

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELLO ZAIA OLIVEIRA

**EFEITO DOS ÁCIDOS HIALURÔNICOS COMO CONDROPROTETORES EM
MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE**

CURITIBA

2013

MARCELLO ZAIA OLIVEIRA

**EFEITO DOS ÁCIDOS HIALURÔNICOS COMO CONDROPROTETORES EM
MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE**

Dissertação 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 Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Munhoz da Cunha

Coorientador: Dr. Mauro Batista Albano

CURITIBA

2013

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. Antonio Carlos Ligoeki Campos coordenador da pós-graduação da UFPR, pela oportunidade.

Ao Dr. Mário Massatomo Namba sempre amigo.

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 aos meus filhos Vítor e Bruno que me ensinam diariamente o verdadeiro amor e justificam o porquê do meu esforço.

*Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes.
É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu,
enquanto que as cheias a baixam para a terra, sua mãe.*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Título: Efeito dos ácidos hialurônicos como condroprotetores em modelo experimental de osteoartrose. **Introdução:** O tratamento medicamentoso da osteoartrose tem obtido um avanço significativo nas últimas décadas. Medicações 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. **Objetivo:** Analisar os efeitos do ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo experimental de osteoartrose em coelhos. **Material e Métodos:** 44 coelhos da raça *California*, machos, foram alocados de modo aleatório em três grupos (PR-S-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 (Polireumin®) grupo PR, ácido hialurônico de cadeia ramificada (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 Alcian Blue pH = 1.0, Alcian Blue pH = 2.5 e Azul de Toluidina para pesquisa da quantidade de proteoglicanos. A intensidade de coloração foi quantificada em um aparelho de microscopia Zeiss Imager.Z2 Metasystems e analisadas pelo software Metafer Msearch. **Resultado:** O efeito condoprotetor 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, sem diferença estatística com relação aos diferentes pesos moleculares.

Palavras-chaves: Osteoartrose; Ácido hialurônico; Ligamento Cruzado Anterior; Joelho; Coelhos.

ABSTRACT

Title: Evaluation of the action of substances chondroprotetors in experimental osteoarthritis. **Introduction:** Drug treatment of osteoarthritis has achieved significant progress in recent decades. Chondroprotetors medications such as hyaluronic acid are used in intra-articular increasingly in medical practice. However, there are controversies about the use of this treatment method. **Objective:** To analyze the effects of hyaluronic acid of different molecular weights in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. **Material and Methods:** Forty-four rabbits male California were divided randomly into three groups and underwent resection of the anterior cruciate ligament in his right knee. After three weeks of the surgical procedure began three weekly intra-articular injections of hyaluronic acid native (Polireumin ®) group PR, hyaluronic acid branched chain (Synvisc ®) group S and 0.9% saline group P. All animals were sacrificed after twelve weeks of surgery and tibial plateau infiltrated the knees were dissected. Histological cartilage of the support areas of the tibial plateaus were stained with Alcian Blue pH 1.0, Alcian Blue pH = 2.5 and toluidine blue for research on the amount of proteoglycans. The intensity of staining was quantified on a Zeiss microscope apparatus Imager.Z2 MetaSystems and analyzed by software Metafer Msearch. **Results:** The effect of chondroprotetor hyaluronic acids used in the study were confirmed when compared to the control group, but the comparison made between them, there was no statistically significant difference regarding chondroprotetion. **Conclusion:** The hyaluronic acids tested had chondroprotective effect, with no statistical difference with regard to the different molecular weights.

Key Words: Osteoarthritis, Hyaluronic Acid; Anterior Cruciate Ligament, Knee; Rabbits.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – FOTOGRAFIA INCISÃO CUTÂNEA E CAPSULOTOMIA.....	10
FIGURA 2 – FOTOGRAFIA DA EXPOSIÇÃO DO LCA.....	11
FIGURA 3 – FOTOGRAFIA DA SUTURA DA PELE.....	11
FIGURA 4 – FOTOGRAFIA DOS FRASCOS CONTENDO OS PLATÔS TIBIAIS....	12
FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 1.0.....	13
FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 2.5.....	13
FIGURA 7 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM AZUL DE TOLUIDINA.....	14
FIGURA 8 - FOTOGRAFIA APARELHO MICROSCOPIA UTILIZADO PESQUISA..	15
FIGURA 9 - FOTOGRAFIA DO SOFTWARE EM OPERAÇÃO.....	15
FIGURA 10 - FOTOGRAFIA DO SOFTWARE METAFER 4.....	16
FIGURA 11 - FOTOMICROGRAFIA CORTE HISTOLÓGICO CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 1.0 – Synvisc®.....	20
FIGURA 12 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 2.5 - Synvisc®.....	21
FIGURA 13 - FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM AZUL DE TOLUIDINA - Synvisc®.....	21
FIGURA 14 - FOTOMICROGRAFIA CORTE HISTOLÓGICO CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 1.0 – Polireumin®.....	22
FIGURA 15 - FOTOMICROGRAFIA CORTE HISTOLÓGICO CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 2.5 - Polireumin®.....	22

FIGURA 16 - FOTOMICROGRAFIA CORTE HISTOLÓGICO CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM AZUL DE TOLUIDINA - Polireumin®.....	23
FIGURA 17 - FOTOMICROGRAFIA CORTE HISTOLÓGICO CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 1.0 – Placebo.....	23
FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIA CORTE HISTOLÓGICO CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 2.5 – Placebo.....	24
FIGURA 19 – FOTOMICROGRAFIA CORTE HISTOLÓGICO CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM AZUL DE TOLUIDINA – Placebo.....	24
GRÁFICO 1 – COLORAÇÃO ALCIAN BLUE pH = 1.0.....	25
GRÁFICO 2 – COLORAÇÃO ALCIAN BLUE pH = 2.5.....	26
GRÁFICO 3 – COLORAÇÃO AZUL DE TOLUIDINA.....	26
GRÁFICO 4 – NOTAS DO ALCIAN BLUE pH = 2.5.....	27
TABELA 1 - NÚMEROS DA QUANTIFICAÇÃO DO AZUL DE TOLUIDINA.....	17
TABELA 2 - ANÁLISES DO TESTE T DE STUDENT DA TABELA 1.....	18
TABELA 3 – NÚMEROS QUANTIFICAÇÃO ALCIAN BLUE pH= 1.0.....	18
TABELA 4 – NÚMEROS QUANTIFICAÇÃO ALCIAN BLUE pH= 2.5.....	18
TABELA 5 – TESTE DE t DE STUDENT DA TABELA 4.....	19
TABELA 6 – DADOS CATEGÓRICOS DA ANÁLISE ALCIAN BLUE pH=2.5.....	19

LISTA DE ABREVIATÖES E SÍMBOLOS

Kg = quilograma

mg = miligrama

ml = mililitro

µg = micrograma

O.A. = osteoartrose

H.A. = ácido hialurônico

Da = Dalton

IM = intramuscular

UI = unidade

°C = grau Celsius

Na = sódio

n° = número

LCA = Ligamento cruzado anterior

UFPR = Universidade Federal do Paraná

AINH = anti-inflamatório não hormonal

FDA = Food and Drug Administration

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVO	2
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	OSTEOARTROSE	3
2.2	ÁCIDOS HIALURÔNICOS	5
2.3	MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE	6
2.4	COLORAÇÕES ESPECÍFICAS	8
3	MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	9
3.2	MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE	9
3.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	10
3.4	PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO HISTOLÓGICA	12
3.5	ANÁLISES HISTOLÓGICAS E ESTATÍSTICAS	14
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Osteoartrose (AO) é a afecção articular mais comum e é uma doença definida por alterações estruturais específicas da articulação, incluindo degradação focal da cartilagem articular e remodelamento do osso subcondral com formação de osteófitos nas margens da articulação. 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). Recentemente estimativas indicaram um aumento na prevalência de osteoartrose com cerca de 27 milhões de adultos nos Estados Unidos da América com idade superior a 25 anos apresentando sinais clínicos de osteoartrose 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 Estados Unidos possui osteoartrose definida por radiografia (NEOGI; ZHANG, 2011). Pelo seu alto custo sócio-econômico, pesquisas relacionadas à osteoartrose são essenciais em todos os níveis de intervenções e patogêneses (STEVENSON; ROACH, 2012).

A OA é o resultado de vários fatores na disfunção articular e caracteriza-se por degeneração da cartilagem e simultânea proliferação de tecido ósseo, cartilaginoso 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 AH, um polissacarídeo da família dos glicosaminoglicanos, contribui para a homeostase da articulação normal e apresenta-se em menor concentração e com peso molecular diminuído no líquido sinovial, nas articulações com osteoartrose (YOSHIMI *et al.*, 1994; SCHIAVINATO *et al.*, 2002). 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 pelos sinoviócitos, prevenindo a degradação de proteoglicanos e fibras de colágeno da matriz extracelular. 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 osteoartrose, mas também a sua interferência na progressão da degeneração articular (YOSHIMI *et al.*,1994; HULMES *et al.*,2004).

Considerando a abrangência e as implicações da OA do joelho, compreende-se atualmente a importância do diagnóstico e tratamento em suas fases iniciais, de maneira a minimizar suas consequências (COOPER *et al.*, 2000). Por não haver até o presente momento intervenções que sejam capazes de inibir sua evolução, sobressaem às opções que permitem a redução da sua progressão. Injeções intra-articulares de diferentes tipos de AH poderiam ser utilizadas com essa finalidade.

Para avaliar os efeitos destas substâncias na gonartrose, se propôs nesta pesquisa a utilização de um modelo experimental de OA que se assemelha àquela observada na espécie humana. A secção do ligamento cruzado anterior (LCA) do joelho de coelhos (soldra) mimetiza as alterações morfológicas e bioquímicas observadas na osteoartrose humana, o que permite 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 osteoartrose em joelhos de coelhos.
- Comparar a ação condroprotetora dos ácidos hialurônicos de diferentes pesos moleculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OSTEOARTROSE

A OA tem etiologia multifatorial sendo o resultado de eventos mecânicos e biológicos que desestabilizam o equilíbrio normal de síntese e degradação de condrocitos da cartilagem articular, matriz extracelular e osso subcondral. Fatores genéticos, metabólicos, do desenvolvimento e mecânicos têm um papel importante no desenvolvimento da osteoartrose. O resultado final da degeneração é a perda de cartilagem articular com exposição do osso subcondral, resultando em dor, deformidade, perda de movimento e decréscimo de função com piora na qualidade de vida (TANAKA *et al.*, 1998).

Meta-análises recentes para os fatores de risco de OA de joelho reportaram que os riscos mais consistentes para a doença são: idade, obesidade, lesão prévia de joelho, sexo feminino e a presença de osteoartrose de mão. Outros fatores de risco incluem frouxidão ligamentar, alteração na geometria articular e sobrecarga mecânica crônica. O aumento do número de idosos e a epidemia da obesidade também contribuem para a progressão da incidência de osteoartrose (LOESER, 2011).

Estudos mostram que o aumento da rigidez mecânica do tecido durante o processo degenerativo decorre devido a mudanças na composição e na integridade da cartilagem. Os principais constituintes que afetam as propriedades mecânicas da cartilagem são índice de água, integridade do colágeno e a quantidade dos glicosaminoglicanos. Observa-se diminuição do índice de água com a progressão da osteoartrose devido à perda de integridade da rede de colágeno e diminuição da taxa de síntese de proteoglicanos, levando a degeneração da matriz extracelular e a irregularidades superficiais na cartilagem articular nos estágios iniciais da doença. Nos estágios avançados, observam-se fissuras profundas, desorganização da matriz e erosões profundas na cartilagem (KLEEMANN *et al.*, 2005).

Os sintomas da osteoartrose citados anteriormente incluem: dor, rigidez articular, deformidade e perda de função. A dor, principal sintoma, piora com a movimentação e ao final da tarde e em estágios mais avançados pode haver dor ao repouso (COIMBRA, F.X. SAMARA, A. M; COIMBRA, I. B., 2004). O tratamento da osteoartrose inclui o tratamento não farmacológico, farmacológico e cirúrgico. O tratamento não farmacológico inclui fisioterapia, perda de peso e diminuição das atividades com alto impacto na articulação (STEVENSON; ROACH, 2012). O tratamento farmacológico da osteoartrose 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 biológicos. O sulfato de condroitina e de glicosamina são considerados drogas sintomáticas de ação lenta e apesar de existir recomendações para seu uso ainda há controvérsia sobre sua eficácia. Os anti-inflamatórios não esteroidais continuam sendo usados no tratamento sintomático de pacientes com osteoartrose, 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 muitos efeitos colaterais sistêmicos ao serem utilizados por longos períodos. Infiltrações intra-articulares com corticoesteróides bloqueiam os 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). A dulcexetina, um agente de ação central, inibidor da recaptção de serotonina e norepinefrina foi aprovado pelo FDA para o tratamento de dor crônica de osteoartrose em 2010 e pode ser usado como adjuvante na terapia para dor em pacientes com resposta inadequada aos AINE's. Agentes biológicos, como anticorpos monoclonais, entre eles o Tanezumab e o Adalimumab, estão sendo estudados quanto a seus efeitos colaterais e eficácia. (HOCHBERG *et al.*, 2012).

2.2 ÁCIDOS HIALURÔNICOS

O ácido hialurônico é um polissacarídeo de alta viscosidade naturalmente produzido nas células B da membrana sinovial. É uma estrutura extremamente grande (3-30 μm), é um glicosaminoglicano não sulfatado e não ramificada, composto de unidade repetidas de dissacarídeo N-acetil-glucosamina e ácido glucurônico ligado através de sua posição 1-4 do anel de amina. Grupos de hidroxila de oxigênio no glucuronil-1 e glucosamina-3 são usados para polimerização adicional nas unidades de dissacarídeos formando o ácido hialurônico (FRANSSON *et al.*, 1985).

Estudos de laboratório indicam que a atividade condroprotetora do ácido hialurônico não são dependentes apenas de maiores concentrações utilizadas, mas também de seu maior peso molecular, pois seu papel seria mais eficaz na viscosuplementação (PEYRON *et al.*, 1993; ASARI *et al.* 1998; WANG *et al.*, 2006). O ácido hialurônico se liga em receptores específicos chamados cluster CD-44 e proteínas de ligação como agrecan e versican. Um dos mecanismos de ação do ácido hialurônico indica que as células sinoviais do tipo B podem detectar no ambiente articular a concentração extracelular de ácido hialurônico e traduzir essa informação para expressão de genes que conduzem a síntese de novo ácido hialurônico (YASUDA *et al.*, 2010; REZENDE U.M.,CAMPOS C.G., 2012). Além dos efeitos mecânicos de promover melhor distribuição de forças, diminuir a pressão do peso e recuperar as propriedades reológicas do líquido sinovial, o ácido hialurônico também atua bioquimicamente diminuindo as expressões gênicas das citocinas, diminuindo assim a produção de prostaglandinas. Sua presença estimula maior produção de ácido hialurônico pelos sinoviócitos, tem efeitos analgésicos, diminuindo 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 agrecans pelo condrócito; além de diminuir a degradação de colágeno tipo 2 (WANG *et al.*, 2006; TAKESHITA *et al.*, 1997; GOMIS *et al.*,2004, GOMIS *et al.*,2009).

Para melhorar a função biomecânica, diferentes ácidos hialurônicos foram desenvolvidos para injeção intra-articular. Apesar de o produto injetável ser

renovado na articulação em menos de 24 horas, os benefícios do tratamento de um ciclo podem durar alguns meses. Para explicar essa ação prolongada, diferentes mecanismos foram discutidos, incluindo a simulação da criação de nova síntese sinovial, supressão da degradação da matriz cartilaginosa e supressão da resposta inflamatória da interleucina 1 (JÜNI *et al.*, 2007). O ácido hialurônico é utilizado há aproximadamente trinta anos na prática clínica, mas seu verdadeiro mecanismo de ação ainda é controverso, está presente na pele, humor vítreo, cartilagem, cordão umbilical; e seu maior reservatório é o líquido sinovial das articulações diartrodiais cuja concentração é de 0,5-4,0 mg/ml. Confere excepcional viscoelasticidade e propriedades de lubrificação, principalmente ao impacto (WOBIG *et al.*, 1998; GOSH e GUIDOLIN, 2002; HULMES *et al.*, 2004). Uma das características do ácido hialurônico é reduzir o desgaste e o atrito da cartilagem durante o movimento articular e estabilizam a articulação nos movimentos de baixa cinética. Auxilia na nutrição articular e na eliminação de metabólicos em mecanismos osmóticos. Muitos estudos foram publicados nos últimos anos comparando diferentes ácidos hialurônicos com diversos resultados (WOBIG *et al.*, 1999; KARLSSON, J.; SJÖGREN, L.S.; LOHMANDER, L.S., 2002; ATAMAZ *et al.*, 2006).

2.3 MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE

A osteoartrose em seres humanos é geralmente uma doença com progressão lenta e seu início não tem uma definição exata, os estágios iniciais da doença apresentam dificuldade em seu estudo. Por isso, houve necessidade de um modelo animal apropriado que pudesse reproduzir a doença, considerando capacidade de lidar com o animal, quantidade de tecido para estudo e custo. Vários modelos para osteoartrose em coelho foram descritos e revisados. Técnicas diversas utilizadas ao longo dos anos incluíam imobilização das articulações, intervenções cirúrgicas de desestabilização da estrutura da articulação, injeção intra-articular de diversas substâncias e denervação de membro (YOSHIOKA *et al.*, 1996). Nos últimos anos, modelos com instabilidade cirurgicamente induzida de osteoartrose foram frequentemente usados para estudar a eficácia terapêutica de compostos focados

para o tratamento de osteoartrose, pois o procedimento induz lesões cartilaginosas similares às aquelas observadas em seres humanos com osteoartrose (LAVERTY *et al.*, 2010).

Os primeiros modelos de osteoartrose cirurgicamente induzidos no coelho envolveram a secção do ligamento colateral medial, menisco medial e ambos os ligamentos cruzados na articulação femorotibial. Os autores observaram morte precoce de condrócitos, inicialmente na zona superficial da cartilagem, que depois progrediu para fissuras, erosão e esclerose no osso subcondral. Desde então, o procedimento vem sendo refinado para reduzir a morbidade dos animais e freqüentemente envolve ou meniscectomia parcial, meniscectomia total ou somente transecção do ligamento cruzado anterior, primeiro descrito por Vignon *et al.*, (1983). O primeiro induz formas mais leves da doença, incluindo fissuras sem perda de espessura completa da cartilagem. Com o modelo de transecção do ligamento cruzado anterior, as lesões histológicas são mais extensas do que aquelas observadas em meniscectomia e incluem erosão de profundidade completa da cartilagem. (LAVERTY *et al.*, 2010).

Transecção do ligamento cruzado anterior para indução da degeneração cartilaginosa vem sendo usado em vários modelos animais para osteoartrose. O modelo foi inicialmente desenvolvido e subseqüentemente utilizado em cães. Após, foi utilizado em coelhos e apresentou evidências de graduais e progressivas mudanças na morfologia, histopatologia e bioquímica da cartilagem articular do joelho operado. Este modelo vem sendo usado em intervenções terapêuticas e têm relevância clínica particular, a partir do fato que representa um dos melhores modelos para o desenvolvimento de osteoartrose em pequenos animais (YOSHIMI *et al.*, 1994; YOSHIOKA *et al.*, 1996; CHANG *et al.*, 1997). No estudo de Albano *et al.*, (2010) com modelo experimental de osteoartrose em coelhos utilizando ácidos hialurônicos de diferentes pesos moleculares, foi encontrado sinais evidentes de osteoartrose na avaliação macroscópica desses animais.

2.4 COLORAÇÕES ESPECÍFICAS

Na matriz pericelular a pouca quantidade de colágeno e abundante de proteoglicanos, que são corados em azul pelo Alcian Blue. Quando ocorre algum tipo de agressão à cartilagem, há um breve período de atividade mitótica, devido à migração celular, liberação de fatores de crescimento e estímulo a vascularização. Assim, ocorre proliferação celular resultando em pequenos grupamentos de condrócitos chamados clones. O achado histológico de clones representa grupamentos celulares que refletem uma resposta reparativa dos condrócitos frente a lesão tecidual. A calcificação distrófica é a resultante de distúrbios nutricionais ou de necroses teciduais (PRIETO *et al.* 2005).

O Azul de Toluidina é um corante catiônico que cora tanto proteoglicanos quanto glicosaminoglicanos e foi comprovada sua ação de corar a cartilagem intensamente, pois possui uma grande afinidade para o enxofre da cartilagem (SCHMITZ *et al.*, 2010). Já foi utilizado com sucesso em estudos histológicos de cartilagem de joelhos de ratos e de coelhos (SHIMIZU *et al.*, 1998; NAITO *et al.*, 2010; KURODA *et al.*, 2011; SCHMITZ *et al.*, 2010). O Alcian Blue pH =1.0 e pH = 2.5 são conhecidos por corar condrócitos em sua volta e na matriz imediatamente ao redor. Há grande associação entre a coloração do Alcian Blue com ácidos mucopolissacarídeos e com a síntese de sulfato de condroitina na cartilagem, desta forma sendo encontrado onde ácidos mucopolissacarídeos sulfatados são formados. Esta coloração fica menos intensa à medida que há degeneração de cartilagem (COLLINS; MCELLIGOT, 1960; LIN *et al.*, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR avaliou e aprovou o protocolo de pesquisa utilizado neste trabalho (Registro CEP/SD: 001.004 SI 06-06).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE

Este experimento foi desenvolvido no biotério do curso de pós-graduação 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, 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 ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade e nível de ruído mantido estáveis, com o peso médio de (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 apenas como padronização do experimento. O procedimento cirúrgico consistiu de anestesia pré-operatoriamente 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 semimembranáceo 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 2,2mg/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 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).

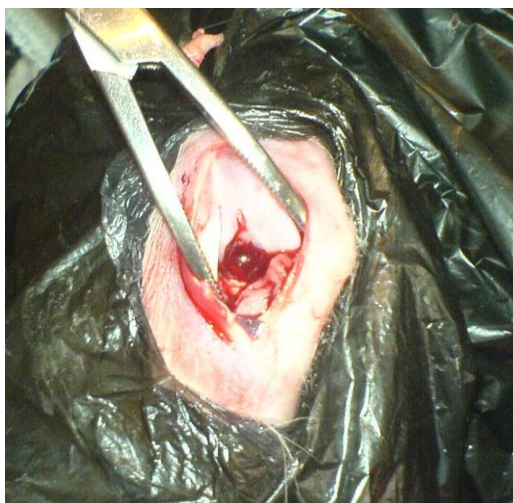


FIGURA 1 - FOTOGRAFIA DA INCISÃO CUTÂNEA E CAPSULOTOMIA

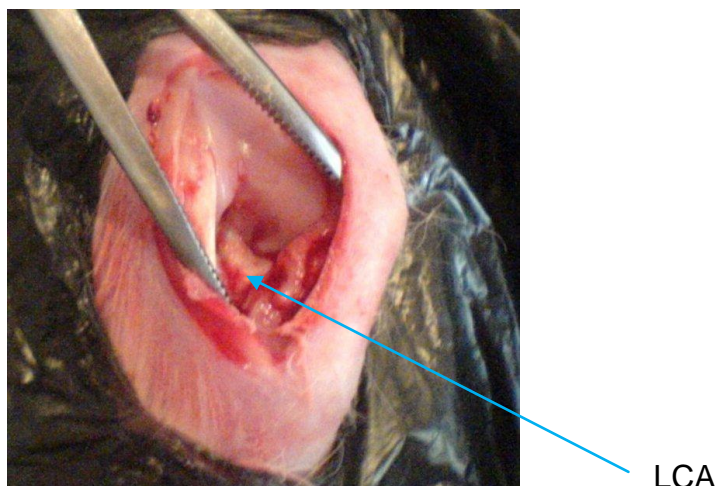


FIGURA 2 - FOTOGRAFIA DA EXPOSIÇÃO DO LCA



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. Foram distribuídos aleatoriamente 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 galo) de alto peso molecular 6×10^6 Da (Synvisc®) e o ácido hialurônico de cadeia nativa de origem aviária (crista de galo) de baixo peso molecular 5 a 7×10^5 Da (Polireumin®). Ambos os ácidos hialurônicos são utilizados rotineiramente em

infiltrações intra-articulares. (ADAMS *et al.*, 1994). O 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.

Foram sacrificados após 12 semanas do ato cirúrgico. Para isso foram previamente anestesiados como descrito anteriormente e submetidos à injeção intracardíaca de Tiopental (5ml) e Cloreto de Potássio (10ml). 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 PROCEDIMENTO DE COLORAÇÃO HISTOLÓGICA

Os platôs tibiais foram descalcificados sendo os platôs mediais submetidos à microtomia no plano sagital e inclusos em parafina. Utilizou-se a coloração Alcian Blue pH = 1.0, Alcian Blue pH = 2.5 e Azul de Toluidina.

As lâminas coradas foram encaminhadas ao Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná no Setor de Ciências Biológicas. Exemplificação das colorações utilizadas (figura 5, 6 e 7).

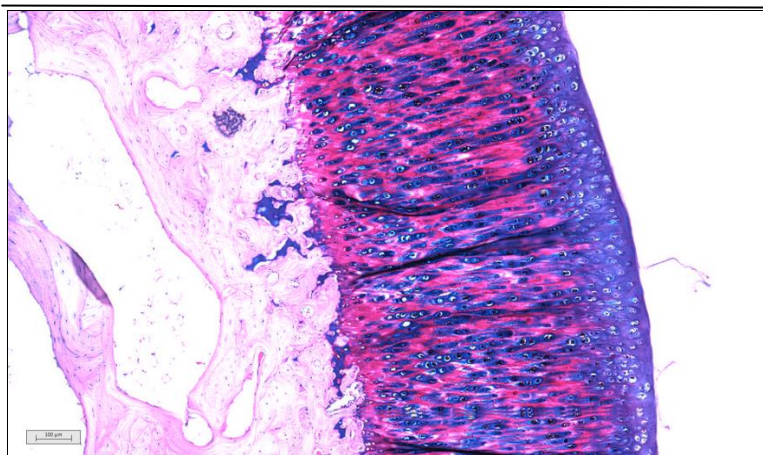


FIGURA 5 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 1.0

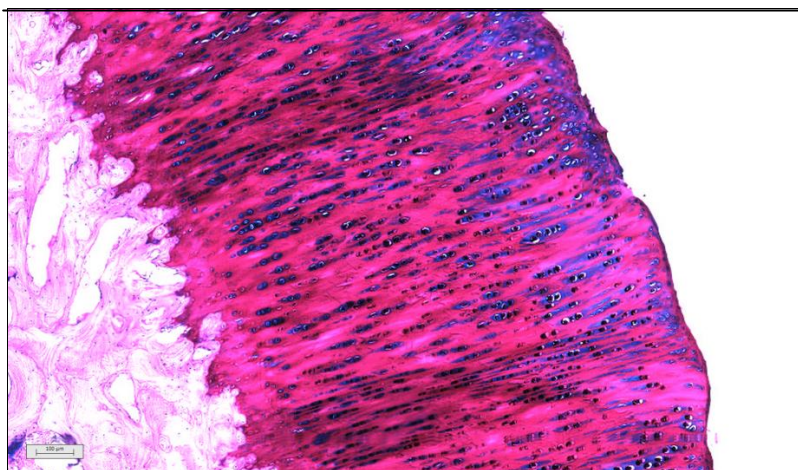


FIGURA 6 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 2.5

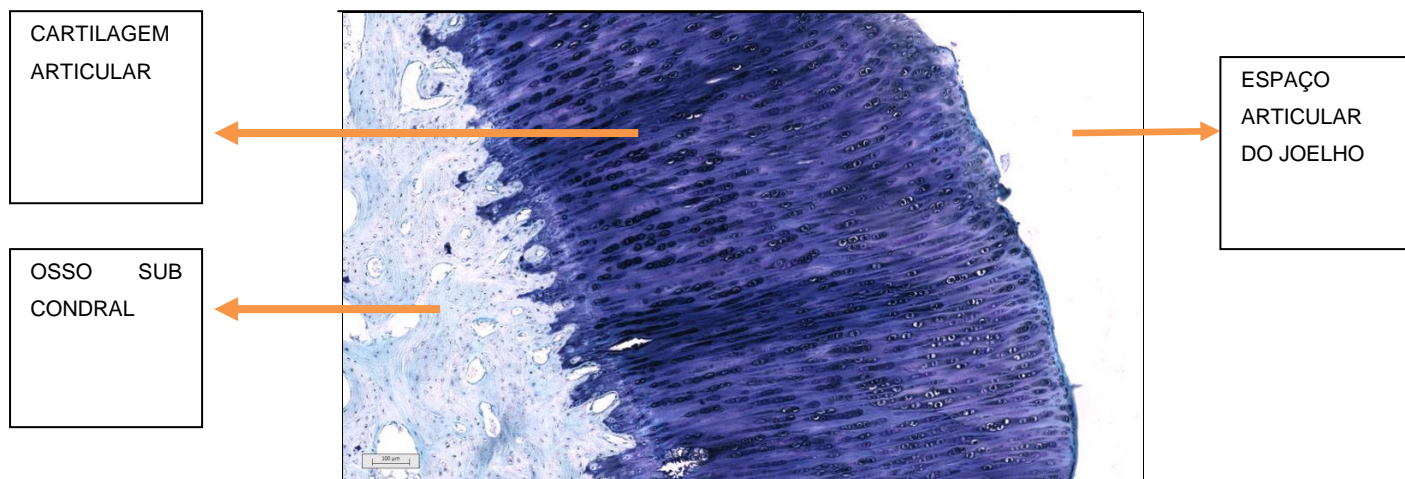


FIGURA 7 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DAB CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM AZUL DE TOLUIDINA

3.5 ANÁLISES HISTOLÓGICAS E ESTÁTISTICAS

As lâminas histológicas foram digitalizadas automaticamente em um microscópio Zeiss Imager.Z2 Metasystems, utilizando o software Metafer MSearch, 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 para as colorações Alcian Blue pH = 1.0, Alcian Blue pH = 2.5 e Color Deconvolution “RGB” para Azul de Toluidina. Posteriormente, a porcentagem de área marcada foi calculada após um threshold seguido de quantificação (ANDRADE *et al.*, 2011). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância fator única (ANOVA) seguida por testes F e T não pareado, considerados significativos quando $p < 0,05$. Os gráficos foram construídos com a média de desvio padrão, utilizando o software Microsoft Excel 2007. A avaliação dos dados foi objetiva, padronizadas pelo computador e subjetiva pelas notas dadas pelo biólogo responsável pela quantificação de coloração no teste Qui quadrado. As notas 1, 2 e 3 foram classificadas como: ruim, intermediário e excelente; respectivamente. Estas notas foram dadas a partir de critérios visuais de coloração observadas pelo biólogo.



FIGURA 8 – FOTOGRAFIA DO APARELHO DE MICROSCOPIA UTILIZADO NA PESQUISA

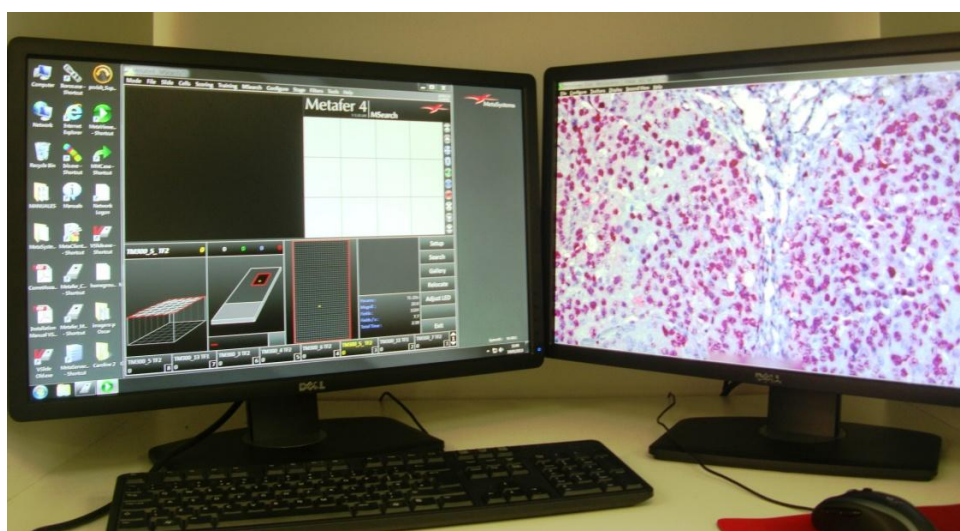


FIGURA 9 – FOTOGRAFIA DO SOFTWARE EM OPERAÇÃO



FIGURA 10 – FOTOGRAFIA DO SOFTWARE METAFER 4

Através da análise utilizada, cada lâmina gerou um dado dentro do conjunto de dados para cada grupo, que foram “P”, “PR” ou “S”, totalizando vinte e quatro lâminas/indivíduos analisados (oito para cada grupo). Para a análise estatística, a hipótese nula (H_0) foi: não há diferença entre as variáveis independentes; a hipótese alternativa (H_1): há diferença entre as variáveis independentes. O valor de alfa utilizado foi 0,05.

Os valores para cada coloração estão presentes nas TABELAS 1, 3 e 4. O teste Kolmogorov-Smirnov constatou que os dados possuem uma distribuição normal (dados não mostrados). Sendo assim, foram utilizados os testes paramétricos: análise de variância (ANOVA) fator único e testes t de Student não pareados assumindo variâncias iguais. No teste F foi constatado que as variâncias dos grupos não diferem entre si dentro de uma mesma coloração. Nas colorações de Azul de Toluidina e Alcian Blue pH = 2.5, mas não para pH = 1.0, a ANOVA apontou para uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Sendo assim, para essas duas colorações com diferença na ANOVA foram realizadas testes t de Student. Para a coloração de Azul de Toluidina somente diferiram os grupos P versus PR (TABELA 2). Para o Alcian Blue pH = 2.5 diferiram os grupos P versus PR e P versus S, mas este último somente no unicaudal (TABELA 5). Para se testar estatisticamente se de fato há diferenças entre os valores do grupo P e S, foi realizada uma análise não paramétrica para variáveis categóricas. Para

isso, ao invés de se analisar as lâminas utilizando o software ImageJ, apenas foram dadas notas de 1, 2 e 3 para a intensidade de coloração que, quanto maior a nota, mais intensa a coloração por Alcian Blue pH = 2.5 como descrito anteriormente (CHOW *et al.*, 2012).

O teste estatístico utilizado foi o de Qui quadrado de Contingência (χ^2). Para esse teste a H_0 foi que os grupos P e S não diferem no padrão de intensidade de coloração, enquanto que a H_1 os grupos P e S são diferentes no padrão de intensidade de coloração. O n utilizado foi de dezesseis (oito para cada grupo de tratamento), alfa de 0,05, Grau de liberdade dois e χ^2 tabelado = 5,991. O χ^2 calculado foi de 32,14286 (TABELA 6). Como o valor do χ^2 calculado é maior que o tabelado, rejeita-se H_0 e aceita a hipótese alternativa. Segue abaixo as tabelas com os dados obtidos.

TABELA 1 – NÚMEROS DA QUANTIFICAÇÃO DO AZUL DE TOLUIDINA

LÂMINAS	GRUPOS DE TRATAMENTO		
	P	PR	S
1	66,81098	72,71096	96,52204
2	15,6544	50,25438	97,83475
3	48,30333	93,63707	73,56667
4	72,81427	98,97833	64,13119
5	76,35281	90,30573	49,14048
6	83,84236	73,03511	56,87234
7	30,08729	96,62571	66,2721
8	37,47977	73,87755	46,77349

TABELA 2 – ANÁLISES DO TESTE T DE STUDENT DA TABELA 1

INFORMAÇÕES	COMPARAÇÕES 2 A 2					
	P	PR	P	S	PR	S
Média	53,9	81,2	53,9	68,9	81,2	68,9
Variância	607	277,4	608	382,3	277,4	382,3
Observações	8	8	8	8	8	8
Variância agrupada	442,7		495,1		329,8	
H ₀ diferença	0		0		0	
df	14		14		14	
t calculado	-2,6		-1,3		1,3	
P(T≤t) unicaudal	0,01		0,10		0,10	
t crítico unicaudal	1,8		1,8		1,76131	
P(T≤t) bicaudal	0,02		0,20		0,20	
t crítico bicaudal	2,1		2,1		2,1	

TABELA 3 – NÚMEROS DA QUANTIFICAÇÃO DO ALCIAN BLUE pH = 1.0

LÂMINAS	GRUPOS DE TRATAMENTO		
	P	PR	S
1	34,34797	68,02167	95,38368
2	89,68194	29,72821	97,26896
3	50,03834	81,88278	41,70293
4	41,21177	35,19409	68,65967
5	30,09164	34,54938	99,88211
6	38,7721	55,28347	44,2001
7	10,06779	43,21785	36,21376
8	32,54817	40,86236	29,08637

TABELA 4 – NÚMEROS DA QUANTIFICAÇÃO DO ALCIAN BLUE pH = 2.5

LÂMINAS	GRUPOS DE TRATAMENTO		
	P	PR	S
1	49,86103	61,96043	36,31462
2	37,0048	99,59628	96,2119
3	90,00677	89,87066	94,47586
4	39,21933	38,10635	63,63671
5	41,19301	99,1222	64,21882
6	35,90056	62,46105	60,2876
7	12,16039	72,56529	64,85414
8	28,92869	53,91113	29,84288

TABELA 5 – TESTES t DE STUDENT DA TABELA 4

INFORMAÇÕES	COMPARAÇÕES 2 A 2					
	P	PR	P	S	PR	S
Média	41,8	72,2	41,8	63,7	72,2	63,7
Variância	499,7	497,8	499,7	559,1	497,8	559,1
Observações	8	8	8	8	8	8
Variância agrupada	498,7		529,4		528,4	
H ₀ diferença	0		0		0	
df	14		14		14	
t calculado	-2,7		-1,9		0,7	
P(T≤t) unicaudal	0,01		0,04		0,2	
t crítico unicaudal	1,8		1,8		1,8	
P(T≤t) bicaudal	0,02		0,08		0,5	
t crítico bicaudal	2,1		2,1		2,1	

TABELA 6 – DADOS CATEGÓRICOS DA ANÁLISE DO ALCIAN BLUE pH 2,5

GRUPOS DE TRATAMENTO	NOTAS		
	1	2	3
P (n=8)	62,5% (5)	12,5% (1)	25% (2)
S (n=8)	25% (2)	12,5% (1)	62,5% (5)

NOTA – X^2 calculado = 32,14286

4 RESULTADOS

As lâminas descalcificadas e coradas com Alcian Blue pH = 1.0, Alcian Blue pH = 2.5 e Azul de Toluidina mostraram a presença de glicosaminoglicanos em maior quantidade nos grupos PR e S, quando comparado ao grupo controle P (placebo).

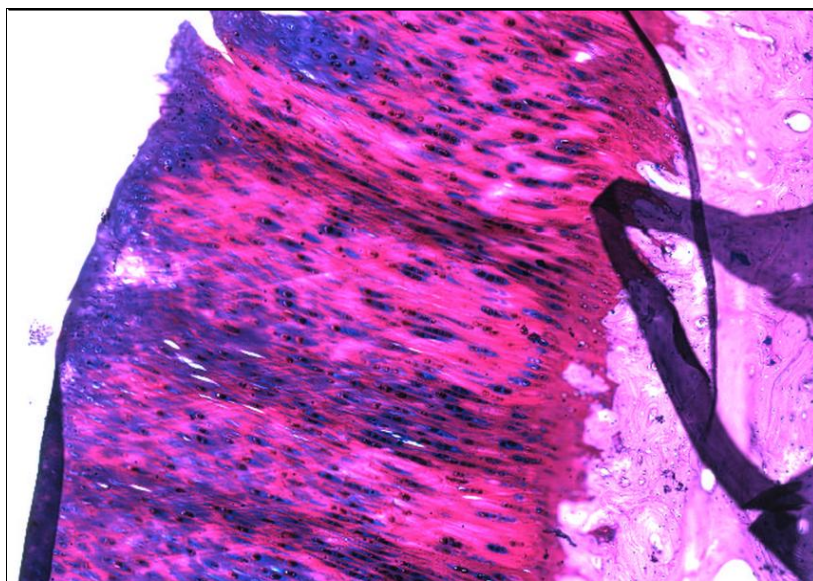


FIGURA 11 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 1.0 – Synvisc®

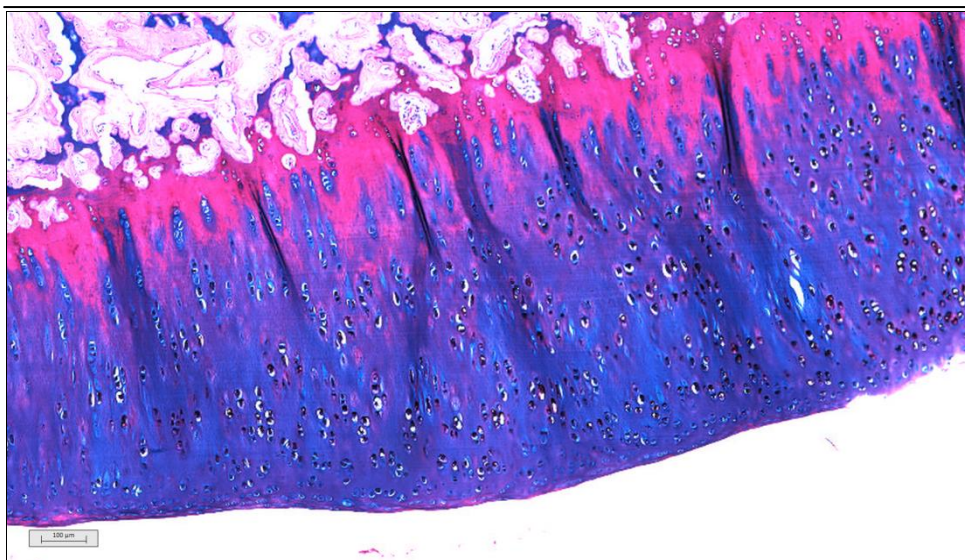


FIGURA 12 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 2.5 - Synvisc®

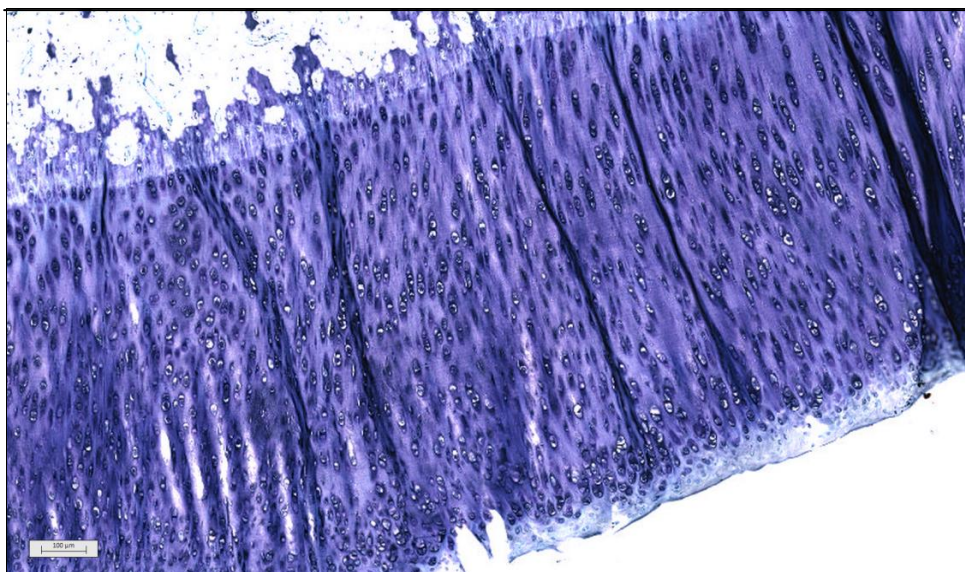


FIGURA 13 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM AZUL DE TOLUIDINA - Synvisc®

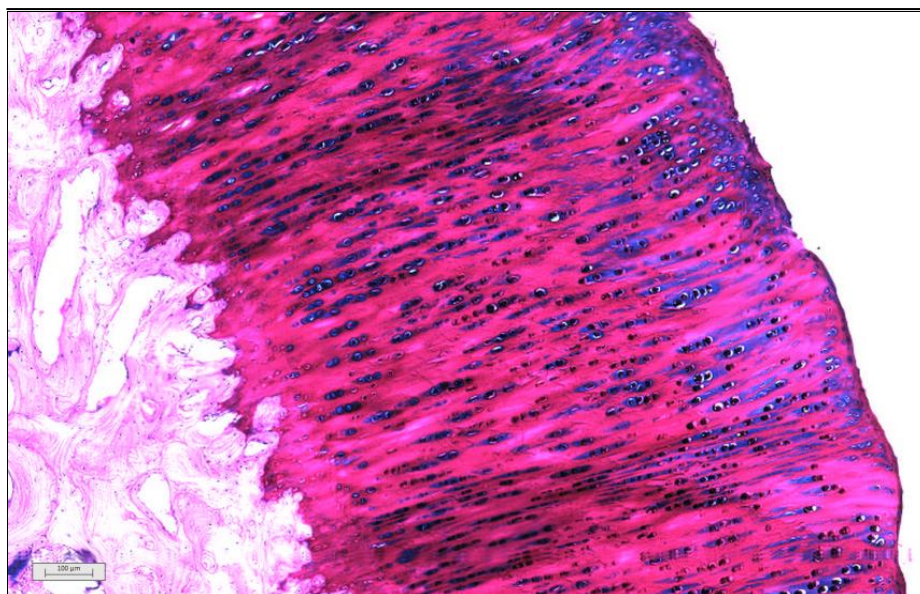


FIGURA 14 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 2.5 – Polireumin®

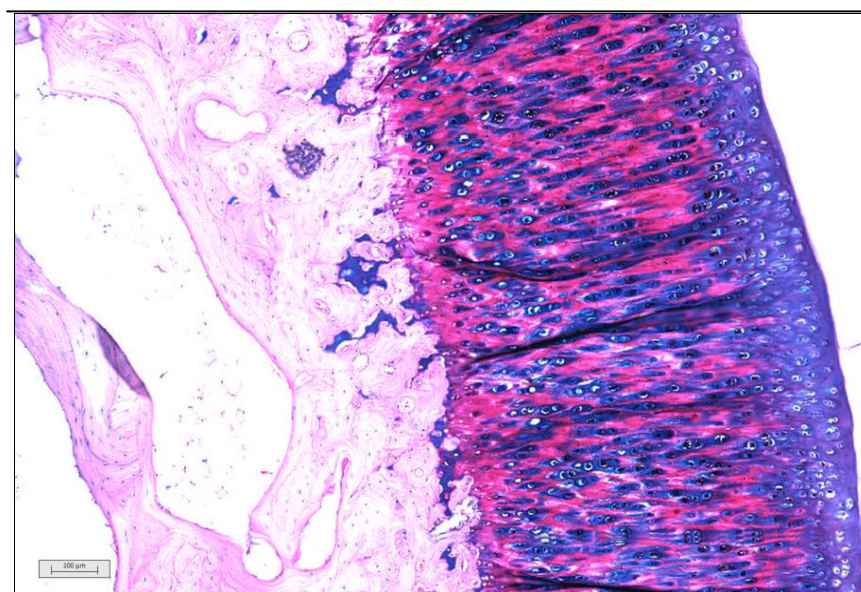


FIGURA 15 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 1.0- Polireumin®

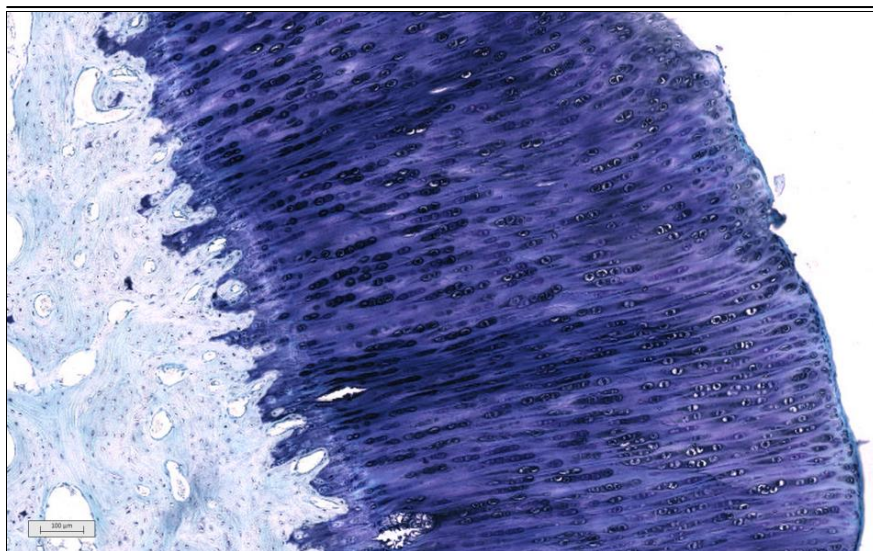


FIGURA 16 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM AZUL DE TOLUIDINA - Polireumin®

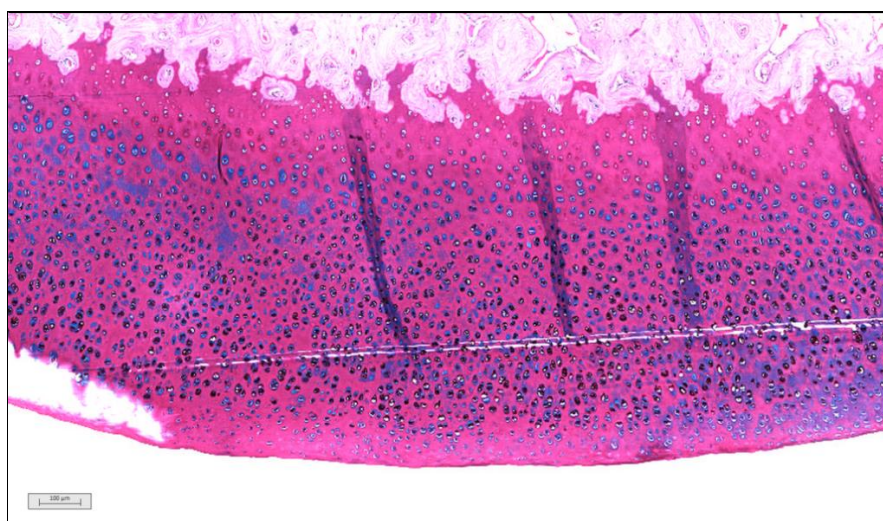


FIGURA 17 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 1.0 – Placebo

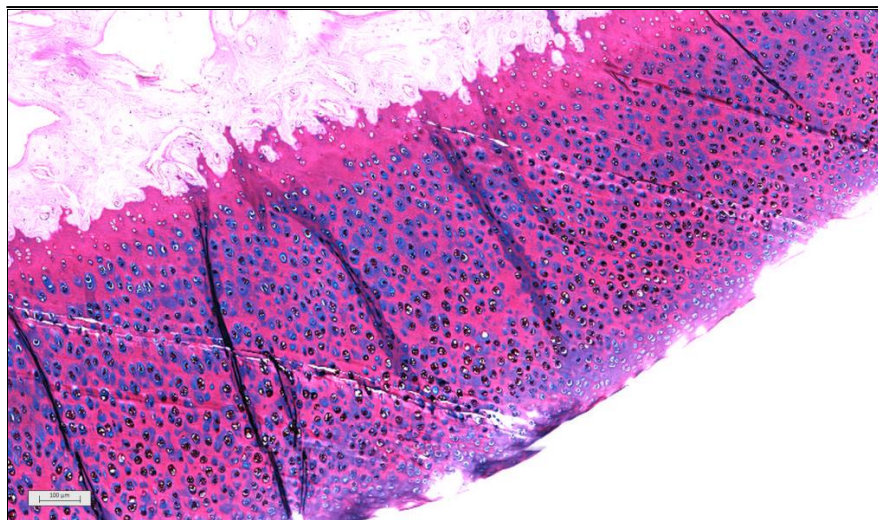


FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM ALCIAN BLUE pH = 2.5 – Placebo

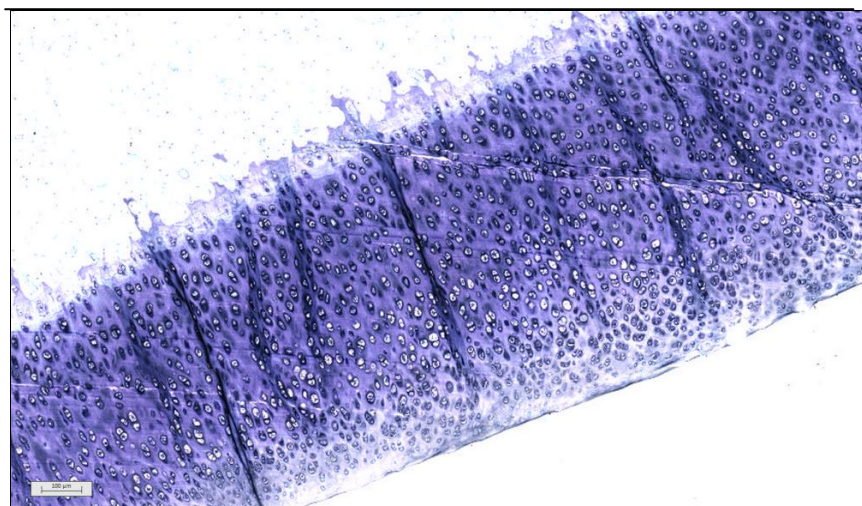


FIGURA 19 – FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DA CARTILAGEM ARTICULAR CORADA COM AZUL DE TOLUIDINA – Placebo

A avaliação da intensidade de coloração dos cortes histológicos corados pelo Alcian Blue pH = 1.0, Alcian Blue pH = 2.5 e Azul de Toluidina pelo aparelho de microscopia Zeiss Imager Z2 Metasystems, gerou resultados que foram dispostos em tabelas e gráficos. A seguir estão os gráficos 1, 2 e 3 fornecidos pelo programa, representativos da intensidade real da coloração mensurada em cada grupo das colorações citadas anteriormente. Sendo, **P**-Placebo, **PR**-Polireumin® e **S**-Synvisc®.

GRÁFICO 1 – COLORAÇÃO ALCIAN BLUE pH = 1.0

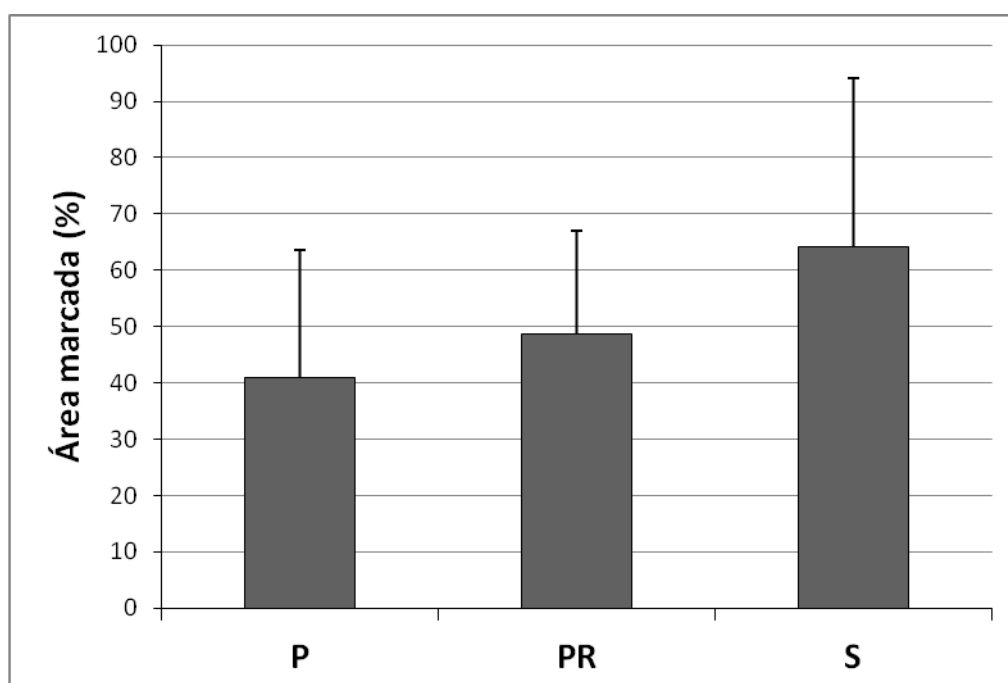


Gráfico da área marcada pela coloração Alcian Blue pH= 1.0 nos três grupos

GRÁFICO 2 – COLORAÇÃO ALCIAN BLUE pH = 2.5

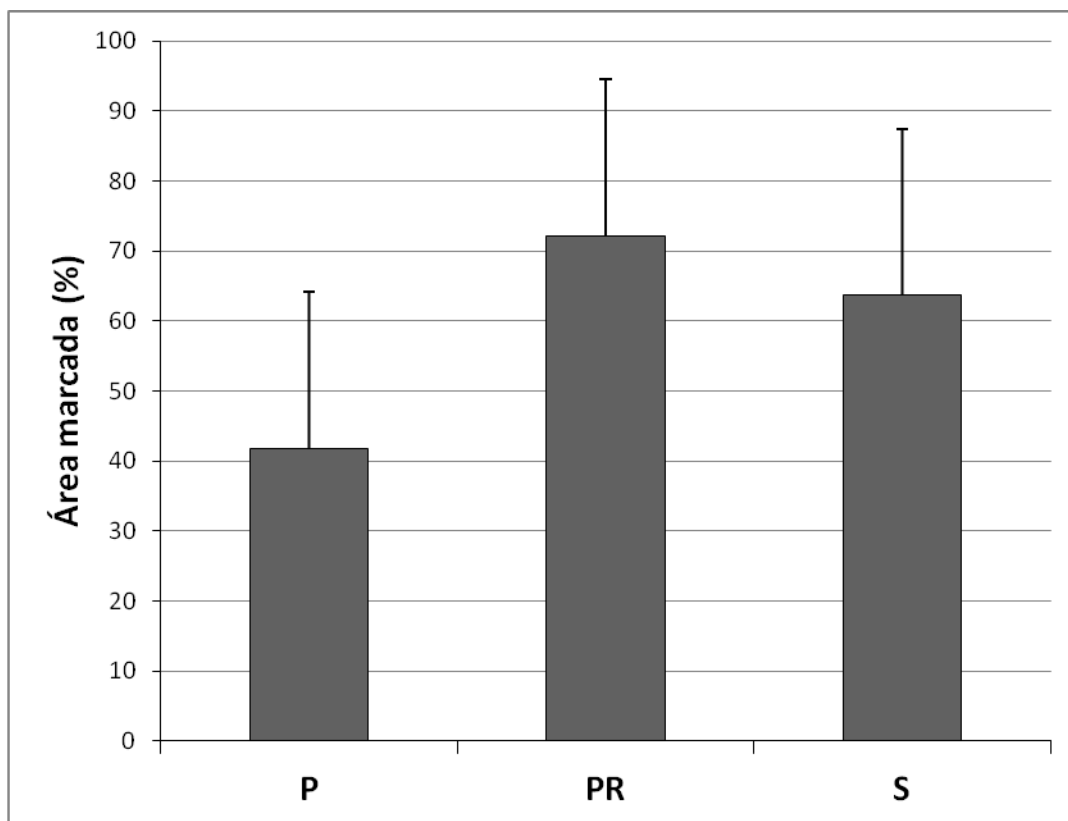


Gráfico da área marcada pela coloração Alcian Blue pH= 2.5 nos três grupos

GRÁFICO 3 – COLORAÇÃO AZUL DE TOLUIDINA

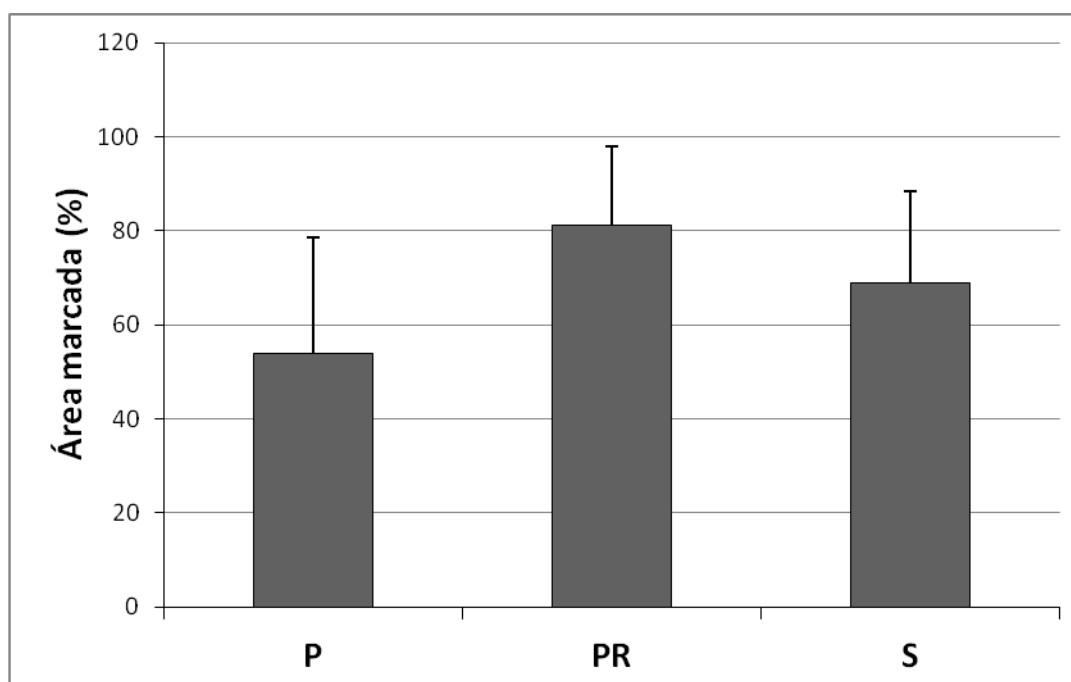


Gráfico da área marcada pela coloração Azul de Toluidina nos três grupos

GRÁFICO 4 – NOTAS DO ALCIAN BLUE pH = 2.5

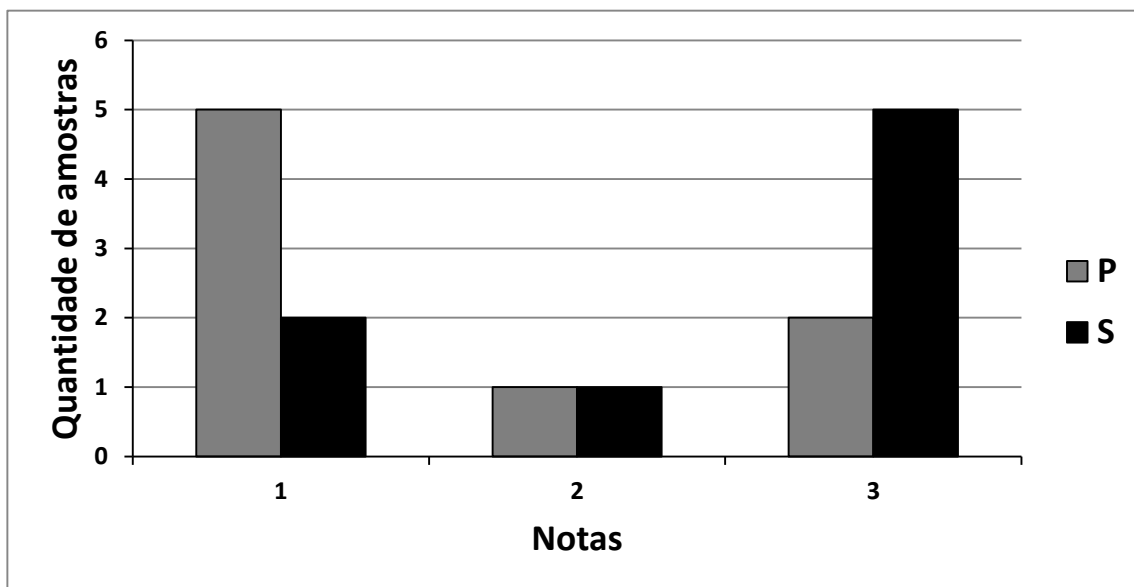


Gráfico do número de amostras pelas notas obtidas dos grupos P e S

5 DISCUSSÃO

O ácido hialurônico, um polissacarídeo do grupo glicosaminoglicanos de alta viscosidade, utilizado na prática médica há mais de trinta anos, esta substância contribui para a homeostase da articulação normal e apresenta-se em menor concentração e com peso molecular diminuído no líquido sinovial nas articulações que apresentam osteoartrose. Infiltrações intra-articulares de diferentes ácidos hialurônicos são utilizadas como condroprotetores no tratamento da osteoartrose (YOSHINI, 1994; SCHIAVINATO, 2002; WANG, 2006).

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. Na prática clínica tem-se dado preferência ao ácido hialurônico de alto peso molecular para o tratamento da osteoartrose com base em estudos como os realizados por ATAMAZ (2006); WOBIG (1999), que utilizaram o modelo de osteoartrose em humanos, comparando os ácidos hialurônicos de pesos moleculares diferentes com soro fisiológico infiltrados intra-articularmente, obteve resultados melhores com o uso dos ácidos hialurônicos de maior peso molecular; em critérios clínicos e não histológicos.

Entretanto segundo KARLSSON (2002), que estudou ácidos hialurônicos de diferentes pesos moleculares em infiltrações intra-articulares em humanos com osteoartrose, não ocorreu diferença significativa entre os ácidos hialurônicos de pesos moleculares distintos em critérios clínicos e não histológicos.

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

O modelo experimental em pequenos animais, que mais se assemelha a osteoartrose 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 osteoartrose (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 osteoartrose 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).

No presente estudo 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. Os platôs dos joelhos submetidos a esse procedimento apresentaram sinais de lesão macroscópica evidente; principalmente os do grupo controle P (placebo-SF 0,9%), Albano *et al.*, (2010).

Colorações histológicas específicas para proteoglicanos foram escolhidas para avaliar a cartilagem articular. As colorações Alcian Blue pH= 1.0, Alcian Blue pH= 2.5 e Azul de Toluidina possuem grande capacidade de corar glicosaminoglicanos e proteoglicanos e foram utilizadas com êxito em vários estudos histológicos de cartilagem (NAITO, 2010; SCHMITZ, 2010; KURODA, 2011). O Alcian Blue pH = 1.0 cora glicosaminoglicanos de modo geral nos diferentes tecidos, já o Alcian Blue pH = 2.5 e o Azul de Toluidina coram especificamente proteoglicanos.

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 a 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 osteoartrose. Devido à importância dos proteoglicanos na estrutura da cartilagem e por serem um fator de avaliação na osteoartrose, a dosagem dos proteoglicanos foi mensurada.

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

Obteve-se maior intensidade de coloração no grupo S (Synvisc®) e PR (Polireumin®), em relação ao grupo controle P (placebo-SF 0,9%), portanto as lâminas descalcificadas e coradas com Alcian Blue pH = 1.0, Alcian Blue pH = 2.5 e Azul de Toluidina mostraram a presença de glicosaminoglicanos em maior quantidade, quando comparado ao grupo controle P (placebo). Isto confirma a hipótese de que os ácidos hialurônicos testados atuam como condroprotetores, pois preservou uma maior quantidade de proteoglicanos no tecido cartilaginoso dos joelhos infiltrados com hialuronatos.

Não houve diferença estatística na comparação da intensidade de coloração das lâminas dos joelhos infiltrados com ácido hialurônico de alto peso com as de baixo peso molecular.

Paralelamente foi realizada uma avaliação de intensidade de coloração por visão direta das lâminas, ou seja, examinador dependente. Para isto foi solicitado a um biólogo que avaliasse as lâminas conferindo-as notas. Este profissional realizou a classificação em notas das lâminas coradas com Alcian Blue pH = 2.5 em: 1, 2 e 3 como ruim, intermediário e excelente, respectivamente. Obtiveram-se também resultados que confirmaram os resultados conferidos pelo aparelho, ou seja, houve diferença estatística entre os grupos tratados com hialuronatos quando comparados com o grupo placebo e não houve diferença estatística entre os grupos infiltrados com hialuronatos independentemente do peso molecular. Os dados subjetivos foram avaliados pelo teste Qui quadrado.

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 das três substâncias testadas (ácido hialurônico nativo, ácido hialurônico ramificado e soro fisiológico).

GHOSH e GUIDOLIN (2002), utilizando modelo experimental de transecção do ligamento cruzado anterior em cães, obteve 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. Porque seriam melhores estimuladores da produção de componentes da matriz celular, 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 metaloproteinases (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 osteoartrose; que indica não haver diferenças quanto ao peso molecular dos ácidos hialurônicos em relação a condroproteção.

6 CONCLUSÃO

A análise dos efeitos das substâncias ácido hialurônico nativo e ácido hialurônico de cadeia ramificada no modelo experimental de osteoartrose em coelhos, demonstrou neste estudo caráter condroprotetor quando comparado ao grupo controle (SF 0.9%). Quando o ácido hialurônico de cadeia nativa (Polireumin®) e o ácido hialurônico de cadeia ramificada (Synvisc®) foram comparados entre si, não houve diferença estatística.

REFERÊNCIAS

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.

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 RD, Moskowitz 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.

ANDRADE, L.F. Avaliação da ação do medicamento M1 sobre o melanoma murino "in vivo". 64 f. Dissertação (Biologia Celular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

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

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.

BEDSON J.; JORDAN, K.; CROFT,P. The prevalence and history of knee osteoarthritis in general practice: a case-control study. **Fam Pract.** V.22,n.1,p.103-8, 2005.

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

CHOW, M. T. *et al.* NLRP3 promotes inflammation-induced skin cancer but is dispensable for asbestos-induced mesothelioma. **Immunology and Cell Biology**, v.90, n.10, p.983-986, 2012.

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.

COLLINS, D. H.; MCELLIGOTT T. F. Sulphate ($^{35}\text{SO}_4$) Uptake by Chondrocytes in Relation to Histological Changes in Osteo-Arthritic Human Articular Cartilage. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 19, n. 4, p. 318-330, 1960.

COOPER C, Snow S, McAlindon TE, Kellingray S, Stuart B, Coggon D, et al. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. **Arthritis Rheum**. V.43,n.5,p.995-1000, 2000.

FRANSSON, L. Mammalian glycosaminoglycans. In: ASPINALL, G. (Ed.) **The Polysaccharides**. Academic Press, Inc. St Louis, Missouri, USA: 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? **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 32, n. 1, p. 10-37, 2002.

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 Cartilage**. v. 17, n. 6, p 798-804, 2009.

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

HULMES DJ, Marsden ME, Strachan RK, Harvey RE, McInnes N, Gardner DL. Intra-articular hyaluronate in experimental rabbit osteoarthritis can prevent changes in cartilage proteoglycan content. **Osteoarthritis Cart.** v.12, n.3, p.232-238, 2004.

JÜNI P. et al. Efficacy and safety of intraarticular hylan or hyaluronic acids for osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, 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.

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

KURODA, T. et al. Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v 116, n. 2, p 107-114,2001.

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

LIN W. et al. Patterns of Hyaluronan Staining Are Modified by Fixation Techniques. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 45, n.8, p 1157-1163,1997.

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

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

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.

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.

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 JG, *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, CAMPOS, C.G. Viscosuplementação. **Rev. Bras. Ortop.** v. 47,n.2, p. 160-164, 2012.

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.

SCHIAVINATO A, Finesso M, Cortivo R, Abatangelo G. 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 and Cartilage**, 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.

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.

TAKESHITA, S. et al. The in vitro effect of hyaluronic acid on IL-1 β 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.

WANG CT, L.J. 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 Cartilage**, 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 osteoarthritis 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 and Cartilage**, v. 4, n. 2, p. 87-98, 1996.