considerações Finais

Ambos GG e Syn têm boa biocompatibilidade in vivo e promovem liberação de IL-6 e CXCL-1 na junta. A toxicidade in vitro, medida pela IC50, é significativamente menor para o GG, comparado a Syn, revelando melhor perfil de segurança comparativo para o GG.

Referências

ALAM, N.H., MEIER, R., RAUSCH, T., MEYER-WYSS, B., HILDEBRAND, P., SCHNEIDER, H., et al. Effects of a partially hydrolyzed guar gum on intestinal absorption of carbohydrate, protein and fat: a double-blind controlled study in volunteers. *Clin Nutr*, 17(3):125-9, 1998.

BUTT, M.S., SHAHZADI, N., SHARIF, M.K., NASIR, M. Guar gum: a miracle therapy for hypercholesterolemia,

hyperglycemia and obesity. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47(4):389-396, 2007.

CASTRO, R.R., FEITOSA, J.P., DA CUNHA, P.L., DA ROCHA, F.A. Analgesic activity of a polysaccharide in experimental osteoarthritis in rats. *Clin Rheumatol*, 26(8):1312-1319, 2007

EVANS, C.H., KRAUS, V.B., SETTON, L.A. Progress in intra-articular therapy. *Nat Rev Rheumatol*, 10(1):11-22, 2014.

GAMAL-ELDEEN, A.M., AMER, H., HELMY, W.A. Cancer chemopreventive and anti-inflammatory activities of chemically modified guar gum. *Chem Biol Interact*, 161(3):229-240, 2006.

GEORGANAS, C., LIU, H., PERLMAN, H., HOFFMANN, A., THIMMAPAYA, B., POPE, R.M. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun. *J Immunol*, 165(12):7199-7206, 2000.

HAMBURGER, M., SETTLES, M., TEUTSCH, J. Identification of an immunogenic candidate for the elicitation of severe acute inflammatory reactions (SAIRs) to hylan G-F 20. *Osteoarthritis Cartilage*, 13(3):266-268, 2005.

HAWKER, G.A., MIAN, S., BEDNIS, K., STANAITIS, I. Osteoarthritis year 2010 in review: non-pharmacologic therapy. *Osteoarthritis Cartilage*, 19(4):366-374, 2011.

JOHNSON, V.L., HUNTER, D.J. The epidemiology of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 28(1):5-15, 2014.

MCALINDON, T. E., BANNURU, R. R., SULLIVAN, M. C., ARDEN, N. K., BERENBAUM, F., BIERMA-ZEINSTRAS, S. M., ET AL. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(3):363-388, 2014

MUDGIL, D., BARAK, S., KHATKAR, B.S. Guar gum: processing, properties and food applications- A Review. *J Food Sci Technol*, 51(3):409-418, 2014

PRITZKER, K.P., GAY, S., JIMENEZ, S.A., OSTERGAARD, K., PELLETIER, J.P., REVELL, P.A. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(1):13-29, 2006

REICHENBACH, S., BLANK, S., RUTJES, A.W., SHANG, A., KING, E.A., DIEPPE, P.A. ET AL. Hylan versus hyaluronic acid for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis. *Arthritis Rheum*, 57(8):1410-1418, 2007.

TAKAHASHI, T., YOKAWA, T., ISHIHARA, N., OKUBO, T., CHU, D.C., NISHIGAKI, E. Hydrolyzed guar gum decreases postprandial blood glucose and glucose absorption in the rat small intestine. *Nutr Res*, 29(6):419-425, 2009.

THOMBARE, N., JHA, U., MISHRA, S., SIDDIQUI, M.Z. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *Int J Biol Macromol*, 88:361-372, 2016.

WERNECKE, C., BRAUN, H.J., DRAGOO, J.L. The Effect of Intra-articular Corticosteroids on Articular Cartilage: A Systematic Review. *Orthop J Sports Med*, 3(5):23, 2014

ZEIGER, E., ANDERSON, B., HAWORTH, S., LAWLOR, T., MORTELMAN, K. Salmonella Mutagenicity Tests V. Results from the Testing of 311 Chemicals Environ. Molec. Mutagen. Vol. 19 (Suppl 21) (1992) 2-141, 1992.

