

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MARCELLO ZAIA OLIVEIRA**

**VISCOSSUPLEMENTAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE ÁCIDOS  
HIALURÔNICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE**

**CURITIBA**

**2017**

**MARCELLO ZAIA OLIVEIRA**

**VISCOSSUPLEMENTAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE ÁCIDOS  
HIALURÔNICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio  
Munhoz da Cunha**

**Coorientador: Dr. Mauro Batista Albano**

**CURITIBA**

**2017**

## **AGRADECIMENTOS**

*Primeiramente a Deus e a todos que auxiliaram neste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. Luiz A. Munhoz da Cunha meu orientador que sempre confiou em mim todo o tempo.*

*Ao Dr. Mauro Batista Albano meu coorientador pela ajuda e principalmente pelo exemplo a ser seguido.*

*Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias coordenador da pós-graduação da UFPR, pela oportunidade.*

*Ao Dr. Mário Massatomo Namba sempre amigo.*

*Ao Prof. Dr. Edvaldo Silva Trindade, chefe do setor de Biologia Celular da UFPR, pelo grande apoio e ensinamento.*

*Agradecimento aos meus pais, Frank e Irma pelo incentivo eterno; aos meus irmãos Leonardo e Daniela pelo auxílio sempre amoroso.*

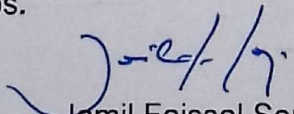
*Meu especial agradecimento a minha amada esposa Mônica pela paciência e compreensão, e aos meus filhos Vítor e Bruno que me ensinam diariamente o verdadeiro amor e justificam o porquê do meu esforço.*



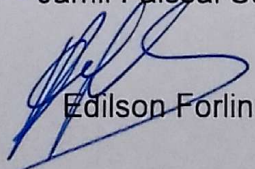
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEIS MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 183ª Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **MARCELLO ZAIA OLIVEIRA** com o trabalho intitulado: "VISCOSUPLEMENTAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE ÁCIDOS HIALURÔNICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE" **Área de Concentração:** Clínica Cirúrgica; **Linha de Pesquisa:** Diagnóstico e Avaliação das Repercussões da Resposta Inflamatória Clínica E Experimental em Cirúrgia; tendo como orientador o Professor Doutor **Luiz Antônio Munhoz da Cunha**.

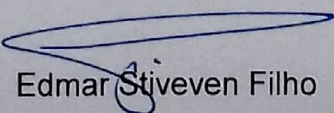
Às sete horas e trinta minutos do dia treze de junho de dois mil e dezessete, no auditório da Ortopedia no 6º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos seguintes doutores: Jamil Faissal Soni, João Luiz Vieira da Silva, Edilson Forlin, Eduardo Murilo Novak, Edmar Stiveven Filho sendo este último presidente da banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a banca examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi considerado **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes membros.

  
Jamil Faissal Soni

  
João Luiz Vieira da Silva

  
Edilson Forlin

  
Eduardo Murilo Novak

  
Edmar Stiveven Filho



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEIS MESTRADO E DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO**

Aluno: **MARCELLO ZAIA OLIVEIRA**

**Título da Tese:** "VISCOSUPLEMENTAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE ÁCIDOS HIALURÔNICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE".

**CONCEITOS EMITIDOS**

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
Jamil Faissal Soni	A	9,0
João Luiz Vieira da Silva	A	9,0
Edilson Forlin	A	9,0
Eduardo Murilo Novak	A	9,0
Edmar Stiveven Filho	A	9,0

**CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Conceito Final: A

Equivalência: 9,0

Curitiba, 13 de junho de 2017.

MEMBROS	ASSINATURA
Jamil Faissal Soni	
João Luiz Vieira da Silva	
Edilson Forlin	
Eduardo Murilo Novak	
Edmar Stiveven Filho	

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.*

**Leonardo da Vinci**

## RESUMO

**Título:** Viscosuplementação Intra-articular de Ácidos Hialurônicos em Modelo Experimental de Osteoartrite. **Introdução:** O tratamento medicamentoso da osteoartrite tem obtido um avanço significativo nas últimas décadas. Medicamentos denominados “condroprotetoras” como o ácido hialurônico são utilizadas em aplicações intra-articulares de modo crescente na prática médica. Entretanto, existem controvérsias relacionadas à utilização deste método de tratamento, tanto em sua eficácia quanto em sua verdadeira função fisiológica. **Objetivo:** Analisar do ponto de vista imuno-histoquímico os efeitos do ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo experimental de osteoartrite em coelhos. **Material e Métodos:** 44 coelhos, jovens, da raça *California*, machos, foram alocados de modo aleatório em três grupos (PR, S e P), sendo submetidos à ressecção do ligamento cruzado anterior do joelho direito. Decorridos três semanas do procedimento cirúrgico iniciaram-se as três injeções intra-articulares semanais de ácido hialurônico nativo de baixo peso molecular (Polireumin®) grupo PR, ácido hialurônico de cadeia ramificada de alto peso molecular (Synvisc®) grupo S e soro fisiológico 0,9% grupo P. Todos os animais foram sacrificados após 12 semanas do ato cirúrgico e os platôs tibiais dos joelhos infiltrados foram dissecados. Cortes histológicos da cartilagem das áreas de apoio dos platôs tibiais foram coradas com marcadores imuno-histoquímicos para pesquisa da quantidade de metaloproteases (MMPs-3,13) e seus inibidores (TIMPs-1,3). A intensidade de coloração foi quantificada em um aparelho de microscopia Zeiss Imager.Z2 Metasystems e analisadas pelo software Metafer4 Msearch. Esse estudo é a continuação da avaliação macroscópica e histológica dos platôs. **Resultado:** O efeito condroprotetor dos ácidos hialurônicos utilizados no estudo foi demonstrado quando comparados ao grupo controle, porém feita a comparação entre si, não houve diferença estatística significativa quanto à condroproteção. **Conclusão:** Os ácidos hialurônicos testados obtiveram efeito condroprotetor, porém quanto à medição dos marcadores imuno-histoquímicos não houve diferença estatística entre os dois diferentes ácidos hialurônicos utilizados nesta pesquisa.

**Palavras-chaves:** Osteoartrite; Ácido Hialurônico; Modelo Experimental de Osteoartrite; Imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

**Title:** Intra-articular Viscosupplementation of Hyaluronic Acids in an Experimental Model of Osteoarthritis. **Introduction:** The medical treatment of osteoarthritis has made significant progress in recent decades. Medicines called " chondroprotective " such as hyaluronic acid are increasingly used in intra-articular applications in medical practice. However, there are controversies related to the use of this treatment method, both in its efficacy and in its true physiological function. **Objective:** Analyze the effects of immunohistochemical of hyaluronic acid of different molecular weights of osteoarthritis rabbits experimental model. **Material and Methods:** 44 male, young, rabbits of breed California were randomly assigned to three groups (PR, S and P) and submitted to anterior cruciate ligament resection of the right knee. After three weeks of the surgical procedure, three intra-articular injections were done weekly with low molecular weight native hyaluronic acid (Polyreumin®) to PR group, high molecular weight branched chain hyaluronic acid (Synvisc®) to group S and saline solution 0,9% to group P. All animals were sacrificed after 12 weeks of the surgical procedure and their tibial plateaus of the infiltrated knees were dissected. Histological sections of cartilage from the tibial plateau support areas were stained with immunohistochemical markers to investigate the amount of metalloproteases (MMPs 3 and 13) and their inhibitors (TIMPs 1 and 3). The staining intensity was quantified on a Zeiss Imager.Z2 Metasystems microscope and analyzed by Metafer4 Msearch software. This study is the continuation of the macroscopic and histological evaluation of the plateaus. **Results:** The condoprotective effect of the hyaluronic acids used in the study was demonstrated when compared to the control group, but compared each other, there was no significant statistical difference regarding to chondroprotection. **Conclusion:** Both hyaluronic acids tested showed chondroprotective effect, however, in the measurement of the immunohistochemical markers there was no statistical difference between two different hyaluronic acids used in this study.

**Key-words:** Osteoarthritis; Hyaluronic Acid; Experimental Model of Osteoarthritis; Immunohistochemistry.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – FOTOGRAFIA INCISÃO CUTÂNEA E CAPSULOTOMIA.....	25
FIGURA 2 – FOTOGRAFIA DA EXPOSIÇÃO DO LCA.....	26
FIGURA 3 – FOTOGRAFIA DA SUTURA DA PELE.....	26
FIGURA 4 – FOTOGRAFIA DOS FRASCOS CONTENDO OS PLATÔS TIBIAIS...	27
FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA PARA MMP 13 DO GRUPO S.....	29
FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA PARA TIMP 1 DO GRUPO S.....	30
FIGURA 7 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM PARA LOCALIZAÇÃO DOS TECIDOS.....	30
FIGURA 8 - FOTOGRAFIA DO APARELHO DE MICROSCOPIA UTILIZADO NA PESQUISA.....	32
FIGURA 9 - FOTOGRAFIA DO SOFTWARE EM OPERAÇÃO.....	32
FIGURA 10 - FOTOGRAFIA DO SOFTWARE META FER 4.....	33
FIGURA 11 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE MMP 3– GRUPO P.....	34
FIGURA 12 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE MMP 3 – GRUPO S.....	35
FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE MMP 3- GRUPO PR.....	35
FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE MMP 13 – GRUPO P.....	36

FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE MMP 13- GRUPO S.....	36
FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE MMP 13 – GRUPO PR.....	37
FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE TIMP 1 – GRUPO P.....	37
FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE TIMP 1 – GRUPO S.....	38
FIGURA 19 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE TIMP1 – GRUPO PR.....	38
FIGURA 20 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE TIMP 3 – GRUPO P.....	39
FIGURA 21 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE TIMP 3 – GRUPO S.....	39
FIGURA 22 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM IMUNOMARCADA DE TIMP 3 – GRUPO PR.....	40
GRÁFICO 1 – INTENSIDADE DE IMUNOMARCAÇÃO DE MMP 3.....	41
GRÁFICO 2 – INTENSIDADE DE IMUNOMARCAÇÃO DE MMP 13.....	42
GRÁFICO 3 – INTENSIDADE DE IMUNOMARCAÇÃO DE TIMP 1.....	43
GRÁFICO 4 – INTENSIDADE DE IMUNOMARCAÇÃO DE TIMP 3.....	44
TABELA 1 - COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS S PARA MMP 3.....	40
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS PR PARA MMP 3.....	41
TABELA 3 – COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS S PARA MMP 13.....	42
TABELA 4 – COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS PR PARA MMP 13.....	42
TABELA 5 – COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS S PARA TIMP 1.....	43
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS PR PARA TIMP 1.....	43

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS S PARA TIMP 3.....	44
TABELA 8 – COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS PR PARA TIMP 3.....	44

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

**Kg** = quilograma

**mg** = miligrama

**ml** = mililitro

**µg** = micrograma

**OA** = osteoartrite

**AH** = ácido hialurônico

**Da** = Dalton

**IM** = intramuscular

**UI** = unidade

**°C** = grau Celsius

**Na** = sódio

**n°** = número

**LCA** = Ligamento cruzado anterior

**LCP** = Ligamento cruzado posterior

**UFPR** = Universidade Federal do Paraná

**MMP** = Metaloprotease

**TIMP** = Inibidor Tecidual da Metaloprotease

**AINH** = anti-inflamatório não hormonal

**FDA** = Food and Drug Administration

**IBGE** = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1	OBJETIVO.....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	OSTEOARTRITE.....	16
2.2	ÁCIDOS HIALURÔNICOS.....	18
2.3	MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE.....	20
2.4	METALOPROTEASES.....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	24
3.2	MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE.....	24
3.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	25
3.4	PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO HISTOLÓGICA.....	28
3.5	ANÁLISES HISTOLÓGICAS E ESTATÍSTICAS.....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	34
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	51
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52

# 1 INTRODUÇÃO

Osteoartrose é a afecção articular mais comum no joelho, e é uma doença definida por alterações estruturais específicas da articulação, incluindo degradação focal da cartilagem articular, processos inflamatórios no tecido sinovial, alterações bioquímicas no líquido sinovial e remodelamento do osso subcondral com formação de osteófitos nas margens da articulação, sendo atualmente definida como uma doença inflamatória articular, tendo sua denominação atualizada para Osteoartrite (OA), considerada assim, não mais como uma simples degeneração articular. A OA é uma síndrome clínica progressiva e incurável que promove a degeneração articular, resultado de uma complexa interação de fatores genéticos, metabólicos, bioquímicos e biomecânicos. Pode ser classificada como primária devido ao envelhecimento ou secundária devido a traumas, alterações congênitas, doenças metabólicas, infecciosas, reumáticas, hematogênicas, inflamatórias ou neurológicas (MERO, 2014).

A patologia da Osteoartrite é uma grande causa de limitação de atividade, restrição física, excesso de uso de serviços de saúde e redução da qualidade de vida, especialmente em pessoas acima dos 45 anos de idade (HOCHBERG, 2012). Estimativas recentes indicaram um aumento na prevalência de osteoartrite com cerca de 27 milhões de adultos nos Estados Unidos da América (USA) com idade superior a 25 anos apresentando sinais clínicos de osteoartrite em mão, joelho ou quadril, um aumento em relação aos 21 milhões em 1995. Na população acima de 45 anos de idade, 19-28% da população dos USA possui osteoartrite definida por radiografia, sendo considerada a artrite crônica mais comum no mundo (NEOGI; ZHANG, 2011).

No USA, 240 por 100 mil pessoas são afetadas por ano, sendo uma das cinco principais causas de incapacidade nos adultos. O impacto socioeconômico em afastamentos trabalhistas e aposentadorias antecipadas são da ordem estimada de US\$3.4 a 13.2 bilhões ao ano (CENTER FOR DISEASES CONTROL PREVENTION, 2013). Pelo seu alto custo socioeconômico, pesquisas relacionadas à osteoartrite

são essenciais em todos os níveis de intervenções e patogêneses da doença (STEVENSON; ROACH, 2012).

No Brasil, os custos com a doença são mais difíceis de serem estimados devido à falta de dados estatísticos oficiais, porém como a Osteoartrite aumenta sua incidência de modo diretamente proporcional ao envelhecimento da população, os custos nacionais também tendem a aumentar, pois no ano de 2016 o Brasil possuía 207 milhões de habitantes, sendo 22,69% da população na faixa etária de indivíduos jovens e 8,17% na de indivíduos idosos e segundo as projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), teremos 223 milhões de habitantes sendo 17,59% de indivíduos na faixa etária de jovens e 13,44% de indivíduos na faixa etária dos idosos no país em 2030. Um aumento relativo de 64% na população idosa no país (IBGE, 2017).

Como já foi dito a OA é o resultado de vários fatores na disfunção articular e sua falência funcional, caracteriza-se por degeneração da cartilagem, inflamação articular e simultânea proliferação de tecido ósseo, cartilaginosa e conectivo (LOTZ *et al.*, 2011). Dentre várias modalidades de tratamento disponíveis atualmente, a terapia com injeções intra-articulares de ácido hialurônico (AH) tem demonstrado efeito benéfico no controle dos sintomas da OA do joelho (gonartrose), (ALTMAN *et al.*, 1998).

O ácido hialurônico (AH), um polissacarídeo do grupo glicosaminoglicanos de alta viscosidade, é utilizado na prática médica há mais de cinquenta anos, esta substância contribui para a homeostase da articulação tendo seu peso molecular de aproximadamente  $0.5 - 3 \times 10^6$  Dalton (Da), na articulação normal (DAHL, 1985) e apresenta-se em menor concentração e com peso molecular diminuído no líquido sinovial nas articulações que apresentam osteoartrite, o pioneiro no conceito de viscosuplementação foi Balazs nos anos de 1960 e acreditava que a viscosuplementação ideal teria como critérios específicos: a permeabilidade da substância, não ser imunogênico, possuir peso molecular similar ao do líquido sinovial e uma meia vida longa (BALAZS, 1993). Infiltrações intra-articulares de diferentes ácidos hialurônicos são utilizadas como condroprotetores no tratamento da osteoartrite (YOSHINI, 1994; SCHIAVINATO *et al.*, 2002; WANG, 2006), e em 1997 o Food and Drug Administration (FDA) aprovou nos USA a utilização do AH em infiltrações intra-articulares no joelho.

O AH apresenta ações mecânicas e biológicas, tendo um efeito lubrificante, diminuindo as tensões mecânicas e melhorando assim as propriedades reológicas do líquido sinovial, possuindo também um efeito anti-inflamatório comprovado (LAJEUNESSE *et al.*, 2003, FORSEY *et al.*, 2006, HERONTIN *et al.* 2015). O AH administrado em forma de injeções intra-articulares pode potencializar os efeitos regenerativos do AH endógeno sobre a cartilagem articular, restituindo a viscoelasticidade do líquido sinovial, contribuindo na síntese de AH e de outros componentes da matriz extracelular pelos sinoviócitos, prevenindo a degradação de proteoglicanos e fibras de colágeno da matriz extracelular. O AH também estimula o metabolismo e previne a apoptose dos condrócitos, inibe a degradação condral e as respostas inflamatórias articulares (SCHIAVINATO *et al.*, 2002). Atribui-se a estes efeitos da terapia utilizando AH não só a sua capacidade em amenizar os sintomas relacionados à osteoartrite, mas também a sua interferência na progressão dos processos inflamatórios e degeneração articular (YOSHIMI *et al.*,1994; HULMES *et al.*,2004).

Os principais efeitos bioquímicos são a diminuição da produção de prostaglandinas, responsáveis pelo processo inflamatório, diminuição da concentração de metaloproteases (MMPs), responsáveis pela degradação da cartilagem, a presença de AH intra-articular estimula a produção endógena de AH pelos sinoviócitos, tem efeito analgésico diminuindo os impulsos nervosos e a sensibilidade nas terminações dos nervos nociceptivos, estabiliza a matriz cartilaginosa, estimula a proliferação de condrócitos, aumenta a produção de colágeno tipo 2 e agreganos pelo condrócito além de diminuir a degradação do colágeno tipo 2 (SASAKI, 2004; CONROZIER,2010).

Os agentes condroprotetores são definidos como componentes que estimulam a síntese de colágeno e proteoglicanos pelos condrócitos, auxiliam a produção de AH pelos sinoviócitos, inibem a degradação da cartilagem, previnem a formação de vasos sinoviais e a fibrilação do tecido cartilaginoso (DIXON. 1992; ELMORSY, 2013).

Considerando a abrangência e as implicações da OA, compreende-se atualmente a importância do diagnóstico e tratamento em suas fases iniciais, de maneira a minimizar suas consequências (COOPER *et al.*, 2000). O tratamento não medicamentoso consiste na educação do paciente em relação a sua doença,



exercícios físicos de fortalecimento muscular, diminuição do peso corporal, uso de muletas, acupuntura e órteses. No tratamento medicamentoso basicamente são utilizados medicamentos anti-inflamatórios, analgésicos simples e opióides, fármacos de ação lenta (Sulfato de Glicosamina, Sulfato de Condroitina) e nutracêuticos (Peptídeos de Colágenos). Por não haver até o presente momento intervenções medicamentosas que sejam capazes de cessar a evolução da OA, sobressaem às opções que permitem a redução da sua progressão (ZHANG *et al.*, 2009; JEVSEVAR *et al.*, 2013). Injeções intra-articulares de diferentes tipos de AH poderiam ser utilizadas com essa finalidade.

Para avaliar os efeitos dos AH de diferentes pesos moleculares na OA, se propôs nesta pesquisa a utilização de um modelo experimental de OA, já consagrado, que se assemelha àquela observada na espécie humana. A secção do ligamento cruzado anterior (LCA) do joelho de coelhos mimetiza as alterações morfológicas e bioquímicas observadas na osteoartrite humana, permitindo a reprodução acurada dos resultados obtidos (MOSKOWITZ *et al.*, 1992; SAH *et al.*, 1997).

## 1.1 OBJETIVO

- Avaliar se existe efeito condroprotetor dos ácidos hialurônicos em modelo experimental de osteoartrite em joelhos de coelhos.
- Verificar se ocorre diferença na ação dos ácidos hialurônicos de alto e baixo peso moleculares no modelo experimental, utilizando análise imuno-histoquímica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é uma patologia articular crônica – degenerativa que possui uma etiologia ligada a fatores genéticos e metabólicos. A fisiopatologia está ligada a um desequilíbrio mecânico, biológico e apresentam alterações que desestabilizam a síntese e degradação dos condrócitos, matriz extracelular e osso subcondral até alcançar a perda total da cartilagem articular. Assim evolui para deformidades articulares, dor que piora com a movimentação e em estágios mais avançados pode haver dor ao repouso, diminuição da amplitude de movimento, perda da função articular, instabilidade articular, atrofia muscular, rigidez articular matinal, crepitação óssea, alterações radiográficas descritas como reações osteofitárias, diminuição do espaço articular, esclerose subcondral e cistos subcondrais. (COIMBRA; SAMARA,, 2004. TANAKA *et al.*, 1998).

A OA ocorre em 44% e 70% dos indivíduos acima de 50 anos, na faixa etária acima dos 75 anos, a incidência pode subir para 85% (SOUZA, D.V. 2013).

A osteoartrite é uma patologia multifatorial, cujos fatores de riscos descritos são idade, obesidade, lesão prévia de joelho, sexo feminino, trabalhos com excesso de carga e alterações do eixo mecânico dos membros inferiores (FELSON *et al.*, 2004). No entanto com o aumento do número de idosos e a obesidade crescente na população está favorecendo a progressão da incidência de OA (LOESER, 2011). O envelhecimento associado ao microtrauma, desgaste celular e tecidual, alterações na matriz extracelular ligado ao aumento da atividade de enzimas colagenases como a metaloprotease, clivagem do colágeno, redução dos Inibidores Teciduais das Metaloproteases (TIMP), instabilidade articular e a resposta inadequada aos estímulos mecânicos normais estão ligados ao desenvolvimento e evolução da osteoartrite (AIGNER T, 2002).

O aumento da rigidez mecânica é explicado pelas alterações na composição e integridade da cartilagem articular e surgimento de osteófitos. A cartilagem normal possui como principais constituintes a água, o colágeno, os glicosaminoglicanos, agrecanos e proteoglicanos. Com o avanço da osteoartrite a concentração extracelular de água diminui pela destruição da integridade do colágeno e a menor taxa de síntese de proteoglicanos o que causa a diminuição da hidrofília da cartilagem, alteração que diminui a resiliência do tecido, degenerando a matriz e acarretando irregularidades, desorganização na cartilagem articular, fissuras e erosões (KLEEMANN *et al.*, 2005). Atualmente, a inflamação da cartilagem é considerada a causa inicial da OA e as fissuras da cartilagem ocorreriam de forma secundária e com o avanço da patologia áreas do osso subcondral ficariam expostas sem a cobertura cartilaginosa (REZENDE *et al.*, 2000).

O tratamento farmacológico da osteoartrite inclui Sulfato de Condroitina e Sulfato de Glicosamina, anti-inflamatórios não esteroidais, corticoesteróides, infiltrações intra-articulares com preparações de ácido hialurônico, infiltrações intra-articulares de corticoesteróides, agentes de ação central e imunobiológicos. O sulfato de condroitina e o sulfato de glicosamina são considerados drogas sintomáticas de ação lenta e apesar de existir recomendações para seu uso ainda há controvérsia sobre sua utilização. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINH) continuam sendo usados no tratamento sintomático de pacientes com osteoartrite e recomendadas pela Academia Americana de Cirurgiões Ortopédicos (AAOS, 2013), embora seja sugerido o uso da menor dose possível e também pelo menor tempo de utilização possível para diminuir os efeitos colaterais. Corticoesteróides diminuem o processo inflamatório da sinovial, porém possuem diversos efeitos colaterais sistêmicos ao serem utilizados por longos períodos. Nas infiltrações intra-articulares com corticoesteróides, existem muitas indagações sobre qual a melhor substância a ser utilizada e qual sua dosagem ideal, porém tem efeito importante no bloqueio dos efeitos deletérios gerados por processos inflamatórios, evitando a degradação da cartilagem pela supressão de enzimas como as: metaloproteases, estromelina, colagenase e agrecanase; diretamente ou através da inibição de fatores que estimulam a formação destas substâncias (PELLETIER; MARTEL-PELLETIER; MALEMUD, 1988; ALTMAN *et al.*, 1998).

A Duloxetina, um agente de ação central, inibidor da recaptção de serotonina e norepinefrina foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA)

para o tratamento de dor crônica da OA em 2010 e pode ser usado como adjuvante na terapia para dor em pacientes com resposta inadequada aos AINH. A cloroquina suprime o óxido nítrico induzido pelas interleucinas, todavia sua eficácia clínica não é estabelecida (REZENDE *et al*, 2009). Agentes imunobiológicos, como anticorpos monoclonais, entre eles o Tanezumab e o Adalimumab, estão sendo estudados quanto a seus efeitos colaterais e eficácia. (HOCHBERG *et al.*, 2012).

A substituição articular vem se tornando a opção de escolha na osteoartrite grave com o objetivo de retornar à função articular e trazer o alívio da dor. Estima-se um aumento de 673% nos próximos 25 anos, o que acarretará no aumento das revisões cirúrgicas e morbidade dessa população. Embora a artroplastia apresente bons resultados para a OA em fase final, a faixa etária mais jovem da população dificilmente é submetida a essa terapêutica de substituição articular, pois a alta demanda desses pacientes reduz a da vida útil das próteses e aumenta o número de revisões cirúrgicas e complicações desse tipo de procedimento; tais fatos refaz considerar medidas farmacológicas para osteoartrite em todas as suas fases de evolução. (KURTZ, 2007).

## 2.2 ÁCIDOS HIALURÔNICOS

O ácido hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano com alto peso molecular, polissacarídeo de alta viscosidade produzido nas células B da membrana sinovial. É o componente de maior importância do líquido sinovial. O ácido hialurônico promove a viscoelasticidade e protege a cartilagem e os tecidos adjacentes (GIGIS *et al.*, 2016). É uma estrutura de 3 a 30  $\mu\text{m}$ , sendo um glicosaminoglicano não sulfatado e não ramificado de estrutura com unidades repetidas de dissacarídeo N-acetilglucosamina e ácido glucurônico. Grupos de hidroxila de oxigênio no glucuronil-1 e glucosamina-3 são utilizados para polimerização nas unidades de dissacarídeos criando o ácido hialurônico (FRANSSON *et al.*, 1985). Apresenta atividade condroprotetora comprovada por diversas publicações científicas que associam a condroproteção não só a maiores concentrações utilizadas, mas também ao seu

maior peso molecular (PEYRON *et al.*, 1993; ASARI *et al.* 1998; WANG *et al.*, 2006). As preparações de injeções de ácido hialurônico de baixo peso molecular (0,5-1,5 milhões de Dalton) conseguem alcançar a máxima concentração na articulação e reduzem a inflamação, entretanto possui uma menor elastoviscosidade em comparação ao AH ramificado de alto peso molecular (6-7 milhões de Dalton) acarretando uma melhor retenção de líquidos e apresentando um efeito anti-inflamatório mais potente (GIGIS *et al.*, 2016).

O joelho adulto normalmente contém em média 2 ml de líquido sinovial, com uma concentração de AH de 2,5 a 4,0 mg / ml. No paciente com osteoartrite, a concentração e o peso molecular do AH são diminuídos em torno de 33% a 50%, pois a produção é prejudicada por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, radicais livres e proteinases. Estas mudanças acarretam a perda das propriedades viscoelásticas, prejudicando a mecânica articular. A diminuição da lubrificação acarreta aumento do estresse mecânico e bioquímico na articulação e na cartilagem hialina, o que piora a superfície condral (ROQUE *et al.*, 2013).

O ácido hialurônico é o principal constituinte da matriz extracelular e do líquido sinovial; é responsável por várias propriedades mecânicas, como permitir à absorção de choque, lubrificação da articulação, a proteção do tecido cartilaginoso, distribuição de forças, diminuir a pressão da força peso e manter as propriedades reológicas do líquido sinovial (RIVERA *et al.*, 2016). O AH atua bioquimicamente diminuindo as expressões gênicas de citocinas, o que influencia na menor produção de prostaglandinas. A presença de AH estimula a produção de ácido hialurônico endógeno, apresenta efeitos analgésicos, diminuindo impulsos nervosos e a sensibilidade nas terminações nociceptivos, estabiliza a matriz da cartilagem, aumenta a proliferação de condrócitos, estimula a produção de colágeno tipo 2 e agrecanos e diminui a degradação de colágeno tipo 2 (WANG *et al.*, 2006; TAKESHITA *et al.*, 1997; GOMIS *et al.*, 2004, GOMIS *et al.*, 2009).

A viscosuplementação por injeções intra-articulares de (AH) apresentou seus efeitos benéficos no tratamento osteoartrite. Este tratamento propiciou o alívio da dor e a melhora da função articular. Em um estudo de meta-análise recente de ensaios clínicos destacou-se que a eficácia tem início após 4 semanas, alcançando o seu pico entre 8 e 13 semanas e, após, diminui progressivamente (ASKARI *et al.*, 2016).

Apesar do AH ser renovado na articulação com menos de 24 horas, os benefícios do tratamento podem se prolongar por meses. Para explicar esse efeito de sua ação prolongada, alguns mecanismos foram discutidos, incluindo a simulação da criação de nova síntese sinovial, supressão da degradação da matriz cartilaginosa e supressão da resposta inflamatória da interleucinas 1 (JÜNI *et al.*, 2007).

O ácido hialurônico é utilizado há trinta anos na prática clínica, no entanto o seu real mecanismo de ação ainda permanece controverso, está presente na pele, humor vítreo, cartilagem, cordão umbilical; porém é encontrado em maior quantidade no líquido sinovial das articulações sinoviais (WOBIG *et al.*, 1998; GOSH; GUIDOLIN, 2002; HULMES *et al.*, 2004).

As injeções intra-articulares de ácido hialurônico são aplicadas para proporcionar na articulação uma melhor absorção de choque, protegendo a cartilagem hialina e diminuindo o quadro álgico dos pacientes com OA, por produzir ação anti-inflamatória articular. A eficácia dos AH têm se apresentado em tópicos de controvérsia, devido à literatura atual disponibilizar resultados e conclusões diversas sobre o ácido hialurônico intra-articular (ALTMAN *et al.*, 2015).

Entre as outras características do AH estão a de diminuir o desgaste, o atrito e estabilizar a articulação nos movimentos com baixa cinética. Ajuda na nutrição da articulação e na eliminação de metabólicos em mecanismos osmóticos. Vários estudos foram publicados o efeito de diferentes ácidos hialurônicos com resultados conflitantes (WOBIG *et al.*, 1999; KARLSSON; SJÖGREN; LOHMANDER, 2002; ATAMAZ *et al.*, 2006).

## 2.3 MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE

A osteoartrite em seres humanos é uma patologia articular degenerativa induzidas por interações metabólicas, genéticas e bioquímicas. Apresenta uma progressão lenta e seu início não apresenta uma definição exata. Assim existe a necessidade de um modelo animal que consiga reproduzir a patologia (YOSHIOKA *et al.*, 1996).

Para se analisar os efeitos da osteoartrite, o modelo experimental que se aproxima aos observados nos humanos é o do coelho. No estudo de Albano *et al.*, (2010) com modelo experimental de osteoartrite em coelhos, o ligamento cruzado anterior (LCA) foi seccionado, com o decorrer do estudo encontrou-se sinais de osteoartrite na avaliação macroscópica.

Os modelos para osteoartrite em coelhos foram estudados, descritos e revisados. As técnicas cirúrgicas realizadas ao longo dos anos incluíam imobilização, abordagem cirúrgicas com o objetivo de desestabilização da articulação (Secção do LCA, meniscectomias parciais e totais), injeção intra-articular com substâncias farmacológicas e denervação de membro acometido (YOSHIOKA *et al.*, 1996).

Com o avanço dos estudos, os modelos experimentais em coelhos estão sendo analisados por técnicas complementares como tomografias microcodificada (TCI), marcação morfológica e histológica (celularidade, proteoglicanos), imunohistoquímica (metaloproteinases) e microscopia eletrônica de varredura (KADERLI, 2015).

Os modelos com instabilidade cirurgicamente criados de osteoartrite são utilizados para analisar a eficácia terapêutica de substâncias farmacológicas para o tratamento da OA. O procedimento cirúrgico produz lesões cartilaginosas idênticas às vistas em seres humanos (LAVERTY *et al.*, 2010).

Os primeiros modelos de osteoartrite criados no coelho envolveram a rotura do menisco medial, ligamento colateral medial e ambos os ligamentos cruzados (LCA e LCP). Os autores visualizaram a morte precoce de condrócitos, primeiramente na zona superficial da cartilagem, que após evoluiu para fissuras, erosão e até esclerose no osso subcondral. A partir, desta abordagem os procedimentos estão sendo aprimorados para diminuir a morbidade dos animais. Assim tende-se a proceder com a meniscectomia parcial, meniscectomia total ou a transecção do ligamento cruzado anterior, inicialmente relatado por Vignon *et al.*, (1983).

A meniscectomia evolui com formas brandas da osteoartrite, fissuras sem perda de espessura da cartilagem articular. A rotura ligamento cruzado anterior cria lesões histológicas mais extensas e geram erosões de profundidade completa da cartilagem. (LAVERTY *et al.*, 2010).

Transecção do LCA para criação da degeneração cartilaginosa é utilizada em vários modelos animais. Os animais inicialmente utilizados eram os cães, em seguida houve a substituição pelos coelhos nos estudos de tratamentos de osteoartrite, a cartilagem no joelho dos coelhos apresentou evidências de mudanças graduais na superfície da articulação, progressivas, histopatológicas e reação osteofitárias em radiografias. Além de que a aplicação intra-articular em coelhos é mais fácil tecnicamente quando comparados a ratos e camundongos pelo tamanho da área intra-articular, associado a melhor visualização em radiografias e ressonância nuclear magnética (NISBET, 2012).

Assim o modelo em coelhos é usado em intervenções terapêuticas e possui relevância clínica, pelo fato que representa ser um dos melhores modelos experimentais para a criação de osteoartrite em pequenos animais (YOSHIMI *et al.*, 1994; YOSHIOKA *et al.*, 1996; CHANG *et al.*, 1997).

## 2.4 METALOPROTEASES

Para se regular e principalmente degradar a matriz extracelular das macromoléculas, com objetivos de homeostasia celular e o *turnover* fisiopatológico, existem enzimas proteolíticas denominadas metaloproteases. Dentro de suas características de degradação do colágeno e elastina (HAAKE *et al.*, 2004), o aumento da atividade enzimática determina uma maior degradação de proteoglicanos, acarretando uma maior degeneração na matriz extracelular (TAKAHASHI *et al.*, 1999).

As metaloproteases classificam-se na família de endopeptidases dependentes dos metais Cálcio ou Zinco (BARAGI, 2009; RUNDHAUG, 2003). Nomeadas por uma numeração, agrupadas pela sua estrutura química e divididas pela sua forma solúvel ou ligada à membrana (NABESHIMA *et al.*, 2002). São proteínas insolúveis que necessitam de enzimas, proteases séricas do tipo plasmina e funinas para ativá-las. Para a sua quebra, degradação e neutralização existem as glicoproteínas descritas como inibidores teciduais de metaloproteases (TIMP) alfa-



macroglobulinas, inibidores endógenos que através da união específica enzimática bloqueiam a função catabólica das MMPs (LOMBARD *et al.*, 2005).

As TIMPs são descritas em 4 tipos e reconhece-se que além de exercer a função de inibição, atuam na ativação em raros casos de metaloproteases (RUNDHAUG, 2003, SORSA; 2004). Dentre os 4 tipos identificados, a TIMP-1 foi o inibidor que só foi encontrado em articulações com osteoartrite (LOMBARD *et al.*, 2005).

Dentre todas as metaloproteases, MMP-1, MMP-3, produzidas pelo condrócito e MMP-13 são as mais estudadas. A MMP-1 (colagenase) degrada o colágeno na articulação, enquanto o MMP-3 destrói proteoglicanos e ativa outras MMP em estado de latência (TANAKA *et al.*, 1998).

Observou-se que as MMP apresentam um importante papel na osteoartrite, artrite reumatoide e nos traumas articulares (BARAGI, 2009, LOMBARD *et al.*, 2005). O dano irreparável e evolutivo da cartilagem articular com os mecanismos fisiopatológicos exatos ainda permanece em análise, no entanto sabe-se o quanto é importante o fator das enzimas proteolíticas de matriz na progressão da osteoartrite (LOMBARD *et al.*, 2005).

Fatores genéticos, de desenvolvimento, metabólicos estão ligados a essa quebra da homeostase (TANAKA *et al.*, 1998). Os inibidores teciduais de metaloproteases (TIMP) não se elevam em pacientes com osteoartrite tanto quanto MMPs. Este desequilíbrio entre a ação enzimática das MMPs e TIMP é fator fundamental na evolução da patologia. (TAKAHASHI *et al.*, 1999).

Wahl e Corcoran (1993) descreveram que em processos inflamatórios crônicos, quando existem células mononucleares abundantes, estes atuam como mediadores químicos e atuam gerando metaloproteases em excesso, agredindo o colágeno da matriz, o que em longo prazo torna a evolução da osteoartrite mais rápida.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná-UFPR avaliou e aprovou o protocolo de pesquisa utilizado nesse experimento (Registro CEP/SD: 001.004 SI 06-06).

#### 3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE

Este experimento foi realizado no biotério do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Foram utilizados quarenta e quatro coelhos da raça *California*, machos, que permaneceram alojados antes e durante a realização dos procedimentos, no Biotério, em gaiolas retangulares medindo 40X30 cm, com dois animais em cada uma, com alimentação padronizada e livre acesso à água. Foram mantidos em controle de luz (ciclo claro-escuro de 12 horas), com temperatura ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade e nível de ruído mantido estáveis, com o peso médio de cada animal em 3,5kg. Todos os animais inicialmente foram submetidos à secção do LCA em dois dias de trabalho, por três pesquisadores. O joelho direito foi escolhido como padronização do experimento. O procedimento cirúrgico consistiu de anestesia pré-operatória com 10mg/kg de Cloridrato de Cetamin (Dopalen®) e 50mg/kg de Cloridrato de Xilasina (Anasedan®), administradas na mesma seringa, de forma intramuscular (IM), no ventre dos músculos semimembráceo e semitendíneo do membro posterior direito. Na mesma ocasião foi administrada injeção de 14.400UI de Penicilinas e 6mg de estreptomicinas (Pentabiótico Veterinário Reforçado® -

Eurofarma) como antibioticoprofilaxia, e Flunamine® (Bayer), na dose de 2,2 mg/kg, por via IM, para analgésica pós-operatória.

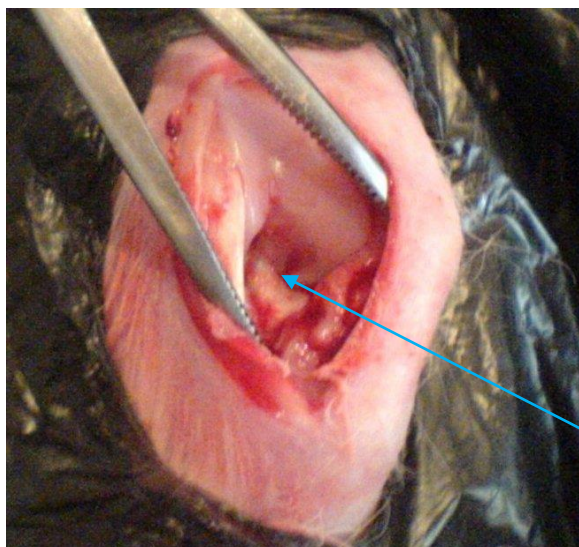
### 3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O joelho direito foi submetido à tricotomia manual e a antissepsia com polivinilpirrolidona (Povidine®). Após a aplicação de campos plásticos estéreis, foi realizada incisão parapatelar medial na pele e tecido subcutâneo, seguido de capsulotomia e luxação lateral da patela (Figura 1). O joelho foi então posicionado em flexão máxima, o que permitiu a visualização do ligamento cruzado anterior (Figura 2). Este foi seccionado com lâmina de bisturi nº15, a articulação foi irrigada com solução salina isotônica e procedeu-se a capsulorrafia e sutura da pele com Mononáilon 4.0 (Figura 3).

FIGURA 1 - FOTOGRAFIA DA INCISÃO CUTÂNEA E CAPSULOTOMIA



FIGURA 2 - FOTOGRAFIA DA EXPOSIÇÃO DO LCA



LCA

FIGURA 3 – FOTOGRAFIA DA SUTURA DA PELE



Os coelhos permaneceram alojados nas suas respectivas gaiolas após o ato operatório, sem restrição de apoio aos membros operados. Os animais foram distribuídos randomicamente em três grupos com 14 animais cada um. Decorridas três semanas do procedimento cirúrgico iniciaram-se as respectivas injeções intra-articulares. O volume dos ácidos hialurônicos foi de 0.3 ml, similar à utilizada em pequenas articulações de seres humanos (FURTADO *et al.*, 2011). No presente estudo foi utilizado o ácido hialurônico de cadeia ramificada Hilano G-F 20 de origem aviária (crista de galináceos) de alto peso molecular  $6 \times 10^6$  Da (Synvisc®) e o ácido

hialurônico de cadeia nativa de origem aviária (crista de galináceos) de baixo peso molecular 5 a  $7 \times 10^5$  Da (Polireumin®). Ambos os ácidos hialurônicos são utilizados rotineiramente em infiltrações intra-articulares em humanos (ADAMS *et al.*, 1994). Os grupos foram divididos da seguinte forma:

**Grupo P:** controle, três infiltrações com intervalo semanal de solução salina isotônica (SF 0,9%).

**Grupo PR:** três infiltrações com intervalo semanal de ácido hialurônico nativo (Polireumin®).

**Grupo S:** três infiltrações com intervalo semanal de ácido hialurônico ramificado (Synvisc®).

Um coelho do grupo PR e outro do grupo S evoluíram com infecção do sítio operatório com extensão articular e foram excluídos da pesquisa, sendo sacrificados.

Foram sacrificados após 12 semanas do ato cirúrgico todos os animais. Para isso foram previamente anestesiados como descrito anteriormente e submetidos à injeção intra-cardíaca de Tiopental (5 ml) e Cloreto de Potássio (10 ml). Os platôs tibiais foram ressecados assepticamente, imersos em frasco contendo formol a 10%. Os frascos foram etiquetados para identificação dos grupos e enviados ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas (Figura 4).

FIGURA 4 – FOTOGRAFIA DOS FRASCOS CONTENDO OS PLATÔS TIBIAIS



### 3.4 PROCEDIMENTOS DE COLORAÇÃO HISTOLÓGICA

Os platôs tibiais foram descalcificados sendo os platôs mediais submetidos à microtomia no plano sagital e inclusos em parafina. Foram realizadas dez amostras para cada grupo e fixadas em Paraformaldeído 4%, em PBS, pH= 7.4, por duas horas. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em Xilol e incluídas em parafina. Cortes de 3 $\mu$ m dos platôs tibiais dos coelhos foram depositados em lâminas carregada positivamente (Imunnoslide, Easypath®). Na sequência, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de etanol, e processados para a imuno-histoquímica.

Cortes reidratados foram incubados com 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada em tampão Citrato de Sódio 10 mM, pH 6.0, à 95° C, por 40 minutos. Possíveis ligações não específicas, bem como radicais aldeídicos livres foram bloqueados pela incubação de 5 minutos com PBS contendo 1% de BSA e por PBS contendo 0,1M de Glicina, respectivamente.

Posteriormente, os cortes foram incubados por 12 horas à 4°C com os anticorpos primários. Os anticorpos primários utilizados e suas diluições foram: anti-CD44 (BD Pharmigen 550538, IgG de rato, diluído 1:100), MMP-3 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC6839, IgG de cabra, diluído 1:200), MMP-13 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC31811, IgG de cabra, diluído 1:200), TIMP-1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC6832, IgG de cabra, diluído 1:200), TIMP-3 (Santa Cruz Biotechnology, CA, SC6836, IgG de cabra, diluído 1:200), bem como com a proteína de ligação ao ácido hialurônico diluído 1:80, conjugada com biotina por 1 hora em temperatura ambiente.

Após o término do tempo de incubação, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários específicos (exceto a proteína de ligação, pois já é biotinilada e nesse caso foi incubada com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos). Os anticorpos secundários utilizados foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, sendo eles: anticorpo secundário biotinilado de coelho contra IgG de cabra (Vector Laboratories, BA-500, diluído 1:200), anticorpo

secundário biotilado de cabra contra IgG de rato (Vector Laboratories, BA-9400, diluído 1:300) anticorpo secundário biotilado de cabra contra IgG de coelho (Vector Laboratories, BA-1000, diluído 1:300), após a incubação com os respectivos anticorpos secundários foi realizada a incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase por 30 minutos.

A revelação da ligação dos anticorpos primários foi realizada com DAB (“3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride”), (DAB substrate Kit, BD Pharmigen). A seguir, os cortes foram corados com hematoxilina, desidratados em bateria crescente de etanol, seguido de incubação em xilol, as lâminas permanentes foram montadas com Entellan (Merck®), os métodos utilizados foram realizados de modo semelhante aos sugeridos pelo estudo de Schmitz (SCHMITZ *et al.*, 2010).

Exemplificação das marcações utilizadas (figura 5 e 6).

FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO IMUNOMARCADO PARA MMP 13, DO GRUPO S

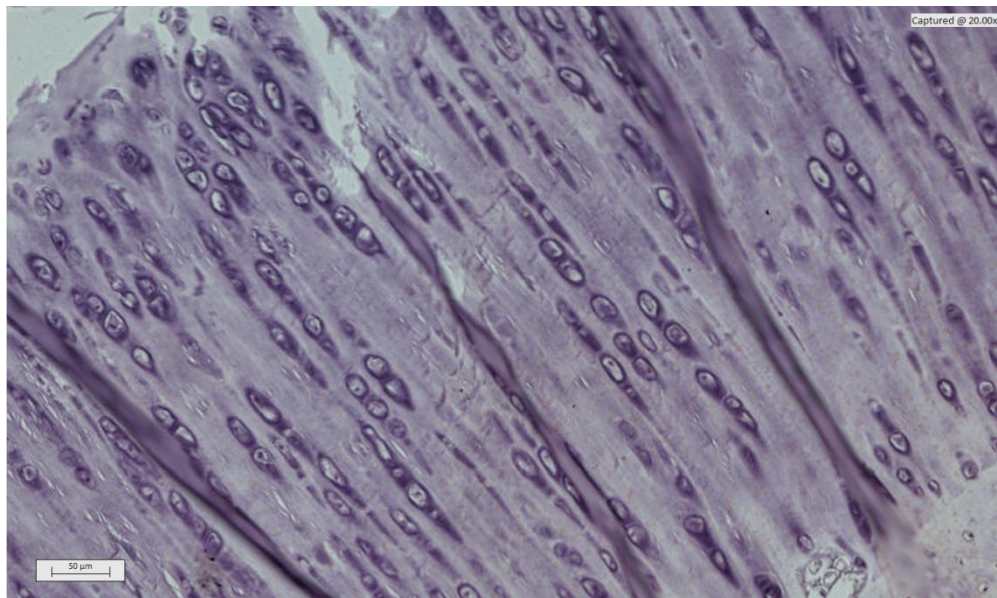
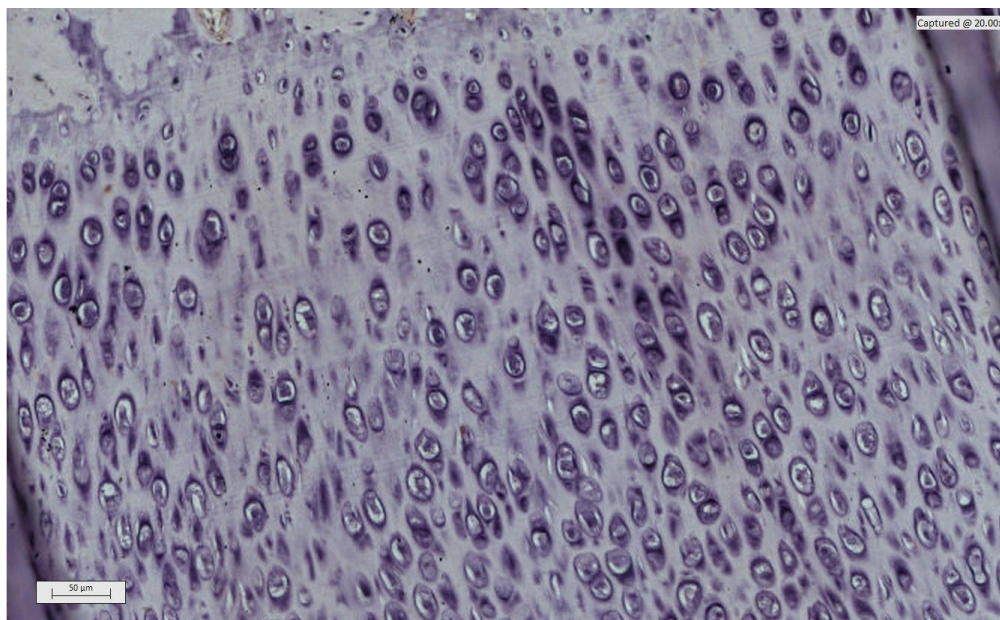
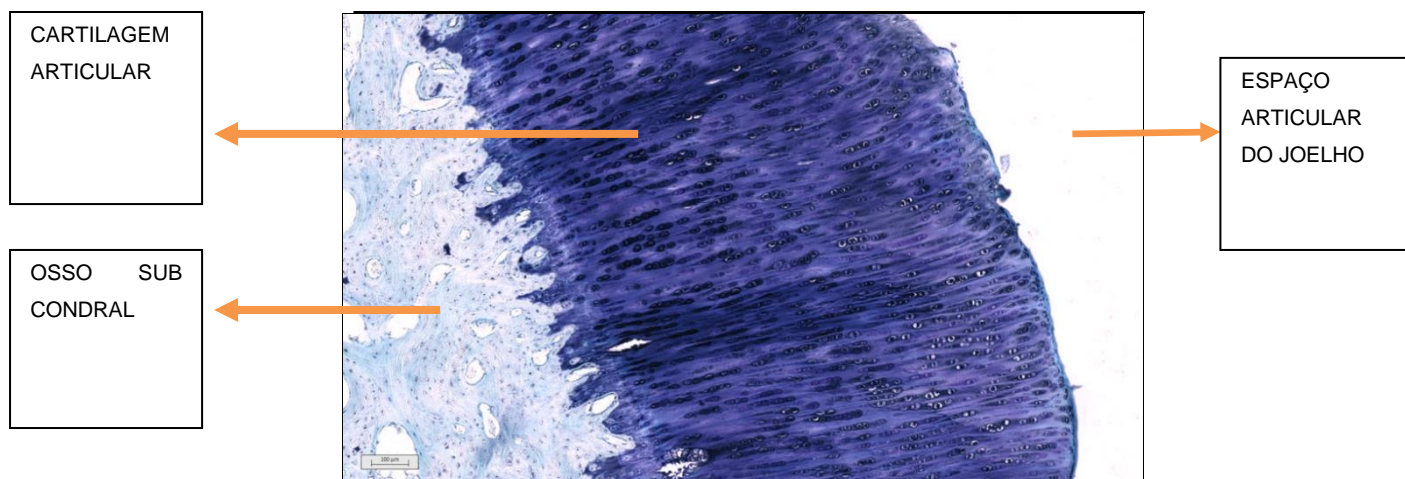


FIGURA 6 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO IMUNOMARCADO PARA TIMP 1, DO GRUPO S



No esquema abaixo demonstrando a localização do tecido cartilaginoso, ósseo e do espaço articular do joelho do coelho.

FIGURA 7– FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO CORADO DA CARTILAGEM ARTICULAR PARA LOCALIZAÇÃO DOS TECIDOS





### 3.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E ESTÁTISTICAS

As lâminas histológicas foram digitalizadas automaticamente em um microscópio Carl Zeiss Imager.Z2 Metasystems, utilizando o software Metafer MSearch4, com pós-montagem com VSlide. Então, as regiões da cartilagem foram selecionadas com a ferramenta de snapshot do software MetaViewer. As fotos foram analisadas no software ImageJ, utilizando a ferramenta de RGB Stack. A digitalização das lâminas histológicas e sua respectiva análise foram realizadas no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná – UFPR, no Setor de Ciências Biológicas.

Na quantificação de marcação por DAB, foi utilizado o software imageJ (NIH), utilizando lâminas marcadas ou imunomarcadas e reveladas com DAB. No software foi realizada a secção da cartilagem do restante da amostra, depois a deconvolução (*deconvolution*) das cores, para ser separada a cor marrom do corante revelador da imunomarcação. Realizada essa etapa foi quantificada a área marcada de cartilagem, obtendo-se um valor percentual dessa área.

Os testes estatísticos utilizados foram Mann Whitney U *test* para observar a normalidade da amostra testando a heterogeneidade de duas amostras ordinais, e o teste *t* para observar a significância estatística entre os grupos. O valor estatístico para todos os testes foi  $p = 0,05$ .

O número de lâminas analisadas (*n*) nos testes estatísticos foi de dez ao invés das quatorze confeccionadas para cada grupo estudado, pois ocorreu quebra de alguns platôs durante o corte histológico, e em uma lâmina do grupo P houve soltura do material impregnado.

FIGURA 8 – FOTOGRAFIA DO APARELHO DE MICROSCOPIA UTILIZADO NA PESQUISA

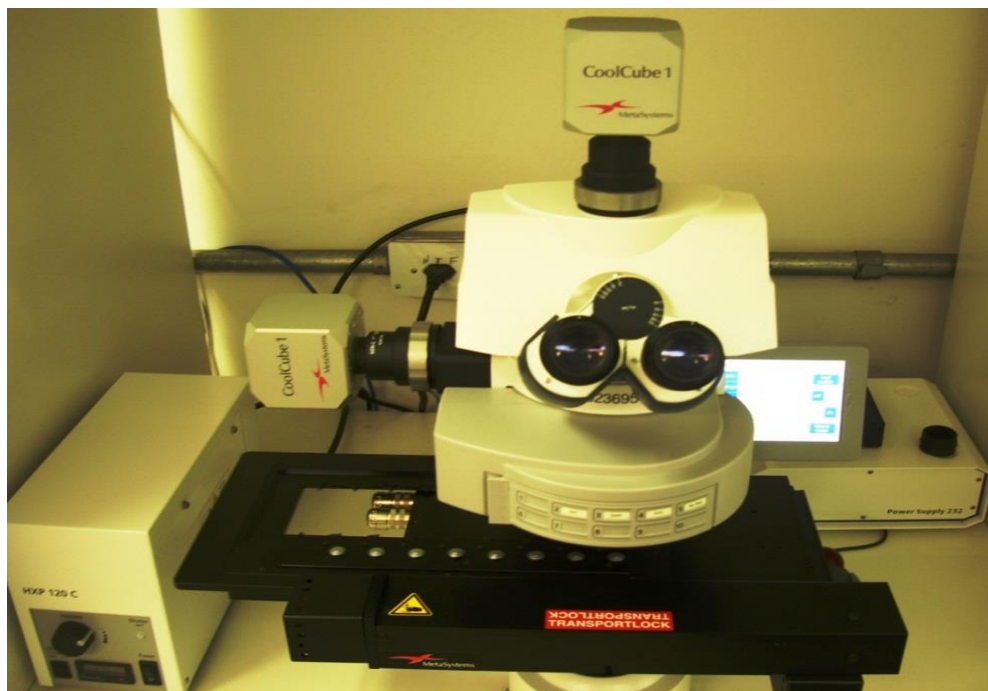


FIGURA 9 – FOTOGRAFIA DO SOFTWARE EM OPERAÇÃO

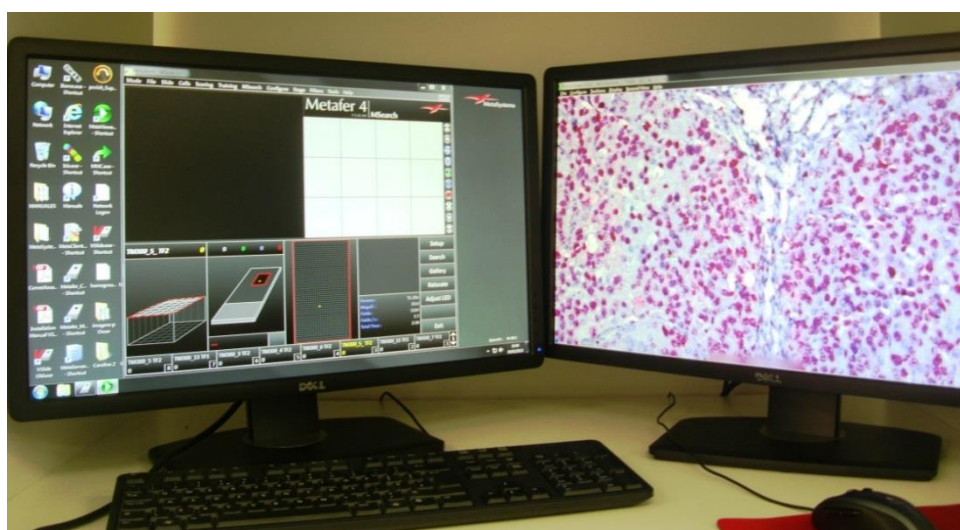


FIGURA 10 – FOTOGRAFIA DO SOFTWARE METAFER 4



Através da análise utilizada, cada lâmina gerou um dado numérico dentro do conjunto de dados para cada grupo, que foram P, PR ou S, totalizando trinta lâminas/indivíduos analisados (dez para cada grupo).

A pesquisa foi em sua totalidade financiada pelos pesquisadores, não apresentando nenhum tipo de conflito de interesse.

## 4 RESULTADOS

As lâminas descalcificadas, coradas e marcadas com imuno-histoquímica mostraram a presença de metaloproteases (MMP) 3 e 13 em menor quantidade nos grupos PR e S, quando comparado ao grupo controle P (placebo) e em relação aos Inibidores Tissuais de Metaloproteases (TIMP) 1 e 3 houve um aumento nos grupos PR e S, em relação ao grupo P; todas essas evidências apresentaram diferenças estatísticas significantes.

A comparação entre os grupos PR e S na medição da quantidade de MMPs e TIMPs, ocorreu aumento das TIMPs e diminuição das MMPs no grupo PR, obtendo uma leve tendência de maior condroproteção ao grupo PR, porém sem diferença estatística significativa entre os dois grupos.

FIGURA 11 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE MMP 3– GRUPO P

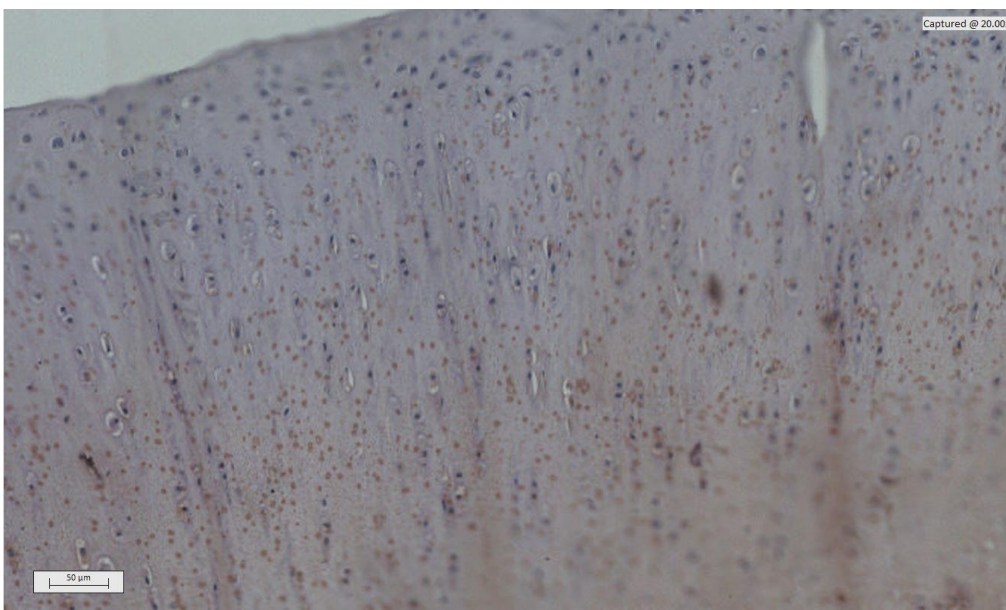


FIGURA 12 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE MMP 3 – GRUPO S

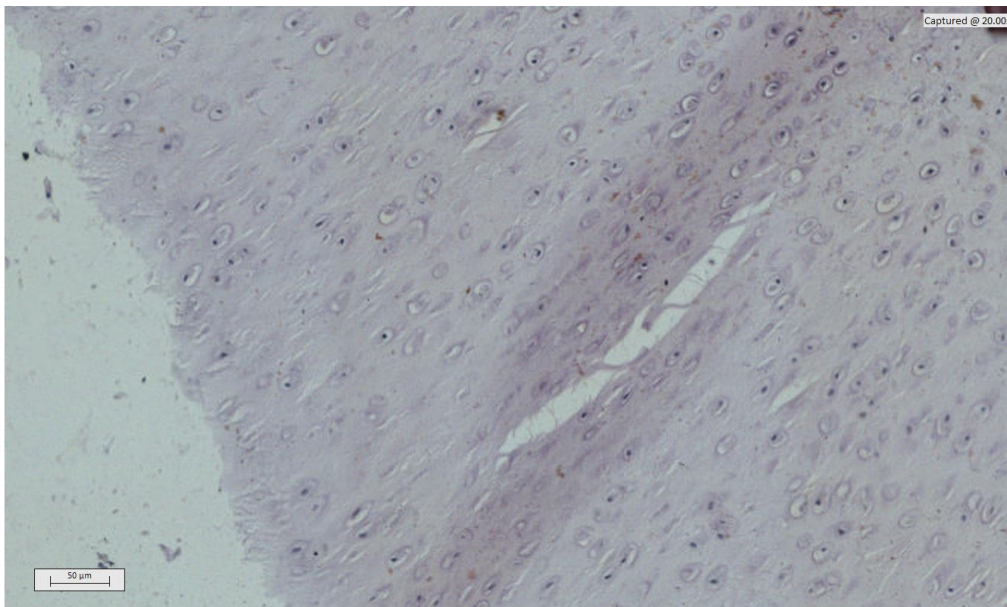


FIGURA 13 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE MMP 3 – GRUPO PR

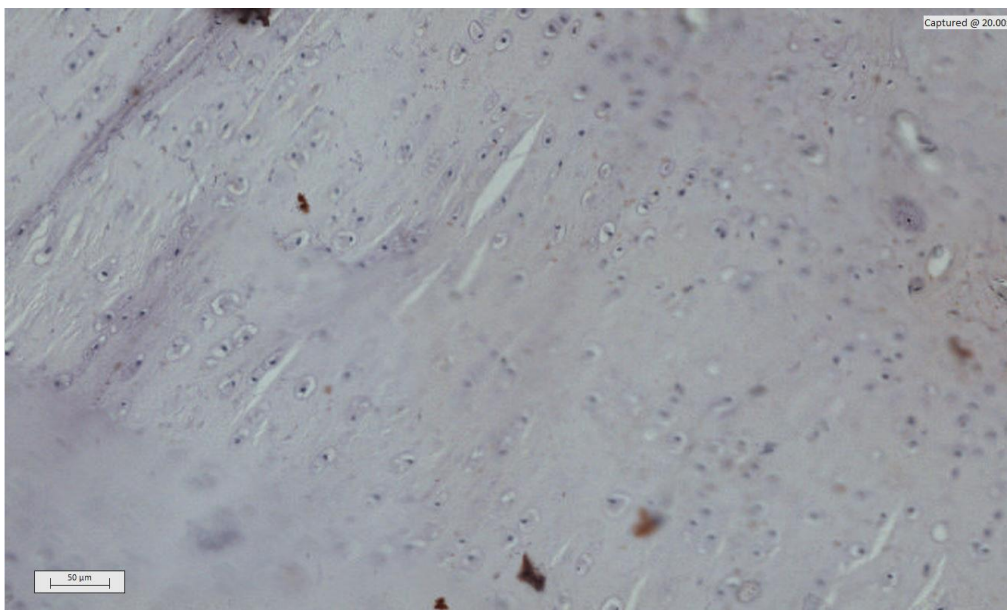


FIGURA 14 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE MMP 13 GRUPO P

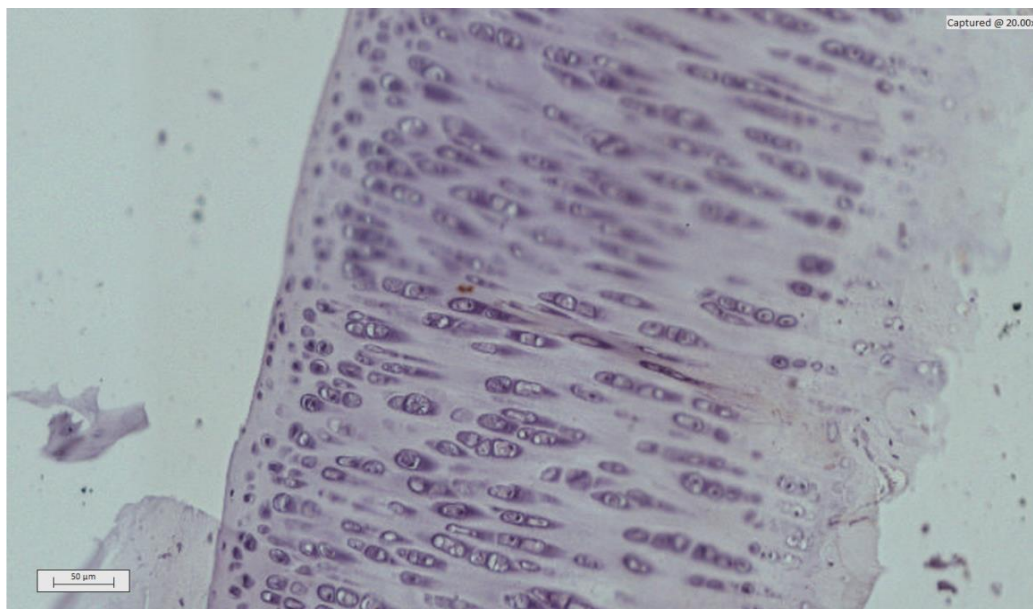


FIGURA 15 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE MMP 13 – GRUPO S

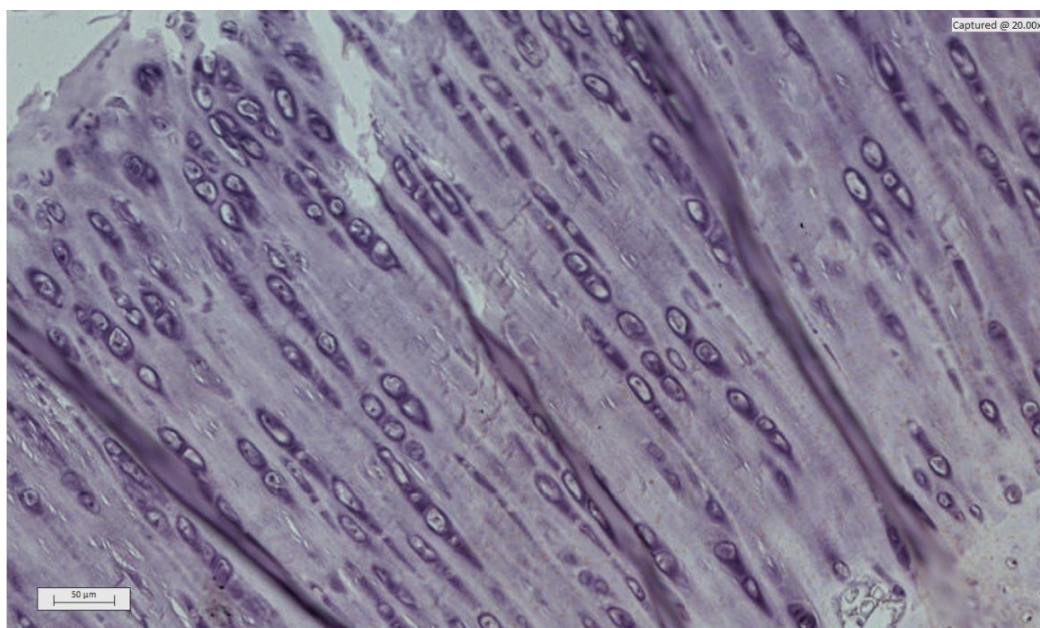


FIGURA 16 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE MMP 13 – GRUPO PR

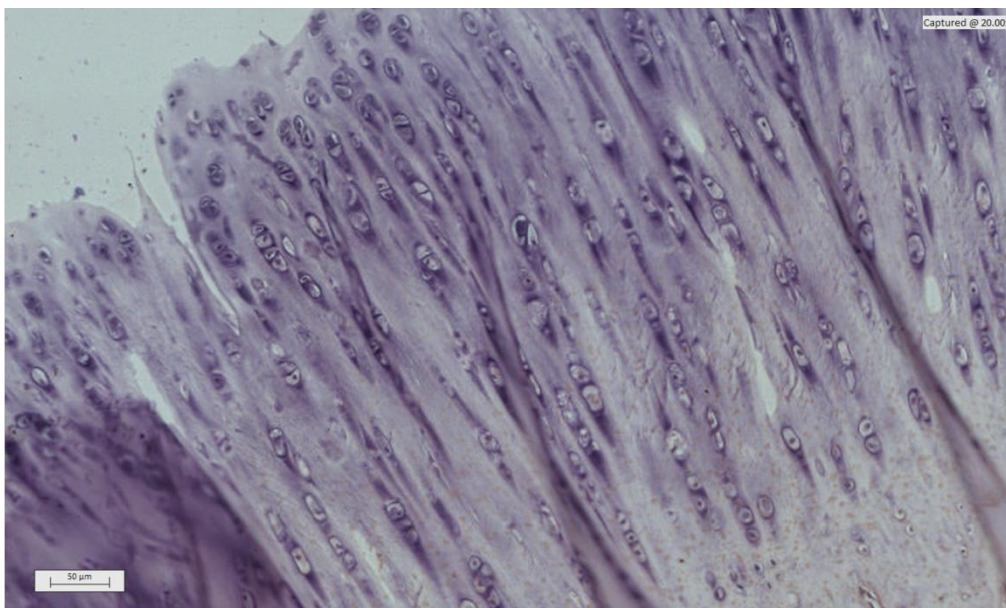


FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE TIMP 1- GRUPO P

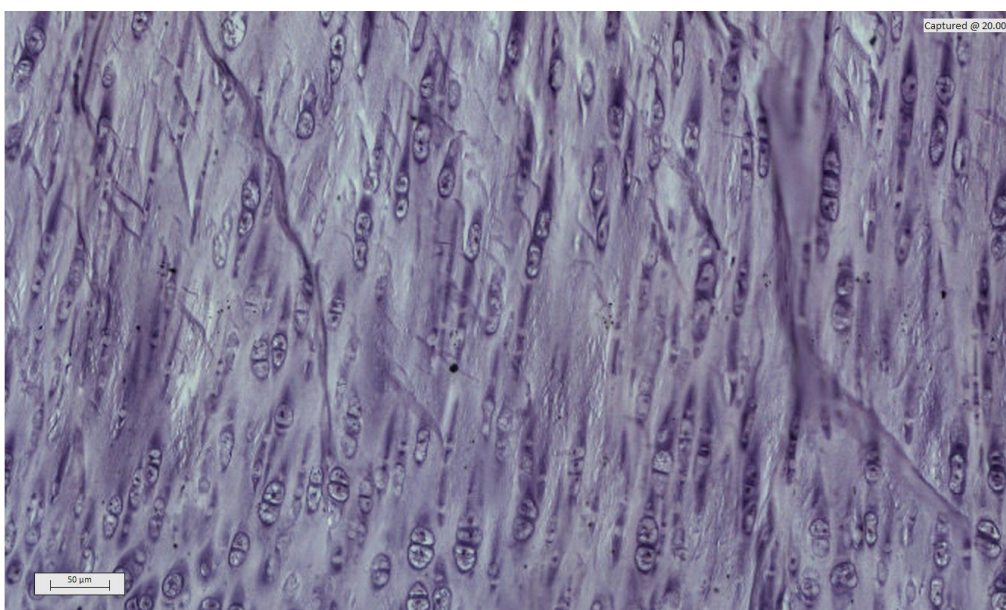


FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE TIMP 1 – GRUPO S

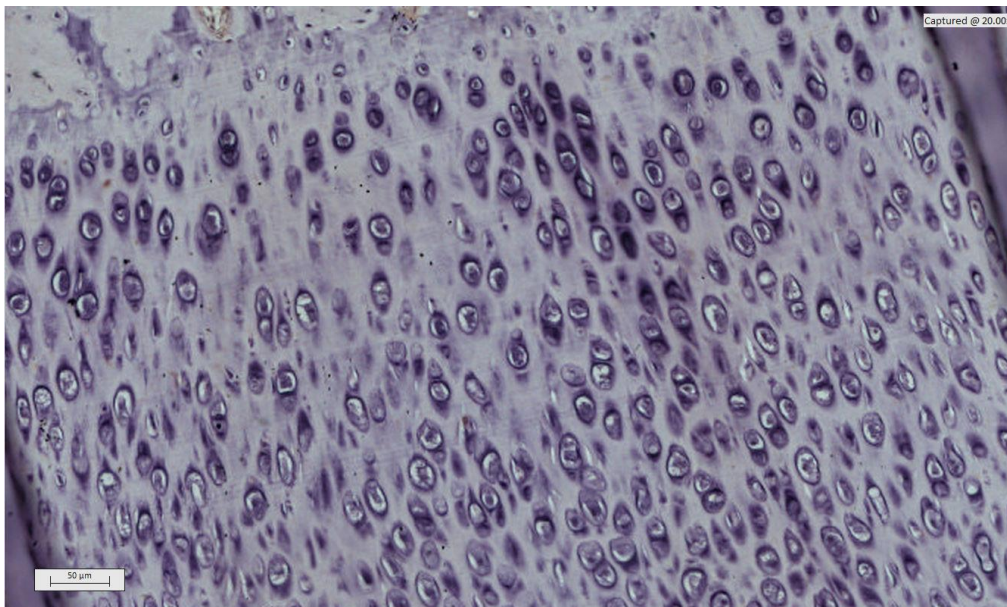


FIGURA 19 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE TIMP 1 – GRUPO PR

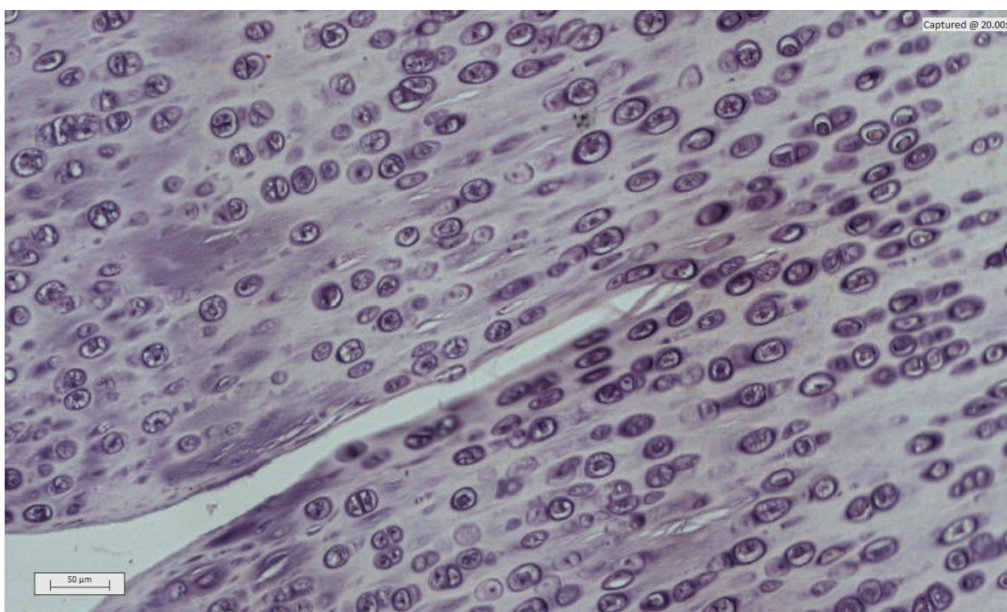




FIGURA 20 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE TIMP 3 – GRUPO P

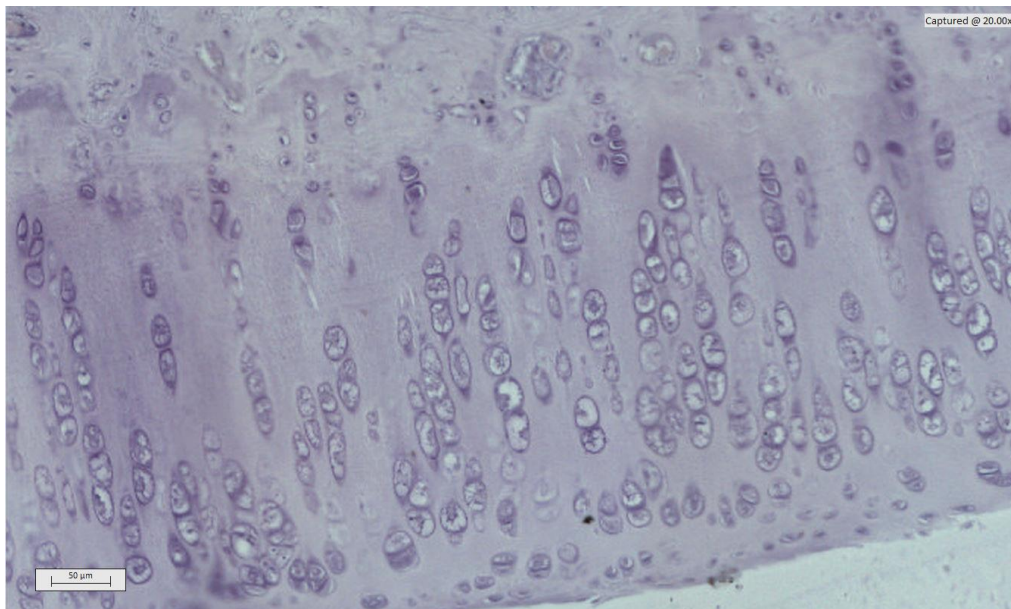


FIGURA 21 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE TIMP 3 – GRUPO S

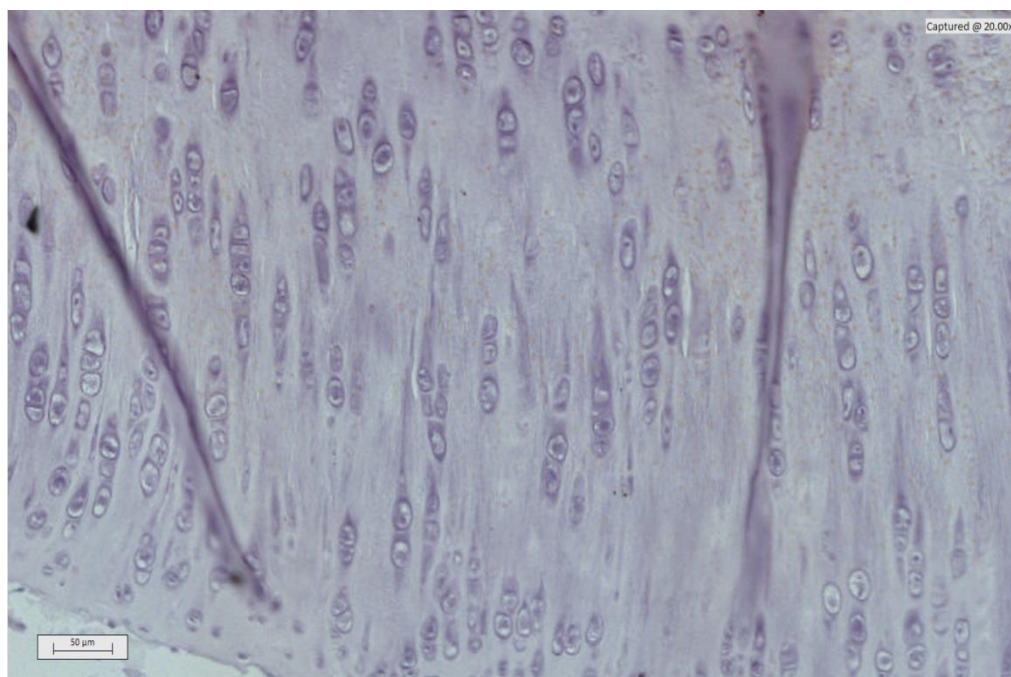
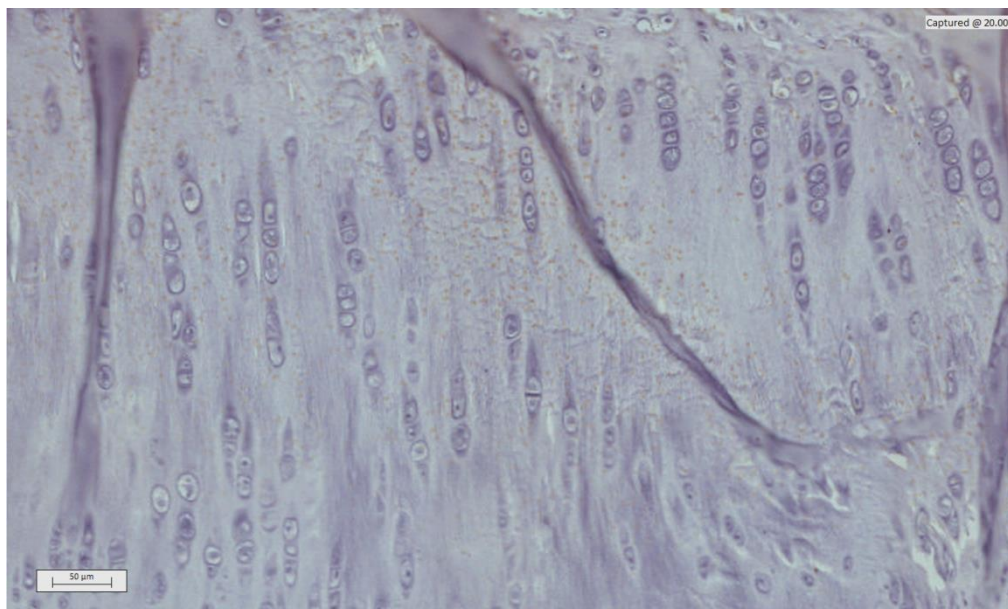


FIGURA 22 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE CARTILAGEM ARTICULAR IMUNOMARCADA DE TIMP 3 – GRUPO PR



A avaliação da intensidade de coloração dos cortes histológicos corados e imunomarcados realizada pelo aparelho de microscopia Zeiss Imager Z2 Metasystems, gerou resultados que foram dispostos em tabelas e gráficos. A seguir estão as tabelas referente a comparação do grupo P com os grupos S e PR, das MMPs (3 e 13) e TIMPs (1 e 3); e os gráficos 1, 2, 3 e 4 representativos da intensidade real da coloração mensurada em cada grupo citado anteriormente. Sendo, **P**-Placebo, **PR**-Polireumin® e **S**- Synvisc®.

TABELA 1-COMPARAÇÃO DO GRUPO S VERSUS P PARA MMP3

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	S MMP3	P MMP3
Média	2,108	10,891
Variância	0,45564	4,977587778
Observações	10	10
Hipótese de diferença de média	0	
gl	11	
Stat t	-11,91554542	
P(T<=t) uni-caudal	6,3E-08	
t crítico uni-caudal	1,795884819	
P(T<=t) bi-caudal	1,25083E-07	
t crítico bi-caudal	2,20098516	

TABELA 2-COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS PR PARA MMP3

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	<i>P MMP3</i>	<i>PR MMP3</i>
Média	10,667	2,0225
Variância	4,414601111	0,341651389
Observações	10	10
Hipótese de diferença de média	0	
gl	10	
Stat t	12,53451191	
P(T<=t) uni-caudal	9,68561E-08	
t crítico uni-caudal	1,812461123	
P(T<=t) bi-caudal	1,93712E-07	
t crítico bi-caudal	2,228138852	

GRÁFICO 1- INTENSIDADE DE IMUNOMARCAÇÃO DE MMP3

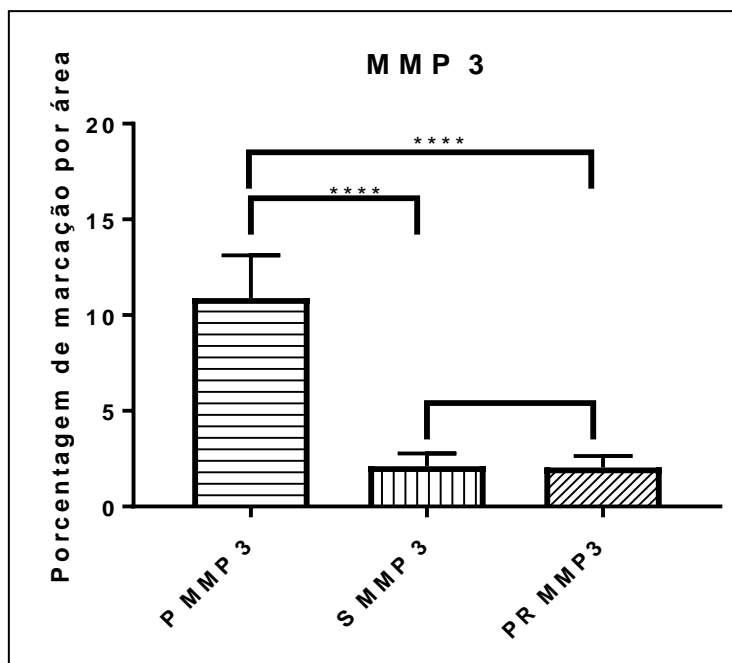


TABELA 3-COMPARAÇÃO DO GRUPO S VERSUS P PARA MMP13

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	S MMP13	P MMP13
Média	1,491	2,931
Variância	0,124832222	0,35641
Observações	10	10
Hipótese de diferença de média	0	
gl	15	
Stat t	-6,564182248	
P(T<=t) uni-caudal	4,48725E-06	
t crítico uni-caudal	1,753050356	
P(T<=t) bi-caudal	8,9745E-06	
t crítico bi-caudal	2,131449546	

TABELA 4-COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS PR PARA MMP13

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	P MMP13	PR MMP13
Média	2,931	1,414
Variância	0,35641	0,187671111
Observações	10	10
Hipótese de diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	6,503599012	
P(T<=t) uni-caudal	3,6375E-06	
t crítico uni-caudal	1,745883676	
P(T<=t) bi-caudal	7,275E-06	
t crítico bi-caudal	2,119905299	

GRÁFICO 2- INTENSIDADE DE IMUNOMARCAÇÃO DE MMP13

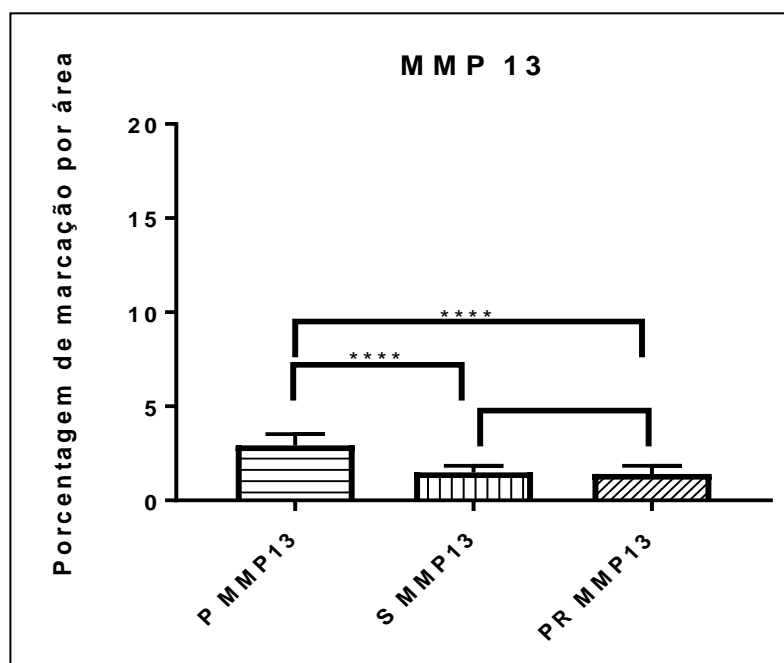


TABELA 5-COMPARAÇÃO DO GRUPO S VERSUS P PARA TIMP 1

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	S TIMP1	P TIMP1
Média	3,227	1,017
Variância	0,376467778	0,091734444
Observações	10	10
Hipótese de diferença de média	0	
gl	13	
Stat t	10,21352223	
P(T<=t) uni-caudal	7,03657E-08	
t crítico uni-caudal	1,770933396	
P(T<=t) bi-caudal	1,40731E-07	
t crítico bi-caudal	2,160368656	

TABELA 6-COMPARAÇÃO DO GRUPO P VERSUS PR PARA TIMP 1

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	P TIMP1	PR TIMP1
Média	1,017	3,032
Variância	0,091734444	0,189884444
Observações	10	10
Hipótese de diferença de média	0	
gl	16	
Stat t	-12,00726678	
P(T<=t) uni-caudal	1,01975E-09	
t crítico uni-caudal	1,745883676	
P(T<=t) bi-caudal	2,0395E-09	
t crítico bi-caudal	2,119905299	

GRÁFICO 3- INTENSIDADE DE IMUNOMARCAÇÃO DE TIMP 1

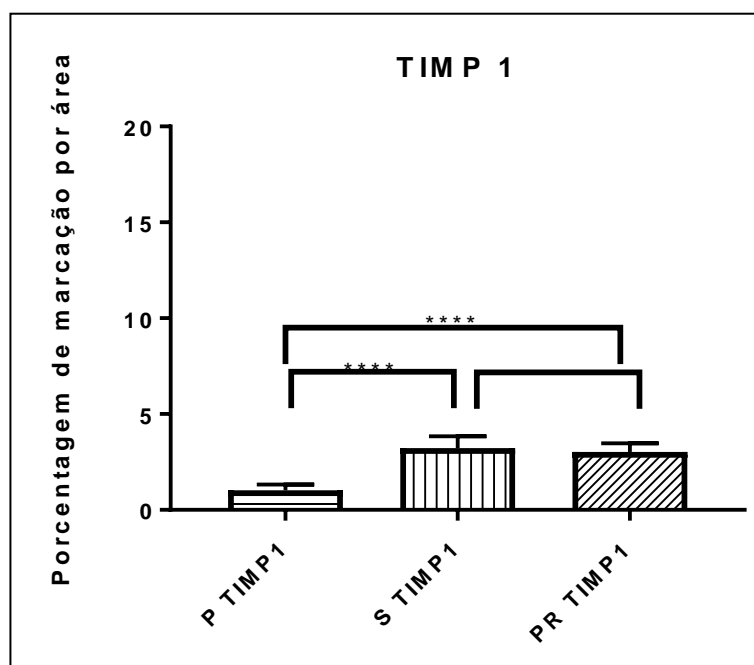


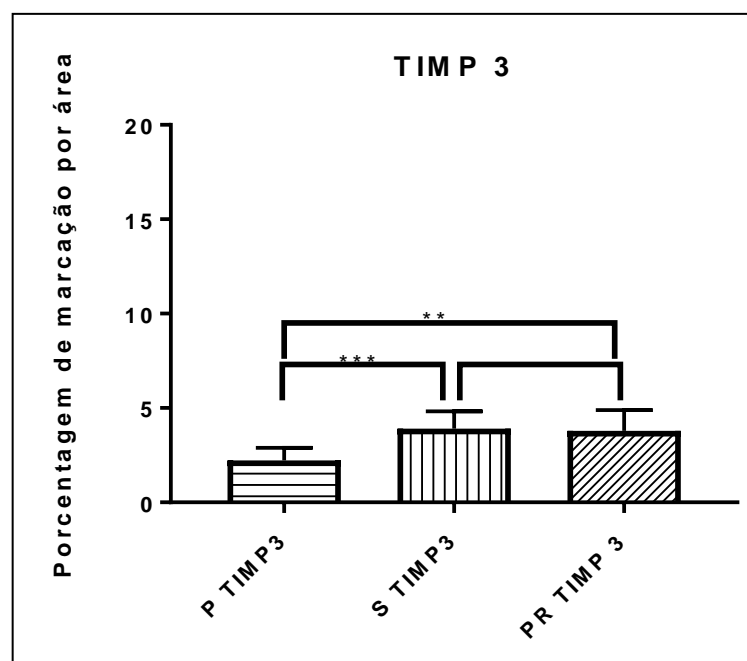
TABELA 7-COMPARAÇÃO DO GRUPO S VERSUS P PARA TIMP 3

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	S TIMP 3	P TIMP3
	4,82	2,15
Média	3,798888889	2,234444444
Variância	0,851136111	0,499002778
Observações	10	10
Hipótese de diferença de média	0	
gl	15	
Stat t	4,039170415	
P(T<=t) uni-caudal	0,000535294	
t crítico uni-caudal	1,753050356	
P(T<=t) bi-caudal	0,001070589	
t crítico bi-caudal	2,131449546	

TABELA 8-COMPARAÇÃO DO GRUPO PR VERSUS P PARA TIMP 3

Teste T: duas amostras com variâncias desiguais		
	PR TIMP 3	P TIMP 3
Média	3,901	2,14
Variância	0,860832222	0,631577778
Observações	10	10
Hipótese de diferença de média	0	
gl	18	
Stat t	4,558429902	
P(T<=t) uni-caudal	0,000121767	
t crítico uni-caudal	1,734063607	
P(T<=t) bi-caudal	0,000243534	
t crítico bi-caudal	2,10092204	

GRÁFICO 4- INTENSIDADE DE IMUNOMARCAÇÃO DE TIMP3



## 5 DISCUSSÃO

Estudos comparando a eficiência dos ácidos hialurônicos de diferentes pesos moleculares foram publicados nas últimas décadas. Os dados obtidos são discrepantes devido a seus resultados e modos de avaliação com leve predominância dos resultados positivos aos de maior peso molecular (LO, 2003). Na prática clínica tem-se dado preferência ao ácido hialurônico de alto peso molecular para o tratamento da osteoartrite com base em estudos como os realizados por Atamaz (2006); Wobig (1999), que utilizaram em pacientes com osteoartrite, comparando os ácidos hialurônicos de pesos moleculares diferentes com o placebo soro fisiológico, infiltrado na articulação, obtiveram resultados melhores com o uso dos ácidos hialurônicos de maior peso molecular; em critérios clínicos e não histológicos. Em meta-análise realizada por Altman (2015) esses dados também foram confirmados.

Entretanto segundo Karlsson (2002), que estudou ácidos hialurônicos de diferentes pesos moleculares em infiltrações intra-articulares em humanos com osteoartrite, não ocorreu diferença significativa entre os ácidos hialurônicos de pesos moleculares distintos em critérios clínicos e não histológicos. Em um trabalho de Bahar (2016) o peso molecular não foi um fator importante na melhora clínica dos pacientes submetidos à viscosuplementação de AH de diferentes pesos moleculares.

Estas controvérsias levaram a realização deste estudo onde se comparou o possível efeito condroprotetor de um hialuronato de alto peso molecular com outro de baixo peso. Para isto utilizou-se de um modelo experimental de osteoartrite.

O modelo experimental em pequenos animais, que mais se assemelha a osteoartrite presente no ser humano é a transecção do ligamento cruzado anterior no joelho de coelhos. Mimetiza as alterações morfológicas e bioquímicas observadas em seres humanos com osteoartrite (YOSHIMI, 1994). O coelho foi o animal escolhido devido ao fácil manejo, pelo menor custo e por ter vasta literatura ratificando seu uso para os fins de obtenção de osteoartrite induzida. A anatomia do joelho do coelho é de fácil dissecação e visualização do ligamento cruzado anterior; o

que facilita o procedimento cirúrgico de sua transecção (MOSKOWITZ, 1992; YOSHIOTA, 1996; SAH, 1997; LAVERTY, 2010).

O manejo com os animais e dissecação cirúrgica dos joelhos dos coelhos foi de fácil execução. A incisão da pele, a capsulotomia medial com visualização do ligamento cruzado anterior e sua transecção foram de modo rápido e prático. Inicialmente neste estudo os platôs dos joelhos submetidos a esse procedimento foram avaliados e apresentaram sinais de lesão macroscópica evidente; principalmente os do grupo controle P (placebo-SF 0,9%), demonstrando sinais de condroproteção dos AH em relação ao placebo, que para isto foi utilizada uma escala visual de graduação (ALBANO *et al.*, 2010).

Na sequência desse mesmo estudo foi realizada a análise histológica com colorações específicas para marcadores de proteoglicanos (Azul de Toluidina e Alcian Blue pH = 1.0 e Alcian Blue pH = 2.5), buscando uma avaliação mais precisa da suposta condroproteção atribuída aos AH. A preservação dos proteoglicanos nos grupos dos AHs foi superior ao grupo placebo, indicando uma menor destruição do tecido cartilaginoso. Os resultados confirmaram o estudo macroscópico, demonstrando propriedades de condroproteção dos AH, em relação ao placebo, porém sem alteração estatística significativa entre os AH de diferentes pesos moleculares (OLIVEIRA *et al.*, 2014). No presente estudo, para finalizar esse experimento que se iniciou em 2006, com a análise macroscópica (2010) e histológica (2014); os platôs foram analisados por métodos imuno-histoquímicos a dosagem de metaloproteases (MMP) seus inibidores (TIMP).

Os proteoglicanos são proteínas extracelulares ligadas a glicosaminoglicanos, estruturas que possuem um dos açúcares aminados e normalmente sulfatados. Tem a função de dar rigidez à matriz celular, resistindo à compressão e preenchendo espaços, sendo os principais componentes da cartilagem atraindo moléculas de água para o tecido. Regulam a passagem de moléculas no meio extracelular, podendo bloquear, ativar ou guiar a migração celular através da matriz celular. A baixa concentração dos proteoglicanos causa redução do volume tecidual cartilaginoso, por ser incapaz de atrair quantidade de moléculas de água suficiente; a diminuição de proteoglicanos também causa danos à cartilagem que acarretam o desenvolvimento de osteoartrite.

As metaloproteases (MMP) são uma família de enzimas proteolíticas dependentes do zinco que degradam os componentes da matriz extracelular como



os proteoglicanos e o colágeno e por consequência da estrutura cartilaginosa, por isso também chamadas de colagenases, já as enzimas Inibidoras Teciduais de Metaloproteases (TIMP) fazem um papel de inibição das metaloproteases, tendo um papel condroprotetor importante. Devido à importância das MMP e das TIMP na fisiologia da cartilagem e por ser um fator de avaliação na osteoartrite, a dosagem das MMP-3 e MMP-13, TIMP-1 e TIMP-3, as principais envolvidas na osteoartrite (MERO *et al.*, 2014); foram mensuradas.

A justificativa para realização da continuação do estudo imuno-histoquímico foi aprofundar o conhecimento metabólico da osteoartrite tentando elucidar suas relações com as principais MMPs e TIMPs envolvidas na fisiologia da cartilagem e se os pesos moleculares dos AHs diferem no fator de condroproteção.

No estudo o platô tibial medial foi escolhido por apresentar maior sobrecarga mecânica no joelho dos coelhos, assim como no joelho humano, esses platôs dissecados foram submetidos aos cortes histológicos e imunomarcados em um processo lento e meticuloso de imunomarcagem específica para as MMP-3 e MMP-13, TIMP-1 e TIMP-3.

A utilização do microscópio Zeiss Imager.Z2 Metasystems e do software Metafer Msearch permitiu o escaneamento das lâminas e a mensuração da intensidade de coloração das lâminas de tecido cartilaginoso dos coelhos.

A intensidade de coloração foi mensurada em cada uma das lâminas obtendo um número específico de cada amostra para os três grupos P (placebo), S (Synvisc®), PR (Polireumin®) nas duas MMPs e nas duas TIMPs dos três respectivos grupos, esses dados foram analisados separadamente e entre si, utilizando testes estatísticos específicos para a normalidade da amostra (Mann Whitney U test), média simples da amostra, testes de desvio padrão e o teste *t de Student* para análise de dois tipos diferentes de amostra.

Os dados encontrados estavam em conformidade com a literatura específica do assunto (SASAKI *et al.*, 2004) as MMP-3 e MMP-13, apresentaram valores de coloração aumentados no grupo P (placebo - SF 0,9%) e as TIMP-1 e TIMP-3 valores diminuídos em relação aos demais grupos, demonstrando uma atividade catabólica aumentada, ou seja, uma destruição cartilaginosa em andamento. Nos grupos S e PR foi encontrada uma diminuição na coloração específica das MMP-3 e MMP-13 e um aumento das enzimas inibidoras das metaloproteases TIMP-1 e TIMP-

3, sugerindo uma menor ação catabólica cartilaginosa. Com os dados encontrados evidencia-se uma ação condroprotetora dos AH.

Os valores numéricos da intensidade de coloração das MMP-3 e MMP-13 do grupo PR são maiores que os do grupo S e os valores de TIMP-1 e TIMP-3 são menores, demonstrando uma tendência de superioridade de condroproteção no grupo PR, porém ao comparar os valores de coloração encontrados nos grupos S e PR, não houve diferença estatística significativa na intensidade de coloração das lâminas imunomarcadas de MMPs e TIMPs dos joelhos infiltrados com ácido hialurônico de alto peso, com as de baixo peso molecular; portanto não se observou superioridade no aspecto condroprotetor de um AH de baixo peso em comparação com o de alto peso molecular.

A literatura comparando os diferentes pesos moleculares dos hialuronatos neste modelo experimental é escassa. Shimizu (1998) em um estudo realizado em coelhos, concluiu que os ácidos hialurônicos de baixo peso molecular foram superiores aos de maior peso molecular. Não se encontrou nesse estudo a dose utilizada nas infiltrações para melhor comparação com o presente estudo. Neste estudo utilizaram-se aplicações intra-articulares por três semanas como usualmente é feito em seres humanos, e o volume aplicado foi de 0,3 ml (KOBAYASHI *et al.*, 2000) que corresponde ao volume infiltrado na articulação metatarso-falangeana a qual apresenta dimensões próximas à articulação do coelho; das três substâncias testadas (ácido hialurônico nativo, ácido hialurônico ramificado e soro fisiológico 0.9%)

Ghosh e Guidolin (2002), utilizando modelo experimental de transecção do ligamento cruzado anterior em cães, obtiveram melhores resultados com os ácidos hialurônicos de menor peso molecular. Os mesmos autores em um estudo *in vitro* encontraram melhores resultados com o uso de ácido hialurônico de maior peso molecular, contrariando seus estudos em animais, pois seriam melhores estimuladores da produção de componentes da matriz celular, fato que poderia ser parcialmente explicado, pois o ácido hialurônico de menor peso molecular penetraria na matriz extracelular mais facilmente, maximizando sua concentração e promovendo sua interação com as células alvo da sinóvia. Além disso, há evidências de que a ligação das moléculas do ácido hialurônico com os receptores celulares é dependente do peso molecular.

Várias são as hipóteses do mecanismo de ação dos ácidos hialurônicos na articulação não patológica dos seres humanos. O ácido hialurônico funcionaria em uma das hipóteses como modulador através da interação com receptores CD44 presentes nos sinoviócitos, atuando bioquimicamente na articulação, diminuindo a produção de citocinas, prostaglandinas e metaloproteases (TAKESHITA, 1997). Outros efeitos comprovados do ácido hialurônico são de recuperar as propriedades fisiológicas do líquido sinovial, diminuir a pressão da força peso, melhor distribuição do peso exercido na articulação, portanto apresenta importante papel nos efeitos mecânicos articulares (PEYRON, 1993).

Resumindo, neste estudo os dados encontrados confirmam os achados de Karlsson (2002), que estudou os efeitos dos hialuronatos de diferentes pesos moleculares em infiltrações intra-articulares, em humanos com osteoartrite; que indica não haver diferenças quanto ao peso molecular dos ácidos hialurônicos em relação à condroproteção.

A pesquisa realizada apresentou as seguintes limitações: a não estimulação dos animais a marcha, os animais não estavam livres, restringindo a deambulação, a espessura menor da cartilagem do coelho em relação à espessura da cartilagem humana, o tempo entre o início da pesquisa e o sacrifício dos animais (12 semanas), não podendo confirmar um efeito em longo prazo dos resultados obtidos.

Na prática clínica o estudo tem como utilidade demonstrar o uso seguro e eficaz dos AH, independente do seu peso molecular, quanto a efeitos adversos e seu caráter condroprotetor na OA.

Esse estudo imuno-histoquímico de MMPs e TIMPs também é um complemento de uma linha de pesquisa onde foram realizados os estudos prévios, já publicados, da macroscopia dos platôs tibiais (ALBANO *et al.*, 2010) e a histologia dos platôs (OLIVEIRA *et al.*, 2014) com marcadores bioquímicos para proteoglicanos (Alcian Blue pH=1.0, Alcian Blue pH=2.5 e Azul de Toluidina) na cartilagem do coelho, corroborando aos anteriores no fator positivo de condroproteção dos AH e a indiferença quanto ao seu peso molecular.

No futuro a utilização de substâncias associadas ao AH nas infiltrações articulares como novos corticoides, hidrogéis, Sulfatos de Condroitina e Sulfato de Glicosamina injetáveis, algo que já é motivo de vários estudos clínicos publicados atualmente (MERO *et al.*, 2014; KARDELI *et al.*, 2015) melhorarão ainda mais a

eficácia dos AH, abrindo novas fronteiras para pesquisas experimentais de ciência básica.

## 6 CONCLUSÃO

A análise dos efeitos das substâncias ácido hialurônico nativo de baixo peso molecular e ácido hialurônico de cadeia ramificada de alto peso molecular, no modelo experimental de osteoartrite, em relação aos marcadores imunohistoquímicos de controle do catabolismo cartilaginoso demonstrou neste estudo caráter condroprotetor, quando comparado ao grupo controle.

Com relação ao ácido hialurônico de cadeia nativa de baixo peso molecular e o de cadeia ramificada de alto peso molecular ao serem comparados entre si, não houve diferença estatística significativa no fator condroprotetor.

## REFERÊNCIAS

AAOS - (American Association of Orthopaedics Surgeons), 2013. Disponível em: <[http://www.aaos.org/JAAOS/vol21/issue9/JAAOS\\_21\\_9\\_571/](http://www.aaos.org/JAAOS/vol21/issue9/JAAOS_21_9_571/)>. Acesso em: 20 jan 2017.

ADAMS, B. Y. *et al.* The role of viscosupplementation with hylan G-F 20 (Synvisc ®) in the treatment of osteoarthritis of the knee: a canadian multicenter trial. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 3, n.4, p. 213-225, 1995.

AIGNER, T.; MCKENNA L.: Molecular pathology and pathobiology of osteo- arthritic cartilage. **Cell Mol Life Sci**, v. 59, p. 5–18, 2002.

ALBANO, M. B. *et al.* Análise macroscópica dos efeitos dos hialuronatos e do corticoesteróides no tratamento da osteoartrose induzida em coelhos. **Rev Bras Ortop**, v.45, n.3, p.273-278, 2010.

ALTMAN, R. D. *et al.* Product Differences in Intra-articular Hyaluronic Acids for Osteoarthritis of the Knee. **Am J Sports Med**, v. 44, n. 8, p. 2158-2165, 2015.

ALTMAN RD, Moskovitz R. Intraarticular sodium hyaluronate in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. **J Rheumatol**, v. 25, n.11, p. 2203-12,1998.

ASARI A, M. S. *et al.* Molecular weight-dependent effects of hialuronate on the arthritic synovium. **Arch Histol Cytol.**, v. 61, n. 2, p.125-35, 1998.

ASKARI, A. *et al.* Hyaluronic acid compared with corticosteroid injections for the treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized control trail. **Springer Plus**. v. 5, p. 442-443, 2016.

ATAMAZ, F.; KIRAZLI, Y.; AKKOC, Y. A comparison of two different intraarticular hyaluronan drugs and physical therapy in the management of knee osteoarthritis. **Rheumatol Int.**, v. 26, n.10, p.873-8, 2006.

BALAZS, E. A.; DENLINGER, J. L. Viscosupplementation: a new concept in the treatment of osteoarthritis. **J Rheum.**, v 39, p.3-9, 1993.

BARAGI, V. M., et al. A new class of potent matrix metalloproteinase 13 inhibitors for potential treatment of osteoarthritis: Evidence of histologic and clinical efficacy without musculoskeletal toxicity in rat models. **Arthritis Rheum.** v. 60, p. 2008–2018, 2009.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL PREVENTION. **Osteoarthritis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/arthritis/basics/osteoarthritis.htm>>. Acesso em: 20 jan 2017

CHANG, D. G. et al. Osteoarthritis quantitation and localization of cartilage degeneration following the induction of osteoarthritis in the rabbit knee. **Osteoarthritis Cart**, v. 5, p. 357-372, 1997.

COIMBRA, F. X.; SAMARA, A. M.; COIMBRA, I. B. Estudo da associação entre o Índice de Massa Corpórea (IMC) e Osteoartrite (OA) de mãos. **Rev. Bras. Reumatol**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 206-211, 2004.

CONROZIER, T. et al. Intra articular injections of Hylan GF-20 reduce type 2 collagen degradation in patients with knee osteoarthritis: the biovisco study. **Ann Rheum Dis**, v. 204, n. 2, p.99-107, 2004.

COOPER, C. et al. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. **Arthritis Rheum**, v. 43, n. 5 ,p. 995-1000, 2000.

DAHL, L. B. et al. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronic in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. **Ann Rheum Dis**, v. 44, p. 817-822, 1985.

DIXON, J. S. *et al.* **Second-line agents in the treatment of rheumatic diseases.** Ney York: Dekker, 1992.

ELMORSY, S. *et al.* Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. **Osteoarthritis Cart**, v. 22, p. 121-127, 2014.

FELSON, D. T. *et al.* The effect of body weight on progression of knee osteoarthritis is dependent on alignment. **Arthritis Rheum**, v. 50, p. 3904–3909, 2004.

FORSEY, R. *et al.* The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4581-4590, 2006.

FRANSSON, L. Mammalian glycosaminoglycans. In: ASPINALL, G. (Ed.) **The Polysaccharides.** Saint Louis, MO: Academic Press, 1985. p 51-337.

FURTADO, R.; NATOUR, J. **Infiltrações no aparelho locomotor: técnicas para realização com e sem o auxílio de imagem.** Porto Alegre: Artmed, 2011.

GHOSH P.; GUIDOLIN D. Potential Mechanism of Action of Intra-articular Hyaluronan Therapy in Osteoarthritis: Are the Effects Molecular Weight Dependent? **Sem Arthritis Rheum** v. 32, n. 1, p. 10-37, 2002.

GIGIS, I., *et al.* Comparison of two different molecular weight intra-articular injections of hyaluronic acid for the treatment of knee osteoarthritis. **Hippokratia**, v. 20, n.1, p. 26-31, 2016.

GOMIS, A. *et al.* Effects of different molecular weight elastoviscous hyaluronan solutions on articular nociceptive afferents. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 1, p 314-326, 2004.

GOMIS, A. *et al.* Intra-articular injections of hyaluronan solutions of different elastoviscosity reduce nociceptive nerve activity in a model of osteoarthritic knee joint of the guinea pig. **Osteoarthritis Cart**, v. 17, n. 6, p. 798-804, 2009.



HAAKE, S. K. *et al.* Microbiologia da doença periodontal. In: NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; CARRANZA, F. A. **Periodontia clínica de Carranza**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap.6, p.86-100.

HENROTIN, Y. *et al.* Consensus statement on viscosupplementation with hyaluronic acid for the management of osteoarthritis. **Semin Arthritis Rheum**. v. 45, n. 2, p. 140-149, 2015.

HOCHBERG, M. C. Osteoarthritis year 2012 in review: clinical. **Osteoarthritis Cart**, v. 20, n. 12, p. 1465–1469, 2012.

HULMES, D. J. *et al.* Intra-articular hyaluronate in experimental rabbit osteoarthritis can prevent changes in cartilage proteoglycan content. **Osteoarthritis Cart**. v. 12, n. 3, p. 232-238, 2004.

IBGE. Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação. 2017. Disponível em: <[www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/](http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/)>. Acesso em 20 jan. 2017.

JEVSEVAR, D. S, *et al.* The American Academy of Orthopaedic Surgeons evidence-based guideline on: treatment of osteoarthritis of knee, 2<sup>nd</sup> edition. **J Bone Joint Surg Am**, v. 2, n. 95, p. 1885-1886, 2013.

JÜNI, P. *et al.* Efficacy and safety of intraarticular hylan or hyaluronic acids for osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 11, p. 3610-3619, 2007.

KARLSSON, J.; SJÖGREN, L. S.; LOHMANDER, L. S. Comparison of two hyaluronan drugs and placebo in patients with knee osteoarthritis. A controlled, randomized, double-blind, parallel-design multicenter study. **Rheumatology**, v. 41, n. 11, p. 1240-1248, 2002.

KARDELI, S. *et al.* Efficacy study of two novel hyaluronic acid-based formulations for

viscosupplementation therapy in an early osteoarthrotic rabbit model. **L. Eur J Pharm Biopharm** , v. 96, p. 388-395, 2015.

KLEEMANN, M. *et al.* Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: relation to clinical assessment (ICRS Grade). **Osteoarthritis Cart**, v. 13, n. 11, p. 958-963, 2005.

KURODA, T. *et al.* Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis. **J Med Sci**, v. 116, n. 2, p. 107-114, 2001.

KURTZ, S. *et al.* Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. **J Bone Joint Surg Am.** v. 89, p. 780–785, 2007.

LAJEUNESSE, D. *et al.* Hyaluronic acid reverses the abnormal synthetic activity of human osteoarthrotic subchondral bone osteoblasts. **Bone**, v. 33, n. 4, p. 703-710, 2003.

LAVERTY, S. *et al.* The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. **Osteoarthritis Cart**, Suppl 3, v. 18, p. S53-S65, 2010.

LIN, W. *et al.* Patterns of Hyaluronan Staining Are Modified by Fixation Techniques. **J Histochem Cytochem**, v. 45, n. 8, p. 1157-1163, 1997.

LO, G. *et al.* Intra-articular hyaluronic acid in treatment of knee osteoarthritis: a meta-analysis. **JAMA**, v. 290, n. 23, p. 3115-3121, 2003.

LOESER, R. F. Aging and Osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 23, n. 5, p. 492-496, 2011.

LOMBARD, C. *et al.* Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. **Biochimie**, v. 87, p. 265–272, 2005.

LOTZ, M. Osteoarthritis year 2011 in review: biology. **Osteoarthritis Cart**, v. 20, n. 3, p. 192-196, 2011.

MERO, A. *et al.* A Hyaluronic acid-salmon calcitonin conjugate for the local treatment of osteoarthritis: Chondro-protective effect in a rabbit model of early OA. **J Contolled Relea**, v. 187, p. 30-38, 2014.

MOSKOWITZ, R. W. Experimental models of osteoarthritis. In: MOSKOWITZ R.W (Ed.) *et al.* **Osteoarthritis**: diagnosis and medical/surgical management. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 213-252.

NABESHIMA, K. *et al.* Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathol Intern**, v. 2, p. 255-64, 2002.

NAITO, K. *et al.* Evaluation of the effect of glucosamine on an experimental rat osteoarthritis model. **Life Sciences**, v. 86, n. 13/14, p. 538–543, 2010.

NEOGI, T.; ZHANG, Y. Osteoarthritis Prevention. **Curr Opin Rheumatol**, v. 23, n. 2, p. 185–191, 2011.

NISBET, H. O. *et al.* Evaluation of bee venom and hyaluronic acid in the intra-articular treatment of osteoarthritis in an experimental rabbit model. **Res Vet Sci**. v.29. n. 93, p. 488-493, 2012.

OLIVEIRA, M. Z. *et al.* Efeito dos ácidos hialurônicos como condroprotetores em modelo experimental de osteoartrose. **Rev Bras Ortop**, v. 49, n.1, p. 62-68, 2014.

PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; MALEMUD, C. J. Canine osteoarthritis: effects of endogenous neutral metalloproteases on articular cartilage proteoglycans. **J Orthop Res.**, v. 6, n. 3, p. 379-388, 1988.

PRIETO, J. G. *et al.* Comparative study of hyaluronic derivatives: rheological behavior, mechanical and chemical degradation. **Int J Biol Macromol.**, v. 35, n. 1/2, p. 43-49, 2005.

PEYRON, J. G. Intra-articular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis: state-of-the-art review. **J Rheumatol**, v. 20, Suppl. 39, p. 10-15, 1993.

REZENDE, U. M., *et al.* Tratamento medicamentoso da osteoartrose do joelho. **Rev. Bras. Ortop.** v.44, n. 1, p. 14-19, 2009.

REZENDE, U. M.; CAMPOS, C. G. Viscosuplementação. **Rev. Bras. Ortop.** v. 47, n. 2, p. 160-164, 2012.

RIVERA, F. *et al.* Effectiveness of intra-articular injections of sodium hyaluronate-chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: a multicenter prospective study. **J Orthop Traumatol**, v.17, n. 1, p. 27-33, 2016.

ROQUE, V. *et al.*, Managing knee osteoarthritis: efficacy of hyaluronic acid injections. **Acta Reumatol Port.** v. 38, n. 3, p.154–161, 2013.

RUNDHAUG, J. E. *et al.* Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer. **Clin Cancer Res.** v. 9, p. 551-554, 2003.

SAH, R. L. *et al.* Physical properties of rabbit articular cartilage after transaction of the anterior cruciate ligament. **J Orthop Res**,v.15, n. 2, p. 197-203, 1997.

SASAKI, A. *et al.* Hyaluronate inhibits the interleukin -1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase MMP -1 and MMP-3 in human synovial cells. **Tohoku J Exp Med**, v. 204, n. 2, p. 99-107, 2004.

SCHIAVINATO, A. *et al.* Comparison of the effects of intra-articular injections of Hyaluronan and its chemically cross-linked derivative. **Clin. Exp. Rheumatol**,v. 20, n. 4, p. 445-454, 2002.

SCHMITZ, N. *et al.* Basic methods in histopathology of joint tissues. **Osteoarthritis Cart**, Suppl.3, p. S113-S116, 2010.

SHIMIZU, C. *et al.* Histomorphometric and biochemical effects of various hyaluronans on early osteoarthritis. **J Rheumatol.**, v. 25, n. 9, p.1813-1819, 1998.

SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; SALO, T. Matrix metalloproteinases in oral diseases. **Oral Diseases.** v. 10, p. 311-318, 2004.

SOUZA, D. V. *et al.* Exercícios físicos e osteoartrose: uma revisão sistemática. **Fisioter. Mov.**, v. 26, n. 1, 193-202, 2013.

STEVENSON, J. D.; ROACH, R. The benefits and barriers to physical activity and lifestyle interventions for osteoarthritis affecting the adult knee. **J. Orthop. Surg. Res.**, v. 7, p.15-21, 2012.

TAKAHASHI, K. *et al.* The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. **Osteoarthr. Cart.**, v. 7, p.182-190, 1999.

TAKESHITA, S. *et al.* The in vitro effect of hyaluronic acid on IL-1 $\beta$  production in cultured rheumatoid synovial cells. **Biomed Res**, v. 18, n. 3, p. 94-187, 1997.

TANAKA, S. *et al.* Factors Related to Degradation of Articular Cartilage in Osteoarthritis: A Review. **Sem Arthritis Rheum**, v. 27, n. 6, p. 392–399, 1998.

VIGNON, E. *et al.* Hypertrophic repair of articular cartilage in experimental osteoarthrosis. **Ann Rheum Dis**, v. 42, n. 1, p.82-88, 1993.

WAHL, L. M.; CORCORAN, M. L. Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. **J. Periodontol.**, v. 64, p. 467-473, 1993.

WANG, C. T. *et al.* Therapeutic effects of hyaluronic acid on osteoarthritis of the knee. **J Bone Joint Surg Am**, v. 86, n. 3, p. 538-545, 2004.

WANG, C. T. *et al.* High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. **Osteoarthritis Cart**, v. 14, n. 1, p. 47-1237, 2006.

WOBIG, M. *et al.* Viscosupplementation with hylan G-F20: a 26 week controlled trial efficacy and safety in the osteoarthritis knee. **Clin Ther**, v. 20, n. 3, p.410-423, 1998.

WOBIG, M. *et al.* The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan G-F20 and a lower-molecular-weight hyaluronan. **Clin Ther**, v. 21, n. 9, p. 1549-1562, 1999.

YASUDA, T. Hyaluronan inhibits prostaglandin E2 production via CD44 in U937 human macrophages. **Tohoku J Exp Med**, v. 220, n. 3, p. 229-235, 2010.

YOSHIMI, T. *et al.* Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthrosis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. **Clin Orthop Relat Res**, v. 298, p. 296-304,1994.

YOSHIOKA, M. *et al.* Cartilage Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. **Osteoarthritis Cart**, v. 4, n. 2, p. 87-98, 1996.

ZHANG, W. *et al.* OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. **Osteoarthritis Cart**, v.18, p. 476-499, 2010.