

INSTITUTO PRESBITERIANO MACKENZIE
FACULDADE EVANGÉLICA MACKENZIE DO PARANÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO EVANGÉLICO MACKENZIE
INSTITUTO DE PESQUISAS MÉDICAS

VINICIUS FERREIRA CARON

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E CONDROREGENERADOR DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS INTRA-ARTICULAR EM COMPARATIVO AO COLÁGENO NÃO-DESNATURADO, SULFATO DE CONDROITINA E SULFATO DE GLUCOSAMINA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATOS.

CURITIBA

2019

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E CONDROREGENERADOR DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS INTRA-ARTICULAR EM COMPARATIVO AO COLÁGENO NÃO-DESNATURADO, SULFATO DE CONDROITINA E SULFATO DE GLUCOSAMINA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM RATOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Princípios da Cirurgia da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Issamu Tabushi

Coordenador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

ESPAÇO PARA A FICHA CATALOGRÁFICA

Dedico aos meus pais, a minha avó Roza, aos meus sogros e especialmente a minha amada esposa e ao nosso filho (que em breve vai nascer), pois esses são a base e a motivação para as conquistas, e agradeço a compreensão pela ausência devido às horas de trabalho e estudo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus, por me proporcionar saúde e a oportunidade de viver esta grande experiência acadêmica.

Os mais sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Fernando I. Tabushi, pelos ensinamentos, gentileza e amizade que sempre teve durante todo o processo da nossa pesquisa. Será eterno o bom exemplo de um mestre na minha vida acadêmica.

Agradeço também ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia, coordenador da Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia, nível Mestrado e Doutorado, da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná – IPEM.

A CAPES pela oportunidade oferecida para realizar este trabalho. E gratidão a Profa. Telma por compartilhar o seu conhecimento e auxiliar enormemente este trabalho.

Aos queridos amigos Guilherme Poletto, Moises Leonardi, Amanda Friedemann e Beatriz Cieslinski, por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho, o altruísmo e amizade de vocês foram vitais para a conclusão deste trabalho, obrigado pela companhia nas muitas horas de laboratório.

Aos médicos veterinários e amigos Diogo Da Motta Ferreira, Carlos Henrique do Amaral e Silvana Maris Círio, por me auxiliarem com seus conhecimentos durante a prática e exames dos animais, vocês são exemplos de dedicação e profissionalismo, contem comigo sempre.

Ao amigo Lilo, pela ajuda no dia-a-dia da pesquisa, com seu alto astral e organização, foi um prazer dividir este trabalho com você.

Um agradecimento aos caros Bruno e Erika, sempre me auxiliando com as informações corretas e que Deus sempre preserve a bondade de vocês.

E que São Francisco de Assis abençoe os animais envolvidos nesta pesquisa e concedei que todo animal seja bem cuidado.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência, são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

A doença articular degenerativa ou simplesmente osteoartrite é a forma de artrite mais comum no mundo e afeta preferencialmente a população idosa, e com o envelhecimento da população mundial, esta doença tem se tornado causa de incapacidade física e afastamento do trabalho, onerando os sistemas de saúde e de previdência (BRUYERE, 2007). **Objetivo:** Estudar o efeito condroregenerador e anti-inflamatório do plasma rico em plaquetas (PRP) em comparação com o colágeno não-desnaturado (UC-II), sulfato de glucosamina e sulfato de condroitina em ratos induzidos a osteoartrite com Zymosan®. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 42 ratos machos Wistar, divididos em 5 grupos, que receberam injeção na articulação femoro-tibio-patelar direita do agente indutor de osteoartrite Zymosan. Um grupo recebeu a aplicação semanal de PRP, três grupos receberam respectivamente os fármacos: colágeno não-desnaturado, sulfato de condroitina, sulfato glucosamina, totalizando 30 dias de tratamento. Um grupo não recebeu tratamento para servir de controle. As radiografias foram realizadas no oitavo e trigésimo dia, para comprovação da osteoartrite e avaliação do tratamento respectivamente. Semanalmente, os animais foram submetidos ao teste físico Knee Bend, para avaliação da incapacidade física do membro afetado. No trigésimo dia de tratamento, os animais foram mortos e realizada avaliação histopatológica. **Resultados:** O grupo PRP obteve melhora com relevância estatística na imagem radiográfica após os trinta dias de tratamento. E não houve alterações significativas entre os grupos no comparativo do Knee Bend test e as lesões radiográficas. O grupo PRP apresentou maior qualidade na regeneração articular, e o grupo glucosamina apresentou o melhor efeito anti-inflamatório e condroprotetor.

Os dados deste estudo acrescentam que a associação de tratamentos é mais eficaz do que o uso de drogas isoladas no controle da osteoartrite.

Conclusão: houve um melhor efeito condrorregenerador do PRP em relação ao UC-II, CDS e GS. Em relação ao efeito anti-inflamatório a GS apresentou melhor resultado.

Palavras-chave: artropatia; condro-regeneração; fatores de crescimento.

ABSTRACT

Degenerative joint disease or simply osteoarthritis is the most common form of arthritis in the world and preferentially affects the elderly population, and with the aging of the world population, this disease has become a cause of physical disability and withdrawal from work, burdening health systems and social security (BRUYERE, 2007). **Objective:** To study the chondroregenerative and anti-inflammatory effect of platelet-rich plasma (PRP) compared to non-denatured collagen (UC-II), glucosamine sulfate and chondroitin sulfate in rats induced to osteoarthritis with Zymosan®. **Materials and Methods:** 42 male Wistar rats, divided into 5 groups, were injected into the right femoro-tibio-patellar joint of the osteoarthritis inducing agent Zymosan. One group received the weekly application of PRP, three groups respectively received the drugs: non-denatured collagen, chondroitin sulfate, glucosamine sulfate, totaling 30 days of treatment. One group received no treatment to serve as a control. The radiographs were taken on the eighth and thirtieth days, to prove osteoarthritis and evaluate the treatment, respectively. Weekly, the animals were submitted to the Knee Bend physical test, to assess the physical disability of the affected limb. On the thirtieth day of treatment, the animals were killed and histopathological evaluation was performed. **Results:** The PRP group showed improvement with statistical relevance in the radiographic image after thirty days of treatment. And there were no significant changes between the groups in the comparison of the Knee Bend test and radiographic lesions. The PRP group showed the highest quality in joint regeneration, and the glucosamine group showed the best anti-inflammatory and chondroprotective effect. The data in this study add that the combination of treatments is more effective than the use of isolated drugs to control osteoarthritis. **Conclusion:** there was a better chondroregenerative effect of PRP in relation to UC-II, CDS and GS. Regarding the anti-inflammatory effect, GS presented the best result.

Keywords: arthropathy; chondro-regeneration; growth factors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da articulação femoro-tíbio-patelar	18
Figura 2 Corte histológico do tecido articular com aspecto normal.....	22
Figura 3 Corte histopatológico de Osteoartrite	30
Figura 4 O Biotério	34
Figura 5 Equipamentos para anestesia	34
Figura 6 Equipamento inalatório para manutenção anestésica.....	35
Figura 7 Injeção intra-articular de Zymosan A ®.....	35
Figura 8 Equipamentos utilizados para as radiografias.....	36
Figura 9 Incidência Radiográfica Latero-Lateral	37
Figura 10 Incidência Radiográfica Cranio-caudal	37
Figura 11 Knee Bend Test.....	38
Figura 12 Incidência crânio-caudal	42
Figura 13 Incidência Latero-lateral	43
Figura 14 Diminuição do espaço articular	44
Figura 15 Osteófitos na face caudal articular,.....	45
Figura 16 Esclerose óssea	45
Figura 17 Erosão óssea no côndilo tibial,	46
Figura 18 Erosão óssea em côndilo femoral.....	47
Figura 19 Diminuição do espaço articular.....	47
Figura 20 Erosão óssea	48
Figura 21 Diminuição do espaço articular.....	49
Figura 22 Erosão óssea em côndilo tibial	49
Figura 23 Osteófitos periarticular,.....	50
Figura 24 Erosão e fissura da cartilagem	51
Figura 25 Hiperplasticidade da cartilagem e tidemarks	51
Figura 26 Condrócitos colunares, articulação femoro-tíbio-patelar direita.....	52
Figura 27 Sinóvia reativa e tecido fibrovascular recobrimdo cartilagem,.....	53
Figura 28 Grupos isógenos de condrócitos, articulação femoro-tíbio- patelar direita.	54
Figura 29 Hipertrofia vilosa da sinóvia, articulação femoro-tíbio-patelar direita.	55
Figura 30 Úlcera superficial, articulação femoro-tíbio-patelar direita.....	56
Figura 31 Reação inflamatória granulomatosa severa.....	57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 Metodologia utilizada neste experimento	33
Quadro 2 Escala de avaliação do escore do KNEE BEND TEST	39
Quadro 3 Graduação das lesões articulares.....	43
Tabela 1 Valores representando a contagem de pontos observados.....	60
Tabela 2 Escore da lesão articular no exame histopatológico.....	62
Tabela 3 Classificação da gravidade de acordo com a pontuação da análise histopatológica.....	63
Tabela 4 Descrição do Knee Bend Test	667

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1-** Relação das alterações radiográficas entre os grupos, dia 0 do experimento.....**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 2-** Relação das alterações radiográficas entre os grupos, dia 30 do experimento.....**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 3-** Resultado da contagem das lesões nos dias 0 e 30.**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 4-** Valores representando a contagem de pontos observados de acordo com o padrão de lesão articular radiológica**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 5-** Demonstração dos grupos que apresentaram Clusters de condrócitos na avaliação histopatológica.....**Erro! Indicador não definido.**3
- Gráfico 6-** Comparação entre os grupos Glucosamina - PRP ..**Erro! Indicador não definido.**4
- Gráfico 7-** Representação dos grupos que apresentaram até 4 clusters de condrócitos na avaliação histopatológica **Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 8-** Comparação entre pares dos grupos Glucosamina – UC-II e Glucosamina-PRP**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 9-** Distribuição da análise histopatológica655
- Gráfico 10-** Valores de mediana do Knee Bend Test666
- Gráfico 15-** Relação Entre Knee Bend E Avaliação Radiológica67

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	-	Acido Hialurônico
CDS	-	Sulfato de Condroitina
DMOAS	-	Drogas Modificadoras de Aminoglicanos
G	-	Gramas
GS	-	Sulfato de Glucosamina
GAGS	-	Glicosaminoglicanos
IL	-	Interleucina
IPEM	-	Instituto de Pesquisas Médicas
KG	-	Quilograma
KS	-	Keratan Sulfato
LP	-	Proteína de ligação
MEC	-	Matriz Extracelular
MG	-	Miligrama
OA	-	Osteoartrite
TNF- α	-	Fator de Necrose Tumoral- α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	CONCEITOS GERAIS SOBRE A OSTEOARTRITE	18
2.1.1	Anatomia Articular Femoro-Tibio-Patelar	19
2.2	ETIOLOGIA	21
2.3	FISIOPATOLOGIA DA OSTEOARTRITE	24
2.3.1	Fase Inflamatória	24
2.3.2	Fase Regenerativa	26
2.3.3	Fase Degenerativa	26
2.3.4	Dor E Sintomatologia	26
2.3.5	Histopatologia	31
2.3.6	Terapia Farmacologica	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
3.1.1	Animais	34
3.2	PROTOCOLO ANALGÉSICO E ANESTÉSICO	35
3.3	INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE	36
3.4	EXAME RADIOGRÁFICO	36
3.5	KNEE BEND	38
3.6	ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS	40
3.7	MORTE DOS ANIMAIS	41
3.8	EXAME HISTOPATOLÓGICO	41
3.9	MÉTODOS ESTATÍSTICOS	41
4	RESULTADOS	42
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

ANEXO 1 -82

APENDICE 1

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite é, segundo a Osteoarthritis Research Society International (OARSI), um distúrbio que envolve articulações sinoviais, caracterizado por estresse celular e degradação da matriz extracelular incluindo vias pró-inflamatórias da imunidade. A doença se manifesta primeiro como um distúrbio molecular (metabolismo anormal do tecido articular), seguido de distúrbios anatômicos e/ou fisiológicos, caracterizados por degradação da cartilagem, remodelação óssea, formação de osteófitos, inflamação articular e perda da função articular normal.

A OMS (Organização mundial da saúde) estima que 40% dos adultos acima de 70 anos apresentam osteoartrite de joelhos, 80% das pessoas com osteoartrite possuem limitação de movimentos e 25% não consigam desempenhar suas principais atividades de vida diária (BOTELHO, 2005).

Nos Estados Unidos, a osteoartrite é a segunda maior causa de incapacidade ocupacional em homens acima de 50 anos, superada apenas pela doença coronariana (BRUYERE, 2007).

No Brasil, a osteoartrite respondeu por 18,6% dos 1.398.266 benefícios concedidos pelo Instituto Nacional do Seguro Social (INSS) de janeiro a outubro de 2005 (SILVA JR, 2007).

A fisiopatologia da OA divide-se em duas fases. Inicialmente ocorre um aumento da atividade metabólica onde os condrócitos são estimulados a produzir matriz extracelular por ação de diversas citocinas. Posteriormente ocorre uma fase destrutiva na qual intervêm diversas citocinas, que levam a uma diminuição da matriz, quer por provocarem aumento da sua degradação através das metaloproteinases, quer por diminuírem a sua síntese. A perda do equilíbrio entre estas duas fases origina modificações estruturais que levam à degeneração articular com perda funcional (SANDELL, 2001).

Para compensar a perda de função, um conjunto de respostas adaptativas inadequadas desenvolvem-se na articulação, que levam ao aparecimento dos sintomas associada a OA, destacando-se a dor que surge devido à ativação de receptores nociceptivos nos diferentes tecidos articulares. A existência de um estímulo nociceptivo constante e de um ambiente inflamatório intenso nas estruturas lesadas promovem alterações metabólicas, neuroquímicas e estruturais ao nível dos sistemas nervosos periférico e central. Estas alterações traduzem-se posteriormente numa hiperexcitabilidade das vias aferentes nociceptivas perpetuando e exacerbando a OA e a dor associada e eventualmente provocando alodínia e hiperalgesia (IM et al., 2008).

Atualmente, o tratamento considerado definitivo para a OA é a artroplastia total (VERHAGEN et al., 2019).

Mas esta não garante uma total eficácia na eliminação da dor, pois é impossível garantir uma total reversão das alterações fisiopatológicas ocorridas. Assim, considera-se que a OA não tem cura, pelo que a terapêutica assenta essencialmente no controlo da dor, com vista à melhoria da qualidade de vida dos doentes. À medida que se vão conhecendo melhor os mecanismos da OA, abrem-se novas perspectivas para a utilização de fármacos que possam atuar não apenas ao nível da dor mas também na cascata de eventos que desencadeiam a doença, impedindo a sua progressão ou provocando a sua reversão.

O Plasma rico em plaquetas está sendo considerado uma alternativa terapêutica nos casos de osteoartrite em diferentes espécies, pois contem altas concentrações de fatores de crescimento (GFs), que podem mediar os processos reparativos biológicos articulares (GOBBI et al,2012).

Seus benefícios perante os demais fármacos condroprotetores devem ser comparados para que haja a preleção na escolha do fármaco mais eficaz e com menor efeito adverso, principalmente à longo prazo (GUPTA et al.,2009).

A justificativa da realização desta pesquisa se deve ao fato da doença articular ser recorrente na clínica médica e novas terapias devem ser apresentadas para otimizar os resultados terapêuticos e conseqüente melhor prognóstico (CAMANHO, 2011) . Embora a literatura médica apresente muitos trabalhos com ampla variedade de tratamentos, a busca da terapia ideal nos leva a continuar os estudos sobre a osteoartrite e suas conseqüências clínicas.

1.1 OBJETIVO

Estudar o efeito condroregenerador e anti-inflamatório do plasma rico em plaquetas (PRP) em comparação com o colágeno não-desnaturado (UC), sulfato de glucosamina e sulfato de condroitina em ratos induzidos a osteoartrite com Zymosan.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCEITOS GERAIS SOBRE A OSTEOARTRITE

A osteoartrite (OA) é uma afecção degenerativa caracterizada pelo defeito estrutural e funcional de uma ou várias articulações (ATTUR, et al., 2002).

A OA apresenta alta prevalência, sendo considerada a doença osteoarticular mais comum, sendo um desafio na saúde pública coletiva devido ao avanço da expectativa de vida da população (CAMANHO, 2001).

É uma das principais causas de morbidade na população idosa, e está associada a elevado custo social. A OMS estima que 40% dos adultos acima de 70 anos apresentem OA de joelhos e 80% das pessoas com OA apresentem limitação de movimentos, e 25% não conseguem desempenhar suas principais atividades de vida diária³. Nos Estados Unidos, a OA é a segunda maior causa de incapacidade ocupacional em homens acima de 50 anos, superada apenas pela doença coronariana (SANDELL et. al., 2011).

No Brasil, a OA respondeu por 22,6% dos 1.598.266 benefícios concedidos pelo Instituto Nacional do Seguro Social (INSS) de janeiro a outubro de 2015 (CAMANHO, 2011).

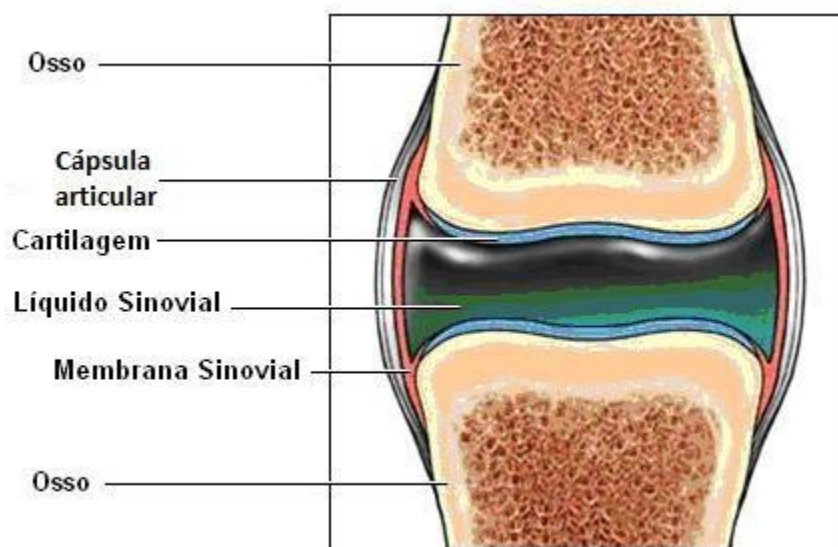
A combinação de marcadores clínicos e dados imaginológicos são úteis na avaliação dos pacientes com OA do joelho, para estimar o prognóstico e determinar a progressão da doença, pois o manejo da doença articular é desafiador, devido ao seu inerente baixo potencial curativo. E isso ocorre pela limitada falta de inervação e irrigação vascular (IM et al., 2008).

Uma variedade de agentes terapêuticos, como anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais, nutracêuticos como o sulfato de glucosamina, sulfato de condroitina, colágeno, diacereína e ácido hialurônico têm sido propostos como não-invasivas soluções para o tratamento da dor, melhoria da função e incapacidade articular e, em última instância, a modificação de degeneração e osteoartrite com taxas de sucesso variáveis. O sulfato de glucosamina, sulfato de condroitina, colágeno e ácido hialurônico não demonstraram completa eficácia, e devido à falta de evidências científicas que comprovem os seus benefícios, não devem ser considerados medicamentos ideais para o tratamento da doença crônica articular ou osteoartrite (BRANDÃO et al., 2009).

2.2 ANATOMIA ARTICULAR FEMORO-TIBIO-PATELAR

A articulação do joelho ou femoro-tíbio-patelar é classificada como uma articulação composta por conectar três ossos e sinovial por sua composição artrológica ter a presença de tecido conjuntivo fibroso, cartilaginoso e líquido sinovial (FIGURA 1).

Figura 1 Estrutura da articulação femoro-tíbio-patelar.



FONTE: Vanky (1998).

A cápsula articular reveste externamente as articulações sinoviais. A membrana sinovial reveste internamente a cápsula articular, ela produz e absorve o líquido sinovial. A cartilagem articular reveste as superfícies ósseas e reduz o atrito e protege o tecido ósseo. E o líquido sinovial lubrifica o espaço articular e é composto por elementos gordurosos, proteicos e sais minerais (VANKY, 1998).

A cápsula articular no rato, assim como em todos os mamíferos, é formada por duas camadas, sendo a externa ou camada fibrosa constituída por tecido conjuntivo denso modelado que segue em anexo ao periósteo, onde se insere como fibrocartilagem. A outra camada, voltada para a cavidade articular, é formada por um tecido conjuntivo mais frouxo, com fibras colágenas dispostas sem uma orientação definida. Mesclado a esse colágeno, encontramos vasos congestos, tecido adiposo em pequena quantidade, além de células conjuntivas. Recobrimo essa camada, chamada de camada sinovial, e em contato direto com a cavidade e, por conseguinte, com o líquido sinovial, encontramos células achatadas, assemelhando-se a uma membrana serosa (imagens histológicas da cápsula).

A cartilagem tibial: é uma cartilagem hialina, cujos condrócitos se apresentam achatados na face cavitária e vão se tornando globosos em direção ao osso diafisário e ao qual se fundem.

Se comparada a outras cartilagens do mesmo tipo, a matriz territorial e interterritorial é mais escassa; as cavidades que alojam as células não são tão amplas; esse conjunto de achados confere a essa cartilagem um aspecto de maior celularidade. A distribuição dos condrócitos no interior da matriz faz-se desde células isoladas até poucos grupos isogênicos axiais e coronários.

A cartilagem femoral – apesar da ausência de pericôndrio, nota-se um certo grau de diferenciação celular, de condroblastos a condrócitos, desde a face cavitária para o interior, em direção ao osso. Como na cartilagem tibial, os condroblastos da superfície articular são menos achatados, revelando um maior grau de diferenciação celular; aqui se formam mais grupos isogênicos axiais, em duas ou três alturas, o que sugere ser essa cartilagem mais comprida que a outra; notam-se uns poucos grupos isogênicos coronários. A quantidade de matrizes territorial e interterritorial desta cartilagem é maior. E, depois, a acidofilia predominante pode representar uma renovação mais lenta desse tecido (IM et al., 2008)

No envelhecimento natural as alterações que mais chamam a atenção ocorrem na cápsula articular. A camada fibrosa externa exibe as fibras colágenas com direções diferentes e hialinizadas com limites irregulares entre a cartilagem articular e o osso subcondral. Os condroblastos apresentam condrócitos fagocitados em seu interior, sinal claro da atividade imunológica, como citado por IM et al., 2008.

Cartilagem Articular

Ainda que a OA envolva a articulação como um todo, a cartilagem é considerada o tecido central na fisiopatologia da doença, e a condroproteção é tida como o principal alvo para desenvolvimento de DMOAs. A cartilagem é um tecido hipocelular, e os condrócitos representam apenas 1 a 2 % de seu volume total. Sua matriz extracelular abundante é altamente hidratada e especialmente diferenciada para adaptar-se às funções biomecânicas do tecido. Mais de 70% do peso da cartilagem é água, e mais de 90% do seu peso seco corresponde aos dois principais componentes de sua matriz extracelular (MEC), o colágeno tipo II e o agrecan. Diversas outras moléculas fazem parte da organização da MEC da cartilagem, e incluem, por exemplo, colágenos

menores (tipo IX, XI, VI, X, XII e XIV), outros proteoglicanos (decorina, biglican, perlecan, versican), ácido hialurônico, proteína de ligação, COMP, tenascina, fibronectina, dentre outras⁵³. A MEC da cartilagem articular apresenta não apenas um papel estrutural, mas seus elementos interagem com receptores da superfície dos condrócitos, regulando a função dos mesmos. Esses receptores incluem principalmente integrinas, CD-44 e anexinas. Essa interação célula-matriz é importante para os mecanismos de mecanotransdução na cartilagem articular, bem como para a manutenção da homeostasia do tecido (SANDELL, 2011).

A integridade da rede colágena e do agrecan é essencial para manutenção das propriedades biomecânicas da cartilagem articular. O agrecan é uma molécula rica em cargas negativas associadas aos glicosaminoglicanos, sendo portanto altamente hidrofílica, e gerando uma pressão de hidratação na MEC. Essa pressão de hidratação é contrabalanceada e restringida pela rede de colágeno. A fibra de colágeno da cartilagem é heterotípica, formada principalmente pelos colágenos II, IX e XI. O colágeno tipo II forma o arcabouço das fibrilas; o colágeno tipo XI está localizado no interior das fibrilas, sendo fundamental para a fibrilogênese, enquanto o colágeno tipo IX está situado na superfície das fibrilas colágenas, atuando como uma “cola” que liga diferentes fibrilas de colágeno entre si através de interações com o colágeno tipo II, bem como participando da interação das fibras colágenas com proteoglicanos e outros elementos da matriz extracelular (SANDELL, 2011).

O agrecan, principal proteoglicano (PG) da MEC da cartilagem, é uma molécula complexa, formada por um centro proteico ao qual se ligam covalentemente cerca de 100 cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). O agrecan forma um complexo ternário na cartilagem que envolve o próprio agrecan, ácido hialurônico (AH) e proteína de ligação (LP). O centro proteico consiste de três domínios globulares, G1, G2 e G3, e três domínios interglobulares, os domínios de ligação do keratan-sulfato (KS) e do sulfato de condroitina, localizados entre G2 e G3, e um pequeno domínio interglobular entre G1 e G2. A interação entre o agrecan, LP e AH se dá na região do domínio G1 (TORRENT et al., 2011).

Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos lineares formados por repetição de um dissacarídeo, o qual é composto por um açúcar aminado e um ácido urônico. O agrecan é formado por cerca de 100 cadeias de condroitina e 15 a 25 cadeias de KS. No caso do sulfato de condroitina, esse dissacarídeo é formado pela N-acetil galactosamina e pelo ácido glicurônico. A N-acetil-

galactosamina pode ser sulfatada na posição 4 ou na posição 6, formando os dois isômeros do condroitin-sulfato presentes na cartilagem articular: condroitin-4-sulfato (CS4) e condroitin-6-sulfato (CS6). O polímero final formado pelo CS, apresenta em média 40 repetições desse dissacarídeo na cartilagem humana, o que equivale a um peso molecular de aproximadamente 20 KDa (IM et al, 2008).

Um fenômeno bem conhecido dos polissacarídeos biológicos é a microheterogeneidade. Uma preparação de GAG extraída de um tecido conjuntivo apresenta, portanto, uma população heterogênea de moléculas, tanto com diferentes tamanhos de cadeia, como com diferentes padrões de sulfatação. Essa microheterogenicidade é responsável pelos padrões de dispersão encontrados quando esses polímeros são avaliados por métodos como eletroforese em gel de poliacrilamida e diversos métodos de cromatografia (SANDELL et al., 2011).

O significado biológico desta microheterogenicidade não está bem esclarecido, mas provavelmente resulta do processo de síntese desses compostos no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, onde são sintetizados a partir de monossacarídeos precursores, e ligados ao centro proteico à medida que este é sintetizado. Uma alteração no perfil do tamanho molecular dos GAGs da cartilagem articular, em especial do sulfato de condroitina, que é o GAG mais abundante, provavelmente trará alterações para a sua biomecânica, em decorrência de mudanças na densidade de cargas negativas, afetando a pressão de hidratação do tecido e sua compressibilidade.

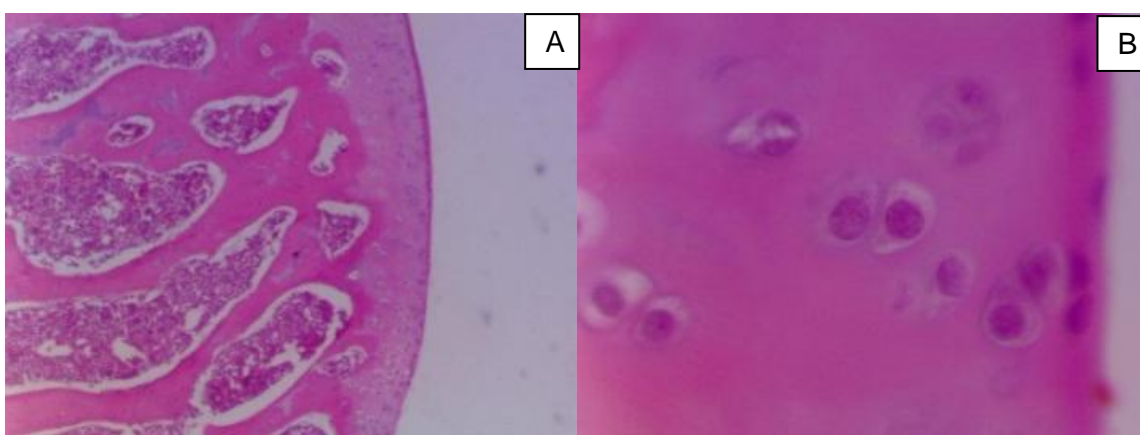
A matriz pericelular, imediatamente adjacente à membrana plasmática dos condrócitos, é formada por grandes quantidades de agregan e relativamente poucas fibras colágenas. Os agregados do proteoglicano se ligam à célula por interação do ácido hialurônico, e possivelmente também do condroitin-sulfato, com receptores CD-44. Contiguamente à matriz pericelular, está a matriz territorial, formada por uma rede de fibras colágenas que envolvem a célula ou grupos de células. O colágeno tipo II nesta região interage com processos citoplasmáticos dos condrócitos através de moléculas de membrana, como a anexina V (ou ancorina CII) e a integrina $\alpha 2\beta 1$ (VANKY et al., 1998).

Esses dois compartimentos definem a matriz extracelular sob a qual os condrócitos exercem controle metabólico ativo, enquanto a MEC interterritorial, que está localizada mais distante das células e contém a maior parte das fibras colágenas e do agregan, é mais inerte metabolicamente (DEL CARLO et. al.,

2007).

A cartilagem possui uma estrutura heterogênea, com quatro regiões reconhecíveis, as quais apresentam diferenças na forma e orientação dos condrócitos, bem como na composição das macromoléculas da MEC: a zona superficial ou tangencial, a zona média ou de transição, a zona profunda ou radial, e a cartilagem calcificada. A cartilagem apresenta ainda uma compartimentalização que reflete a área de influência dos condrócitos sobre a MEC (KERPPERS et al.,2013) (FIGURA 2).

Figura 2- Corte histológico do tecido articular com aspecto normal.



FONTE: Kerppers et al.(2013).

Legenda: A) Tecido conjuntivo com aspecto e coloração normal.

B) Grupos de condrócitos organizados.

2.2 ETIOLOGIA

A OA resulta tanto de eventos mecânicos quanto biológicos que desequilibram o acoplamento normal entre a degradação e a síntese das células na matriz extracelular da cartilagem e do osso subcondral. A doença pode ser iniciada por múltiplos fatores, incluindo fatores genéticos, metabólicos e traumáticos, levando a alterações morfológicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas tanto das células quanto da matriz extracelular, as quais resultam em fibrilação, ulceração e perda da cartilagem articular, e remodelação e esclerose do osso subcondral, com formação de osteófitos (SANDELL et al., 2011).

2.3 FISIOPATOLOGIA DA OSTEOARTRITE

Anteriormente tida como uma doença degenerativa própria do envelhecimento, por uso e desgaste da articulação, a osteoartrose vem sendo considerada mais recentemente como uma doença inflamatória e de intensa atividade metabólica, e o termo osteoartrite (OA) é considerado mais adequado (ATTUR et. al., 2002).

O processo patológico da OA divide-se em três fases: inflamatória, regenerativa e destrutiva.

2.3.1 FASE INFLAMATORIA

A fase inflamatória A ação de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, produtos da cicloxigenase e da lipoxigenase, óxido nítrico, fatores de crescimento, metaloproteinases da matriz cartilaginosa, dentro outros, são os fatores que instalam a inflamação aguda, ocasionando as alterações metabólicas e a sintomatologia.

A sinovite está sempre presente desde as fases iniciais da OA. Esta sinovite é secundária a liberação de fragmentos da matriz extracelular da cartilagem no líquido sinovial, e que a inflamação da sinóvia, com a produção de mediadores inflamatórios, leve a mais degradação da cartilagem, resultando em um ciclo vicioso. A sinovite na OA se caracteriza por hipertrofia e hiperplasia, angiogênese, e infiltração por células inflamatórias que incluem macrófagos, linfócitos B e linfócitos T (ATTUR et. al., 2002).

Em situações inflamatórias, a presença de linfócitos e macrófagos constitui importante fonte de citocinas. Além dos sinoviócitos A e B, que se assemelham a macrófagos e fibroblastos, respectivamente, tendo capacidade de produzir citocinas, o condrócito também está implicado na sua produção (SANDELL,2011).

Tem-se então que, no ambiente articular inflamado, existe uma população residente e de células migradas capazes de iniciar e perpetuar a lesão tecidual. De fato, demonstrou-se expressão de IL-1 α e IL- 1 β em condrócitos e na matriz da cartilagem, sendo mais intensa em espécimes de cartilagem artrósica. *In vitro*, as ações da IL-1 levam à lise da cartilagem, por ativação da síntese de metaloproteinases da matriz (MMP) e redução da síntese dos fatores tissulares de inibição das metaloproteinases (TIMP), além de inibição direta da síntese de colágeno e de proteoglicanos. O TNF- α age em sinergismo com a IL-1, além de promoverem liberação de prostaglandina E2 e

de IL-6. Esta última potencia os efeitos da IL-1. Quanto à PGE₂, além de promover aumento de permeabilidade vascular e vasodilatação, estimula reabsorção óssea e aumenta a expressão do receptor de IL-1. Em contraposição, o TGF- β e o IGF-1 antagonizam esses efeitos por induzirem aumento da síntese de proteoglicanos, o TGF- β aumentando diretamente a produção de TIMP tanto a nível de tradução como de síntese proteica. *In vivo*, a administração de IL-1 promove degradação da cartilagem articular, efeito esse que é potenciado na presença de TNF- α . A ação conjunta das citocinas é mais importante do que o seu efeito isolado (SILVA, 2007 e VERHAGEN et. al., 2019).

No modelo de transecção do ligamento cruzado anterior do joelho de cães, demonstrou-se que o tratamento com um antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) protegeu para o surgimento de lesões artrósicas, possivelmente por supressão de atividade da colagenase (SILVA, 2007).

Esse tipo de estratégia terapêutica começa a ser visualizado, e de fato já se avaliou a segurança da injeção intraarticular de IL-1RA recombinante humano em pacientes com OA de joelhos, primeiro passo na direção de um estudo clínico. O bloqueio do TNF- α também tem sido aventado, e o uso de inibidores de citocinas, análogo ao que tem sido aplicado ao tratamento da artrite reumatóide, pode oferecer uma terapêutica alvo-específica em um futuro próximo (HUANG et. al., 2008).

Além dos prostanóides, os leucotrienos, particularmente o leucotrieno B₄ (LTB₄), têm sido associados à lesão articular em osteoartrose experimental (ATTUR et. al., 2002).

Além de ativar neutrófilos e macrófagos, promovendo “burst” oxidativo e conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio, o LTB₄ é capaz de estimular a produção de citocinas tais como IL-1, IL-6 e IL-8. *In vitro*, demonstrou-se que o LTB₄ estimulou a produção de IL-1- β e TNF- α pela sinóvia de pacientes com OA, e que a adição de um inibidor de lipoxigenase inibiu esse efeito³³. Em recente revisão do assunto, admite-se que bloqueadores duais de ciclo e lipoxigenase podem ter mais eficácia em osteoartrite quando comparados a inibidores apenas de cicloxigenase (ATTUR et. al, 2002).

O óxido nítrico (NO) está envolvido no catabolismo da cartilagem articular. A cartilagem artrósica produz grandes quantidades de NO, e um nível elevado de nitrito/nitrato tem sido encontrado no líquido sinovial e no soro de pacientes com OA (BAIME,2006).

2.3.2 FASE REGENERATIVA

Na fase regenerativa verifica-se um aumento da atividade biossintética onde os condrócitos são estimulados a produzir matriz extracelular por ação de diversas citocinas anabólicas. Posteriormente ocorre uma fase destrutiva na qual a ação de diversas citocinas, que levam a uma diminuição da matriz, quer por provocarem aumento da sua degradação através das metaloproteinases, ou por diminuírem a sua síntese (ATTUR et. al., 2002).

2.3.3 FASE DEGENERATIVA

A perda do equilíbrio entre as fases inflamatória e regenerativa originam modificações estruturais que levam à degeneração articular com perda funcional da articulação afetada (SANDELL,2011).

A sinovite persistente com fibrose da cápsula articular, frouxidão ligamentar e atrofia da musculatura periarticular também fazem parte do quadro da OA, que pode ser considerada como um estado de insuficiência de toda a articulação diartrodial. Para compensar a perda de função desenvolvem-se na articulação um conjunto de respostas adaptativas inadequadas, que levam ao aparecimento da sintomatologia associada a OA, destacando-se a dor que surge devido à ativação de receptores nociceptivos nos diferentes componentes articulares (SHAKYA et. al.,1998).

2.3.4 Dor e Sintomatologia

A existência de um estímulo nociceptivo constante e de um ambiente inflamatório intenso nas estruturas lesadas promovem alterações metabólicas, neuroquímicas e estruturais ao nível dos sistemas nervosos periférico e central. Estas alterações traduzem-se posteriormente numa hiperexcitabilidade das vias aferentes nociceptivas perpetuando e exacerbando a OA e a dor associada e eventualmente provocando alodínia e hiperalgesia crônica.

Quando se manifesta clinicamente, caracteriza-se por dor articular, limitação de movimentos, crepitação, deformidade articular e ocasionalmente derrame articular, sem manifestações sistêmicas. Apesar de poder afetar qualquer articulação sinovial, acomete mais frequentemente joelhos, quadris, mãos e coluna, podendo ocorrer em uma única articulação, mas habitualmente

é poliarticular. Em geral, uma vez sintomático, o paciente passa a apresentar dor constante pelo resto de sua vida, e a incapacidade funcional piora progressivamente. Mas a sua evolução é heterogênea, e enquanto boa parte dos pacientes realmente piora da dor e função, muitos permanecem com a sintomatologia estável ou mesmo melhoram (SHAKYA et. al., 1998).

A piora sintomática envolve diversos fatores, e a progressão do dano estrutural nem sempre se acompanha de piora clínica. Em mulheres acima de 65 anos com OA de quadril radiográfica, por exemplo, 64,6% das articulações avaliadas apresentaram piora radiológica, 22,8% das pacientes apresentaram piora funcional, e 12,9% das pacientes evoluíram para colocação de prótese de quadril (BAIME, 2006).

Fatores psicossociais, como nível educacional, depressão, ansiedade, capacidade de lidar com a doença, além da presença de outras comorbidades, estão associados à piora sintomática.

A dor é a manifestação clínica central da OA e a principal razão pela qual os indivíduos afetados procuram por assistência médica. Dada a inexistência atual de terapêuticas eficazes capazes de modificar sua evolução natural, o tratamento da OA é essencialmente o tratamento da dor. Contudo, os mecanismos envolvidos na gênese da dor articular na OA são pouco compreendidos, o que se reflete na baixa eficácia das medicações disponíveis.

Uma das dificuldades na interpretação do fenômeno doloroso na OA é a falta de correlação observada entre lesão estrutural e sintoma. Sabe-se que pessoas com alterações radiográficas compatíveis com OA têm uma chance maior de apresentar dor do que indivíduos sem esse tipo de alteração. Contudo, nem todos aqueles que apresentam alterações radiográficas queixam-se de dor (CAMANHO, 2001).

No estudo de ATTUR, 2002, por exemplo, dor no joelho foi relatada por 8,8% dos indivíduos entre 65 e 74 anos com radiografia normal, 20,4% daqueles com alterações radiográficas grau 1 conforme a classificação de Kellgren-Lawrence (K-L), 36,9% dos pacientes com K-L grau 2, e 60,4% dos pacientes com K-L graus 3 e 4 (SHAKYA et. al., 1998).

Tão importante quanto compreender por que pacientes com OA apresentam dor, é entender por que muitos pacientes com dano articular são assintomáticos. O descompasso entre estrutura e dor tem implicações para o desenvolvimento de drogas modificadoras de doença, e é um dos fatores limitantes na interpretação do significado de estudos clínicos com candidatos a DMOAs. Demonstrou-se que diacereína, sulfato de condroitina e doxiciclina,

por exemplo, foram capazes de reduzir a taxa de progressão da perda da cartilagem articular sem que tal modificação estrutural tenha se acompanhado de benefício sintomático. A cartilagem, tecido tido como central na OA, não é inervada e, não pode ser a fonte da dor. Vários estudos têm demonstrado a presença de fibras nervosas aferentes na cápsula articular, sinóvia, periósteo, osso subcondral, ligamentos e tendões. Cerca de 20% dessas fibras nervosas são mielinizadas, sendo que a maioria pertence ao grupo III (fibras Ad) de nociceptores finamente mielinizados, enquanto um número relativamente pequeno de fibras do tipo II (A β), com maior diâmetro e baixos limiares de ativação, também inerva a articulação. Os outros 80% são fibras não mielinizadas, e cerca de 50% destas fibras pertencem ao grupo IV (tipo C), sendo as demais eferentes simpáticos.

A rede de fibras nervosas aferentes pode detectar tanto estímulos mecânicos normais como nocivos. A sensação primária nas articulações é a dor, uma vez que a informação sensorial envolvida no sentido de posição e movimento não alcança um nível consciente. As fibras pertencentes aos grupos III e IV constituem-se nos nociceptores primários e apresentam limiar elevado, não sendo ativadas por estímulos do cotidiano. Já as fibras de baixo limiar do tipo II estão associadas ao movimento, propriocepção, e também a dor.

Numa situação de inflamação articular, as fibras do grupo II apresentam alterações agudas e transitórias em resposta à manipulação da articulação, resolvendo-se em poucas horas. Já as fibras dos grupos III e IV passam tanto a apresentar atividade espontânea, como se tornam responsivas a estímulos mecânicos externos aos quais eram previamente insensíveis (IM et.al., 2008).

Sabe-se que o sistema nervoso atua não apenas como um expectador passivo no processo de nocicepção, transmitindo uma representação do tecido lesado ao centro de dor, mas participa na persistência da dor através do desenvolvimento de mudanças funcionais ou neuroplasticidade (IM et.al., 2008). O conceito de neuroplasticidade envolve o aumento na eficácia da condução sináptica, ou sensibilização, através de alterações na localização e expressão de canais iônicos e receptores, e na distribuição e cinética de neurotransmissores e neuromoduladores. Em uma situação de dor, os eventos agudos podem desencadear mecanismos de sensibilização do sistema nervoso periférico, medula espinhal e do córtex cerebral, levando a dor crônica (SHAKYA et. al., 1998).

Esse estado de facilitação da condução sináptica pode ser de curta duração, ou ainda persistir por dias, meses, ou mesmo ser irreversível. Quando

um tecido normal é exposto a um estímulo nocivo, a dor resultante reflete a intensidade, a localização e o tempo de aplicação do estímulo. Em tecidos inflamados, a dor pode ocorrer espontaneamente, independente da aplicação de um estímulo externo. Hiperalgisia, com aumento da intensidade de resposta a estímulos nocivos e alodínia, quando estímulos inócuos produzem dor, também são conseqüências dessa inflamação. A dor relacionada aos movimentos na OA pode ser considerada um exemplo de alodínia mecânica (SHAKYA et. al., 1998).

Os mediadores inflamatórios, portanto, têm importante influência na ativação e sensibilização de nociceptores, produzindo tanto alterações precoces pós-translacionais, quanto induzindo alterações de longo prazo por modificações transcricionais e mudanças fenotípicas nas células. Durante a inflamação aguda, as prostaglandinas, a bradicinina, o fator de crescimento de nervo (NGF), entre outros mediadores inflamatórios, modificam a sensibilidade dos receptores e reduzem o limiar de ativação dos canais iônicos. Esses mediadores também podem levar a alterações transcricionais de longo prazo, que envolvem aumento na produção de receptores, canais iônicos, neurotransmissores e neuromoduladores⁴⁵. Citocinas como TNF- α e IL-1 β induzem hiperalgisia em modelos experimentais, enquanto anticorpos contra essas citocinas estão associados à antinocicepção em modelos animais e em pacientes com artrite reumatóide. O mecanismo de hiperalgisia associado a essas citocinas tem sido geralmente atribuído a uma ação indireta, envolvendo a produção de prostaglandinas e outros mediadores. Contudo, algumas evidências recentes sugerem um efeito direto do TNF- α nos nociceptores. Os mecanismos de sensibilização e neuroplasticidade na dor articular foram caracterizados em modelos experimentais de inflamação intensa e têm papel ainda não definido na OA, onde os fenômenos inflamatórios são de pequena intensidade. Algumas observações em pacientes, contudo, tem sugerido a participação de mecanismos de sensibilização do sistema nervoso na gênese da dor na OA, o que poderia explicar parcialmente a freqüente dissociação entre lesão estrutural e sintoma (IM et.al., 2008).

Os pacientes com OA de membros inferiores (joelho ou quadril) apresentaram períodos mais prolongados de hiperalgisia e maiores áreas de dor referida após a injeção de salina hipertônica no músculo tibial anterior, quando comparados a controles sem AO (IM et.al., 2008).

Os pacientes com OA de joelhos apresentaram um aumento na intensidade da dor desencadeada por pressão em áreas distantes da

articulação afetada, nos ombros e nos braços (ATTUR et. al., 2002).

Também já foi demonstrado que pacientes com OA de quadril apresentam um menor limiar de dor para pressão aplicada tanto sobre o quadril acometido quanto sobre o quadril contralateral. Mais interessante, contudo, é o fato dessa hiperalgesia ser revertida com a troca da articulação doente por uma prótese de quadril.

Esses mesmos pacientes com OA de quadril também não apresentaram um aumento do limiar de dor quando uma contra-estimulação, um torniquete no membro superior causando dor isquêmica, foi aplicada, sugerindo alteração nos mecanismos do controle inibitório nocivo difuso: a aplicação de um estímulo doloroso em um lugar do corpo pode reduzir a dor em outro local. Tal alteração também foi revertida após cirurgia de prótese articular. Dessa forma, a correção da lesão estrutural e a suspensão do estímulo nociceptivo na articulação podem fazer com que os limiares de dor e o controle inibitório central retornem ao normal. Imagens de ressonância nuclear magnética (RNM) têm permitido uma avaliação mais detalhada das alterações estruturais na OA e acrescentado novas informações sobre que estruturas inervadas da articulação estão envolvidas na gênese da dor. Tem sido demonstrada uma associação de alterações do osso subcondral e dor, reacendendo o debate sobre a importância relativa desse tecido e da cartilagem nos fenômenos da articulação artrósica.

Em pacientes com OA de joelhos, edema ósseo (“bone marrow edema”) esteve presente em 78% dos pacientes com dor, e em apenas 30% do grupo sem dor ($p < 0,001$). Quando essas lesões foram graduadas de 0 a 3, lesões mais extensas (graus 2 e 3) estiveram presentes em 36% dos com dor *versus* 2% dos sem dor (HUANG et. al., 2008).

Estudos histológicos realizados em pacientes com edema óssea na RNM mostraram alterações sugestivas de remodelamento ósseo intenso, além de fibrose e áreas de osteonecrose, e surpreendentemente, pouco ou nenhum edema. A presença de espessamento sinovial na RNM, sugerindo sinovite, bem como a presença de efusão articular, também guardam correlação com dor em pacientes com OA de joelhos (IM et.al., 2008).

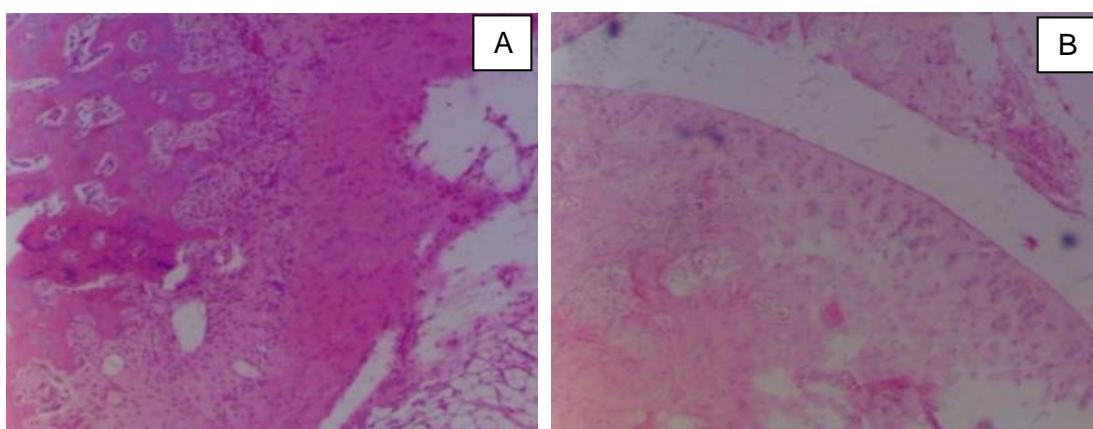
2.3.5 HISTOPATOLOGIA

As alterações histopatológicas encontradas na articulação artrósica são inicialmente focais e localizadas principalmente em áreas de maior sobrecarga

mecânica na superfície articular. Porém, à medida que a doença progride, as lesões se estendem horizontalmente na articulação, podendo afetar extensas áreas do tecido. As lesões mais precoces limitam-se às regiões mais superficiais, progredindo em gravidade com o acometimento progressivo de regiões mais profundas, o que pode resultar em áreas de perda completa do tecido e exposição do osso subcondral (OSTERGAARD et. al., 1997).

A progressão dessas alterações pode ser graduada semi-quantitativamente permitindo acompanhar sua evolução e avaliar a resposta de DMOAs (FIGURA 3).

Figura 3- Corte histopatológico de Osteoartrite



FONTE: Kerppers et al.(2013).

Legenda: Observam-se exsudado proteico de intensidade moderada, presença de células polimorfonucleares moderada e degeneração da cartilagem articular em região medial (A). Os condrócitos apresentam-se de forma desorganizada e infiltrado proteico moderado (B).

Um desses sistemas recém descrito classifica a gravidade da lesão em seis graus (PRITZKER,2006).

Grau 1: caracteriza-se por fibriliação superficial, edema focal ou generalizado da cartilagem, proliferação e hipertrofia dos condrócitos, com formação de *clusters* (aglomerados), e perda da orientação normal das células. Necrose e apoptose dos condrócitos, com condrons vazios ou “fantasmas”, já podem ser observadas.

Grau 2: Caracteriza-se por exfoliação, ou destacamento de fragmentos de cartilagem da camada superficial, com redução da coloração da matriz pela safranina O ou azul de toluidina, refletindo perda de proteoglicanos, nas regiões mais superficiais da cartilagem. Tanto a proliferação como morte dos condrócitos acentuam-se com a progressão da doença.

Grau 3: As fissuras se estendem até a zona de transição, com heterogeneidade da matriz, e áreas de coloração acentuada intercaladas com áreas de intensa depleção do corante (safranina e toluidina). As alterações dos condrócitos tornam-se muito evidentes, com maior proliferação e desorientação, e também mais morte celular, principalmente nas regiões próximas às fissuras.

Grau 4: Aparecem regiões de delaminação do tecido e áreas de escavação, com erosões profundas e por vezes coalescentes. Ocorre intensa perda da coloração por safranina O e azul de toluidina, e tanto as alterações proliferativas quanto associadas à morte dos condrócitos continuam evidentes. Fragmentos que se desprendem da cartilagem podem por vezes ser visualizados como corpos livres.

Grau 5: caracteriza-se por áreas de desnudante, com exposição do osso subcondral subjacente.

Grau 6: Caracteriza-se por deformidades do osso subcondral.

A lesão da cartilagem articular progride num ambiente em que tanto ocorre catabolismo e degradação, como anabolismo e tentativa de reparo pelos condrócitos. A síntese de proteoglicanos, colágeno, proteínas não colagenosas e DNA está significativamente aumentada na cartilagem artrósica, mantendo-se aumentada até as fases mais avançadas da doença, explicando a lenta progressão do dano da cartilagem na OA. A destruição dos elementos da MEC envolve a liberação de colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), agrecanases (ADAMTS -4 e ADAMTS-5), plasmina, catepsina B, dentro outras enzimas. Os fenômenos de degradação e síntese são modulados por citocinas, em particular TNF-a e IL-1, e por fatores de crescimento, como IGF-1 e BMPs, além dos inibidores das MMPs (TIMPs) (GERWIN, 2010).

O desbalanço na síntese e degradação de PG é muito importante na patogênese do dano da cartilagem. Em particular, a síntese de PG na OA produz moléculas qualitativamente diferentes daquelas da cartilagem articular adulta normal, alterações estas que englobam tanto a composição e distribuição de GAGs, como o tamanho do centro proteico e sua capacidade de se ligar ao ácido hialurônico. A concentração do KS cai na cartilagem artrósica, enquanto a taxa CS4 /CS6 aumenta, simulando o perfil mais característico de uma cartilagem imatura (PRITZKER, 2006).

A concentração de PG cai progressivamente com o avanço da doença (OSTERGAARD, 1997).

2.3.6 TERAPIA FARMACOLOGICA

O tratamento clínico da OA permanece paliativo e pouco eficaz (BAIME,2006).

Nenhuma terapêutica produz o benefício sintomático da prótese articular de joelho ou quadril (VERHAGEN et.al., 2019).

Essa realidade representa um desafio para a pesquisa médica, em particular para a Reumatologia. Um considerável esforço tem sido empreendido pela comunidade acadêmica e pela indústria farmacêutica para compreender e explorar as diversas vias etiopatogênicas envolvidas na iniciação e progressão da doença no sentido de desenvolver drogas capazes de modificar sua evolução natural, as chamadas Drogas Modificadoras da Osteoartrite (DMOAs). Compostos capazes de bloquear a ação de enzimas degradadoras da matriz extracelular e de citocinas inflamatórias, e de alterar o metabolismo ósseo, têm sido testados em animais e em estudos clínicos. Implícito no conceito de modificar a evolução da lesão estrutural estaria a idéia de que isto melhoraria os sintomas e qualidade de vida, o que porém não está completamente estabelecido (TORRENT et.al., 2014).

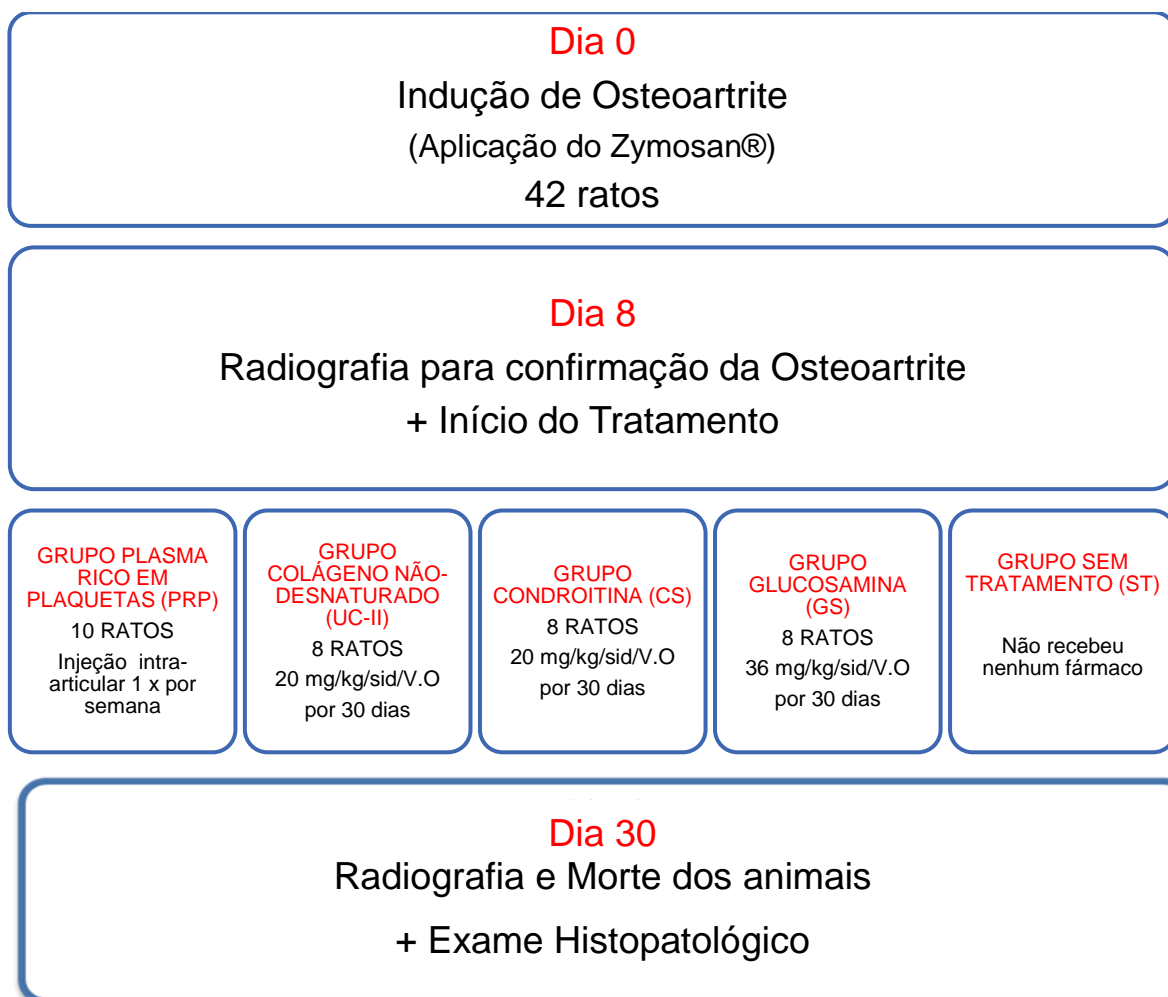
Entre os candidatos a DMOA, sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina encontram-se no cerne de intenso debate na literatura. Apesar de existirem evidências em estudos clínicos bem desenhados de que tanto sulfato de glicosamina (SILVA, 2007), quanto sulfato de condroitina (MELO et al., 2008) reduzem a perda do espaço articular radiográfico em pacientes com OA de joelhos, críticas com relação a padronização utilizada na obtenção das radiografias e estudos posteriores que não confirmaram melhora sintomática tem posto em cheque o benefício desses compostos (BAIME, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo tem caráter experimental, e para isso, foi utilizado modelo de indução de osteoartrite com *Saccharomyces cerevisiae* (Zymosan A® 250 mg, Sigma Chemical Co.) em ratos Wistar (KERPPERS, 2013). A metodologia utilizada neste experimento segue abaixo (QUADRO 1).

Quadro 1 Metodologia utilizada neste experimento



O estudo foi realizado no biotério do Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) do Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná (FEMPAR) abordando a área de concentração de reparação de tecidos e órgãos e reação orgânica à lesão celular e tecidual. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo experimental de animais sencientes previstos na legislação brasileira - Lei Arouca nº 11.794 (BRASIL,2013), e somente foram colocados em prática após parecer favorável do Comitê de Ética em Uso de animais sob número de protocolo 1097/2017 (ANEXO 1).

3.1.1 – ANIMAIS

Foram utilizados 42 ratos machos, adultos, raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com peso de 280-300 g e 90 dias de idade, provenientes do biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar). Os animais foram aclimatizados na sala do Biotério do IpeM (FIGURA 4) com temperatura constante de 22°C com ciclos luminosos de 12/12 horas, controle de ruídos e umidade do ar entre 40-60%, e alojados em gaiolas do tipo III (4 ratos por gaiola de polipropileno e grade de inox), com ração para ratos (Purina®) e água *ad libitum* durante o período do experimento.

Figura 4- O Biotério



FONTE: O autor (2018).

Legenda: A) sala aclimatizada do biotério do IPEM.

B) modelo da gaiola utilizada no estudo.

3.2- PROTOCOLO ANALGÉSICO E ANESTÉSICO

A injeção do agente indutor de osteoartrite foi realizada sob anestesia geral inalatória, com o uso de isofluorano (2 a 5% em oxigênio, Instituto Biochimico Indústria Farmacêutica, Brasil). Este procedimento foi realizado individualmente. A indução anestésica foi feita em câmara de indução (FIGURA 5), quando os animais demonstraram perda do movimento das vibrissas nasais.

Figura 5 Equipamentos para anestesia



Fonte: O autor (2018).

Legenda: A) Equipamento anestésico inalatório.

B) Câmara de indução anestésica.

Após ser retirado da câmara de indução, o rato ainda era mantido com um equipamento inalatório diretamente acoplado ao focinho, até que fosse finalizada a injeção (FIGURA 6).

Figura 6 - Equipamento inalatório para manutenção anestésica



FONTE: O autor (2018).

3.3 – INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE

No dia 0 do experimento, os animais foram anestesiados (protocolo anestésico no item 2.3) e realizada artrocentese da articulação femoro-tibio-patelar direita dos 42 animais seguindo as técnicas antissépticas e foram realizadas a injeção intra-articular do composto Zymosan A® 250 mg (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma Chemical Co.) dissolvido em 10 ml de água para injeção na dose de 50 microlitros em dose única para indução experimental da osteoartrite (KERPPERS, 2013). (FIGURA 7)

Figura 7 Injeção intra-articular de Zymosan A ®



FONTE: O autor (2018).

3.4 EXAME RADIOGRÁFICO

Para a realização das radiografias, foi utilizado um aparelho de raio x digital portátil (FIGURA 8) e sem sedação dos animais no oitavo dia e imediatamente após a morte dos animais no trigésimo dia.

Figura 8 Equipamentos utilizados para as radiografias



Legenda: A) Monitor radiológico.

B) Aparelho radiográfico digital.

Foram realizadas duas projeções radiográficas (latero-lateral e crânio-caudal) das articulações femoro-tibio-patelar de ambos os membros (FIGURA 9 e 10). A imagem da articulação direita ao oitavo dia para a confirmação da lesão articular pós-indução da osteoartrite, e a imagem da articulação contralateral para o controle comparativo. E a imagem bilateral das articulações ao trigésimo dia de tratamento, para a avaliação da efetividade terapêutica.

Figura 9 Incidência Radiográfica Latero-Lateral



FONTE: O autor (2018).

Figura 10 Incidência Radiográfica Cranio-caudal



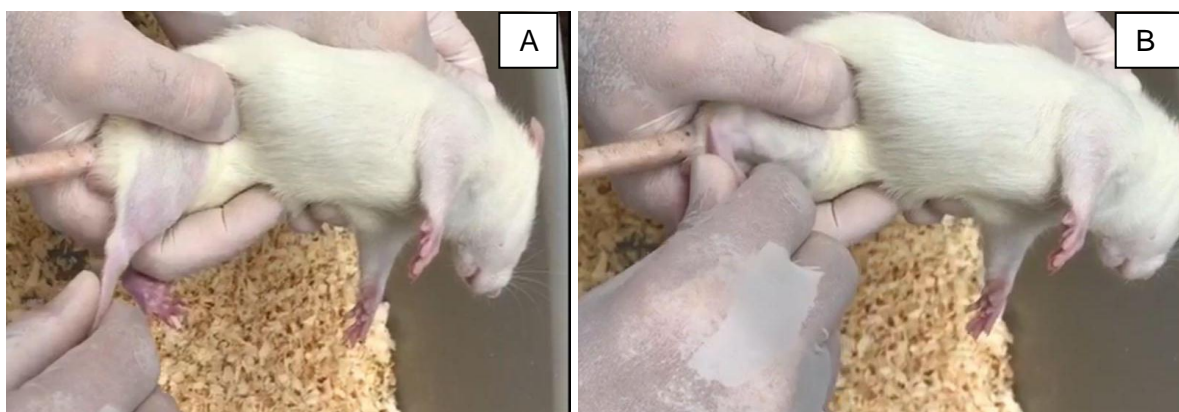
FONTE: O autor (2018).

3.5 KNEE BEND TEST

Para todos os ratos, foi analisada a nocicepção induzida pelo movimento, com os testes comportamentais “Knee-Bend” para avaliação do normal desenvolvimento da doença articular.

Para realização do teste, os animais são suavemente imobilizados, permitindo acesso à ambos os membros pélvicos, e ao mesmo tempo restringindo movimento. O teste consiste em registrar o número de vocalizações e / ou resistência em resposta à flexão e extensão da articulação do joelho, realizada pelo mesmo experimentador, dentro de seus limites de movimento. Em cada teste foram realizadas 5 flexões e 5 extensões da articulação do joelho, e o número total de vocalizações / resistência é registrado (Figura 11).

Figura 11 Knee Bend Test



FONTE: O autor (2018).

Legenda: A) Extensão forçada da articulação.

B) Flexão forçada da articulação.

A escala de avaliação se dá da seguinte maneira: escore 0 é dado para nenhuma resposta a qualquer tipo de extensão ou flexão da articulação; pontua 0,5 quando o rato exerce resistência à flexão / extensão máxima; escore 1 quando demonstra resistência à moderada flexão / extensão e também nas vocalizações para flexão / extensão máxima; e o escore 2 é dado para vocalizações em resposta à manipulações moderadas (flexões e extensões) da articulação. A soma das reações registradas, somam um máximo de 20 pontos, o que representa o escore de flexão do joelho, uma indicação da nocicepção do animal (QUADRO 2).

Quadro 2 Escala de avaliação do escore do KNEE BEND TEST

Knee Bend Test	Escore
Nenhuma resposta à extensão ou flexão	0
Resistência leve à flexão e/ou extensão	0,5
Resistência moderada à flexão e/ou extensão + vocalização	1
Vocalizações + relutância em todas as flexões e extensões	2
Total	Máximo 20

3.6 ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS

Os 42 ratos foram distribuídos de forma randomizada em 5 grupos de 8 animais cada (Karapolat;2008) e o início da medicação dos animais foi no oitavo dia de experimento, após a confirmação da lesão articular.

- Grupo Plasma rico em Plaquetas (PRP)

Os 5 animais receberam o plasma rico em plaquetas na dose de 0,2 ml pela via intra-articular na articulação femoro-tibio-patelar direita a cada 7 dias no total de 4 aplicações (GOBBI et al,2012).

Foi coletado 1 ml de sangue da veia jugular externa e armazenado no tubo com citrato de sódio à 3,2%. A coleta foi realizada sob sedação dos ratos, utilizando o protocolo de indução com isofluorano. O plasma foi extraído da centrifugação do sangue por 9 minutos a 3.500 rpm.

- Grupo Colágeno não-desnaturado (UC-II)

Foi administrado o colágeno não-desnaturado (UC-II) na dose 20 mg/kg/SID por via oral por 30 dias, na dose de 0,5 ml. O fármaco continha flavorizante sabor morango para otimizar a palatabilidade .

- Grupo Sulfato de Condroitina (CS)

Recebeu o sulfato de condroitina 20 mg/kg/SID por via oral por 30 dias, na dose de 0,5 ml. O fármaco continha flavorizante sabor morango para otimizar a palatabilidade.

- Grupo Sulfato de Glucosamina (GS)

Receberá sulfato de glucosamina 36 mg/kg/SID por via oral por 30 dias, na dose de 0,5ml. O fármaco continha flavorizante sabor morango para otimizar a palatabilidade.

- Grupo Sem Tratamento

Não recebeu nenhum medicamento condroprotetor para servir de controle.

3.7 MORTE DOS ANIMAIS

A morte dos animais com 31 dias de experimento, foi provocada pelo método de injeção peritoneal do anestésico dissociativo cetamina na dose de 10 mg/kg, associado ao anestésico local lidocaína na concentração de 10 mg/ml e após a verificação do estado inconsciente do animal, foi realizada injeção intracárdica de cloreto de potássio na dose de 10 mg/kg que promoveu apnéia e assístole (BRASIL, 2013).

Após a confirmação do óbito do animal, forão coletadas as cartilagens subcondrais da articulação femoro-tibio-patelar direita e encaminhados para a análise histopatológica.

3.8 EXAME HISTOPATOLÓGICO

As peças anatômicas da articulação femoro-tibio-patelar direita foram mantidas em solução fixadora e descalcificante de formol 10% associado ao ácido fórmico 5% por 60 dias, a qual era trocada a cada cinco dias. Após completa descalcificação, as amostras foram submetidas ao processamento de rotina para histopatologia. Os cortes histológicos seriados de 5 µm foram corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Mallory.

De cada animal de seus respectivos grupos foram avaliados os parâmetros:

- Cartilagem
- Condrócitos
- Sinóvia
- Reação inflamatória

Com relação à cartilagem, 11 parâmetros foram avaliados microscopicamente e foi conferido o valor sequencial de 01 a 11, cuja soma totalizou o valor 66. Este critério utilizado baseou-se no trabalho de OSTERGAARD et al., 1997, que criou este método de avaliação e pontuação de lesões em articulação. Assim sendo, à presença das lesões de cartilagem nos animais de cada grupo foi conferido o respectivo valor, o que gerou uma soma. A partir desta soma foi interpretada a severidade das lesões. Na avaliação de condrócitos se utilizou o mesmo critério para cinco parâmetros cuja soma foi o valor 15. Os grupos isógenos de condrócitos se referem à atividade regenerativa da cartilagem. Com relação à sinóvia foram oito parâmetros avaliados, somando ao valor 36. No critério inflamação, são quatro parâmetros: discreta, moderada, severa e miosite adjacente. Este soma o valor 10.

3.9 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Para a aferição dos resultados no exame radiográfico, foi utilizado o teste de Wilcoxon, que é um teste de hipóteses não paramétrico utilizado quando se deseja comparar duas amostras relacionadas, amostras emparelhadas ou medidas repetidas em uma única amostra para avaliar se os postos médios populacionais diferem.

Para verificação da influência dos tratamentos entre as distribuições dos índices do exame radiográfico e histopatológico, que analisou a cartilagem, os condrócitos, a sinóvia e o índice de inflamação, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes; seguido pelo *post hoc* para verificar quais pares de tratamentos eram diferentes foi utilizado teste de Dunn com correção de Bonferroni.

O teste de Kruskal-Wallis é uma análise de variância não paramétrico comparativo para testar se as amostras se originam da mesma distribuição, independente de tamanhos iguais ou diferentes. Como este presente experimento possui 5 grupos, é o teste indicado pois faz a avaliação à partir de dois grupos.

Um teste de Kruskal-Wallis com resultados significativos indica que ao menos um grupo domina as variâncias de resultados sobre outro grupo. Mas este teste não demonstra onde está a dominância sobre as variâncias ou para quantos pares de grupo ocorre esta dominância, então para esta identificação, foi realizado o teste de Dunn com a correção de Bonferroni, que auxilia na análise dos pares específicos de amostras para dominância variável. Este teste de hipóteses, é baseado na rejeição de uma hipótese nula caso probabilidade

dos dados observados acontecerem ao acaso (estritamente, sob-hipóteses nulas) for baixa. Se várias hipóteses forem testadas, a chance de um evento raro aumenta e a probabilidade de rejeitar incorretamente uma hipótese nula aumenta. A correção de Bonferroni compensa esse aumento testando cada hipótese individual em um nível de significância maior de onde é o nível alfa geral desejado e é o número de hipóteses.

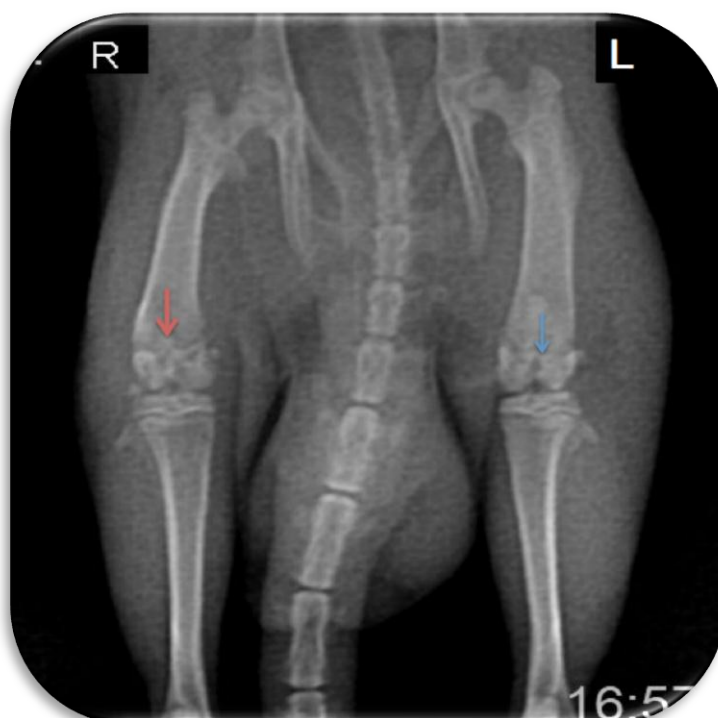
Para análise da associação entre Knee Bend Test e o resultado da radiografia foi usado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

4 RESULTADOS

4.1 LAUDO RADIOGRÁFICO

As imagens radiográficas da articulação femoro-tibio-patelar foram realizadas nas incidências crânio-caudal (FIGURA 12).

Figura 12 Incidência crânio-caudal

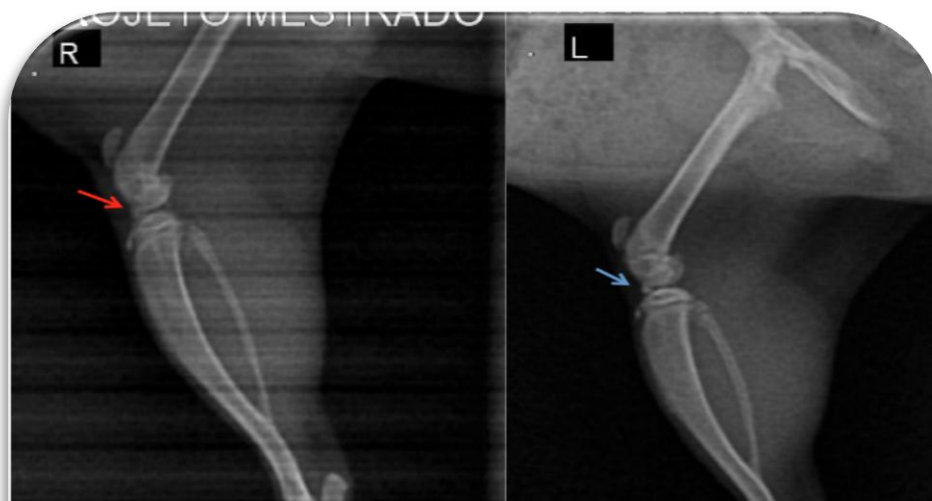


FONTE: O autor (2018).

Legenda: R) Joelho direito, esclerose óssea (seta vermelha) ,
L) Joelho esquerdo , superfície cranial normal (seta azul).

A incidência latero-lateral evidenciou sinais objetivos de OA, como: osteófito em côndilo lateral tibial, estreitamento do espaço articular, perda da definição radiotransparente da borda distal da fossa intercondilar) em todos os animais dos cinco grupos . A articulação do membro esquerdo (controle) se mostrou sem alterações no oitavo dia. A radiografia foi realizada oito dias após a lesão experimental (FIGURA 13).

Figura 13 Incidência Latero-lateral



FONTE: O autor (2018).

Legenda: R) Joelho direito, esclerose óssea (seta vermelha),

L) Joelho esquerdo , superfície cranial normal (seta azul).

O resultado das radiografias realizadas ao oitavo dia do experimento (sem a instituição de tratamento) e ao trigésimo dia do início do tratamento (APENDICE 1), foram graduadas de acordo com os sinais radiográficos de osteoartrite, conforme citado por HASSAN (2015), onde o padrão imaginológico de esclerose recebeu a pontuação 1, erosão ou lise óssea pontuação 2 e formação de osteófitos articulares recebeu 3 de pontuação (Quadro 3):

Quadro 3 Graduação das lesões articulares

Alterações radiográficas	Nº
Esclerose óssea	1
Erosão/lise óssea	2
Osteófitos	3

GRUPO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)- 8º dia de experimento

A incidência crânio-caudal revidenciou sinais de osteoartrite na articulação direita (osteófito em face articular caudal e superfície articular do côndilo femoral medial com esclerose) e sem alterações na articulação esquerda (superfície cranial normal entre os côndilos femoral e tibial e menisco) (FIGURA 14).

Figura 14 Diminuição do espaço articular e esclerose óssea. 8º dia de experimento, articulação femoro-tíbio-patelar.



FONTE: O autor (2018).

Legenda: Diminuição do espaço articular (seta) e esclerose óssea. Rato grupo PRP, Incidência crânio-caudal.

GRUPO COLÁGENO NÃO-DESNATURADO (UC-II)- 8º dia de experimento

Na incidência latero-lateral foi possível visualizar sinais de osteoartrite na articulação direita, devida a presença de osteófito em face articular caudal e superfície articular do côndilo femoral medial, e sem alterações na articulação esquerda (superfície cranial normal entre os côndilos femoral e tibial e menisco) (FIGURA 15).

Figura 15 Osteófitos na face caudal articular, 8º dia de experimento, Articulação femoro-tíbio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Legenda: Osteófitos (seta) Diminuição do espaço articular. Rato grupo UC-II, Incidência latero/lateral

GRUPO CONDROITINA (CS)- 8º dia de experimento

A incidência crânio-caudal evidenciou sinais de osteoartrite na articulação direita (esclerose em face articular cranial e diminuição do espaço articular (FIGURA 16)).

Figura 16 Esclerose óssea, 8º dia de experimento, Articulação femoro-tíbio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Legenda: Esclerose óssea (seta). Rato grupo CS, Incidência crânio-caudal

GRUPO GLUCOSAMINA (GS)- 8º dia de experimento

Na incidência latero-lateral foi possível visualizar sinais de osteoartrite na articulação direita, devida a presença de erosão óssea no côndilo tibial lateral (FIGURA 17).

Figura 17 Erosão óssea no côndilo tibial, 8º dia de experimento. Articulação femoro-tíbio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Legenda: Erosão óssea no côndilo tibial (seta).
Rato grupo GS,
Incidência latero-lateral.

GRUPO SEM TRATAMENTO (ST)- 8º dia de experimento

Na incidência latero-lateral possível visualizar sinais de osteoartrite na articulação direita, devida a presença de erosão óssea no côndilo femoral lateral e intensa diminuição do espaço articular (FIGURA 18).

Figura 18 Erosão óssea em cômulo femoral lateral, 8º dia de experimento. Articulação femoro-tíbio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).
 Legenda: Intensa diminuição do espaço articular e erosão óssea (Seta).
 Rato grupo ST, Incidência latero-lateral.

GRUPO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) - 30º dia de experimento

Na incidência latero-lateral foi visualizada diminuição do espaço articular e esclerose óssea na articulação direita, devido ao aumento radiopacidade do cômulo femoral lateral (FIGURA 19)

Figura 19 Diminuição do espaço articular, 30º dia de experimento. Articulação femoro-tíbio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).
 Legenda: Proximidade dos cômulos femorais e tibiais (seta) e esclerose óssea.
 Rato Grupo PRP,
 Incidência latero-lateral.

GRUPO COLÁGENO NÃO-DESNATURADO (UC-II)- 30° dia de experimento

Na incidência latero-lateral os sinais de osteoartrite na articulação direita, devida a presença de erosão em face articular cranial femoral e superfície articular, e sem alterações na articulação esquerda (superfície cranial normal entre os côndilos femoral e tibial e menisco) (FIGURA 20).

Figura 20 Erosão óssea , 30° dia de experimento,
Articulação femoro-tíbio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Legenda: Diminuição do espaço articular e erosão óssea no joelho direito (seta). Rato Grupo UC-II, Incidência latero-lateral.

GRUPO CONDROITINA (CS)- 30° dia de experimento

A incidência latero-lateral da articulação direita apresentou diminuição do espaço articular cranial e esclerose óssea, indicando atrito entre os côndilos femorais e tibiais (FIGURA 21).

Figura 21 Diminuição do espaço articular,
30° dia de experimento,
Articulação femoro-tíbio-patelar.



FONTE: O autor (2018).

Legenda: Intensa diminuição de espaço articular
(Seta) Rato Grupo CS,
Incidência latero-lateral

GRUPO GLUCOSAMINA (GS) - 30° dia de experimento

Na incidência latero-lateral os sinais de osteoartrite na articulação direita, devida a presença de erosão em face articular cranial tibial e superfície articular (FIGURA 22).

Figura 22 Erosão óssea em côndilo tibial,
30° dia de experimento,
articulação femoro-tíbio-patelar



FONTE: O autor (2018).

Legenda: Lise óssea em côndilo tibial (Seta).
Rato Grupo GS, incidência latero-lateral.

GRUPO SEM TRATAMENTO (ST)- 30° dia de experimento

Na incidência latero-lateral os sinais de osteoartrite foram visualizados na articulação direita, devida à presença de osteófitos (neoformação óssea) e diminuição do espaço articular, e sem alterações na articulação esquerda (superfície cranial normal entre os côndilos femoral e tibial e menisco) (FIGURA 23).

Figura 23 Osteófitos periarticular, 30° dia de experimento.



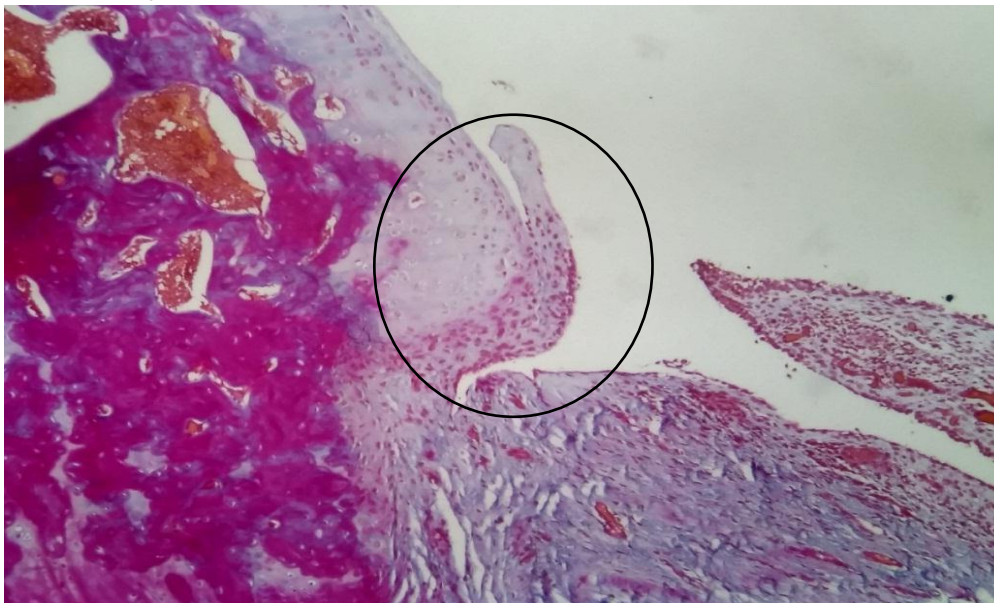
FONTE: O autor (2018).
Legenda: Diminuição de espaço articular e osteófitos (Seta).
Rato Grupo ST, Incidência latero-lateral

4.2 LAUDO HISTOPATOLÓGICO

GRUPO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Nenhum animal apresentou edema de cartilagem e úlcera profunda, mas em todos havia hiper celularidade superficial e intermediária e erosão de cartilagem (FIGURA 24).

Figura 24 Erosão e fissura da cartilagem,
articulação femoro-tibio-patelar direita.

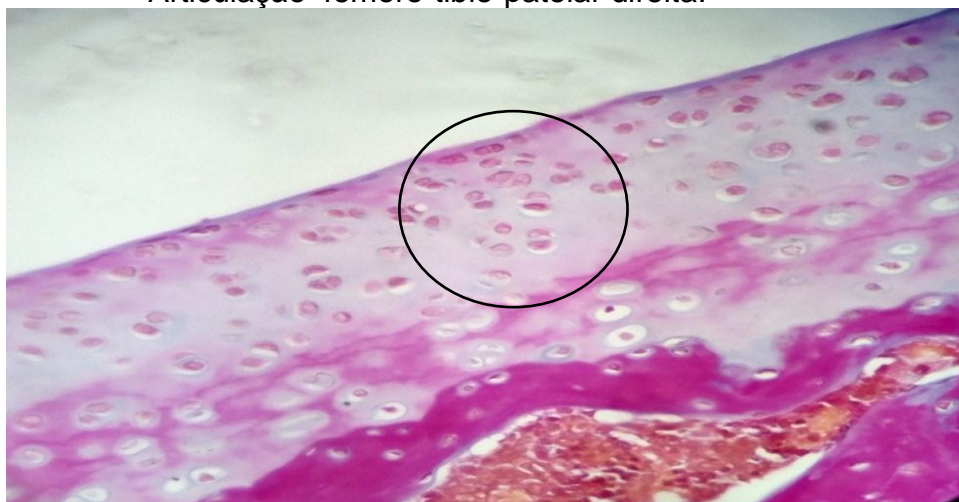


FONTE: O autor (2018).

Nota: Desgaste profundo e deslocamento da margem cartilaginosa (Círculo).
Rato Grupo PRP, 30° dia de experimento. Coloração de Mallory.
Objetiva de 4x.

Observou-se a presença hipercelularidade média/profunda em nove animais
(FIGURA 25).

Figura 25 Hipercelularidade da cartilagem e tidemarks,
Articulação femoro-tibio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Nota: Hipercelularidade média (Círculo) e divisa das margens
cartilagosas (Tidemark). Rato Grupo PRP, 30° dia de experimento.

Foram observadas fissura e úlcera superficial em cinco animais, e ausência de cartilagem, indicando desgaste total, em quatro animais. Sete animais mostraram flaps de cartilagem e em três havia tidemarks. Em apenas um animal houve discreta perda de basofilia da cartilagem. Formação de osteófitos foi observada em todos os animais.

Houve predomínio da presença de 1 a 2 grupos isógenos de condrócitos por

campo sob objetiva de 40x, sendo observados em nove animais. Em apenas um deles houve 5 ou mais/campo sob objetiva 40x. Desenvolvimento de condrócitos com disposição colunar foi observado em cinco animais (FIGURA 26).

Figura 26 Condrócitos colunares, articulação femoro-tibio-patelar direita.



FONTE:O autor (2018).

Nota: Condrócitos colunares (Círculos). Rato grupo PRP, 30° dia de experimento. Coloração de Mallory Objetiva de 4x.

Nos 10 animais se observou hipertrofia vilosa da sinóvia variando de discreta a moderada, existindo concomitante hiperplasia de sinoviócitos. Nestas áreas houve edema e infiltração linfoplasmocitária na sub-íntima e também com localização perivascular. A sinóvia recobrimdo parcialmente a cartilagem estava presente em nove animais e em quatro havia preenchimento de espaços trabeculares pela sinóvia e tecido fibrovascular. Em dois animais a sinóvia não estava presente.

A formação do tecido fibrovascular foi moderada e em todos os animais; foi mais evidente na região de transição da cartilagem de revestimento.

A reação inflamatória variou de discreta a moderada e houve formação de edema e granulomas com células gigantes multinucleadas em seis animais. Em dois animais houve miosite não purulenta adjacente.

GRUPO COLÁGENO NÃO-DESNATURADO (UC-II)

Nenhum animal apresentou perda da basofilia e úlcera profunda, mas em todos havia erosão de cartilagem, fissuras, hiperplasia superficial e intermediária e hiperplasia média/profunda.

Úlcera superficial foi observada em cinco animais, e ausência de cartilagem,

indicando desgaste total, em três animais. Dois animais mostraram flaps de cartilagem e em quatro havia edema de cartilagem e tidemarks.

Em apenas um animal houve discreta perda de basofilia da cartilagem. Formação de osteófitos foi observada em todos os animais.

Houve predomínio da presença de 1 a 2 grupos isógenos de condrócitos/campo sob objetiva de 40x, acometendo sete animais. Em apenas um deles houve 5 ou mais/campo sob objetiva 40x. Desenvolvimento de condrócitos com disposição colunar foi observado em um animal.

Nos oito animais se observou hipertrofia vilosa da sinóvia, variando de discreta a moderada, existindo concomitante hiperplasia de sinoviócitos, sem que fossem observada vacuolização destas células (FIGURA 27).

Figura 27 Sinóvia reativa e tecido fibrovascular recobrendo cartilagem, Articulação femoro-tibio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Nota: SFV- sinóvia com infiltrado de tecido fibrovascular.

Seta- Fissura e *flap* de cartilagem, Rato grupo UC-II. 30° dia.

Coloração de Mallory. Objetiva 10x.

Nestas áreas houve infiltração linfoplasmocitária na sub íntima e também com localização perivascular. Sinóvia recobrendo parcialmente a cartilagem estava presente em sete animais. Em um animal a sinóvia não estava presente. A formação do tecido fibrovascular foi moderada e em todos os animais; foi mais evidente na região de transição da cartilagem de revestimento. A reação inflamatória foi discreta em tres animais e severa, com formação e granulomas com células gigantes multinucleadas em cinco animais. Em um animal houve miosite não purulenta adjacente.

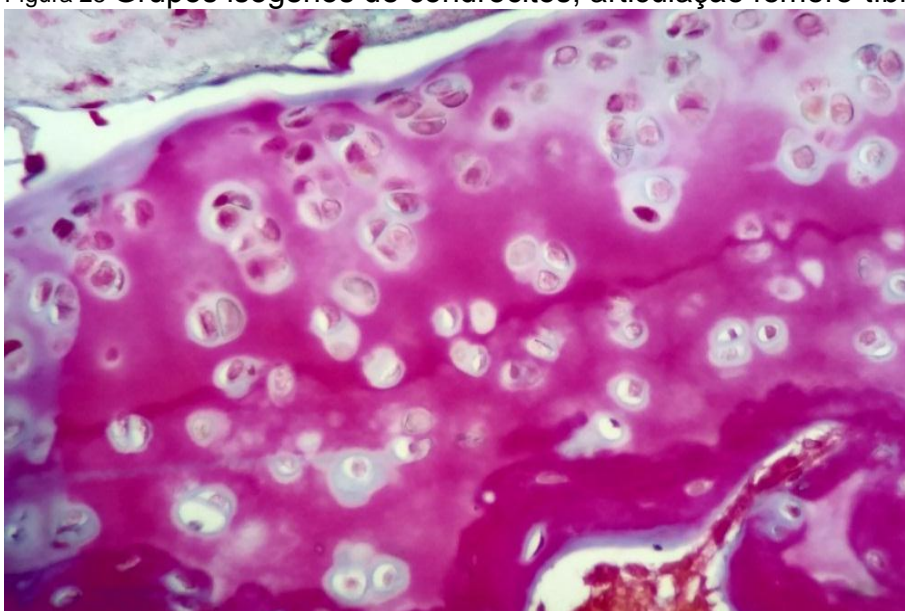
GRUPO SULFATO DE CONDROITINA (CS)

Nenhum animal apresentou edema, perda da basofilia e úlcera profunda, mas em todos havia erosão de cartilagem, hiperplasticidade superficial e intermediária, hiperplasticidade média/profunda, tidemarks e formação de osteófitos.

Fissura foi observada em três animais. Úlcera superficial estava presente em dois animais, e ausência de cartilagem, indicando desgaste total, em outros dois animais. Flaps de cartilagem apareceu em um animal.

Houve predomínio da presença de 1 a 2 grupos isógenos de condrócitos/campo sob objetiva de 40x, acometendo sete animais (FIGURA 28).

Figura 28 Grupos isógenos de condrócitos, articulação femoro-tíbio- patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Nota: Agrupamento celular de condrócitos. Rato grupo CS, 30° dia de experimento. Coloração de Mallory. Objetiva 10x.

Em apenas um deles houve 3 a 4/campo sob objetiva 40x. Desenvolvimento de condrócitos com disposição colunar foi observado em cinco animais. Nos oito animais se observou hipertrofia vilosa da sinóvia variando de discreta a moderada, existindo concomitante hiperplasia de sinoviócitos em sete deles (FIGURA 29), sem que fossem observada vacuolização destas células.

Figura 29 Hipertrofia vilosa da sinóvia, articulação femoro-tíbio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Nota: Proliferação dos vilos sinoviais (Círculo). Rato grupo CS, 30° dia de experimento, coloração de Mallory objetiva 4x.

Nestas áreas houve infiltração linfoplasmocitária na sub-íntima e também com localização perivascular. Sinóvia recobrimdo parcialmente a cartilagem estava presente em um animal, e em quatro deles a sinovial e o tecido fibrovascular estava penetrando no espaço trabecular.

A formação do tecido fibrovascular foi moderada e em todos os animais; foi mais evidente na região de transição da cartilagem de revestimento. A reação inflamatória foi discreta em um animal, moderada em outro e severa, com formação e granulomas com células gigantes multinucleadas em cinco animais. Em dois animais houve miosite não purulenta adjacente.

GRUPO SULFATO DE GLUCOSAMINA (GS)

Nenhum animal apresentou edema, fissura, perda da basofilia, tidemarks e úlcera profunda. Em todos havia hiper celularidade superficial e intermediária, hiper celularidade média/profunda e formação de osteófitos.

Úlcera superficial foi observada em sete animais (FIGURA 30).

Figura 30 Úlcera superficial, articulação femoro-tíbio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Nota: Perda de tecido articular superficial - Ulceração (Círculo),
Rato grupo GS, 30° dia de experimento, Coloração de Mallory objetiva 4x.

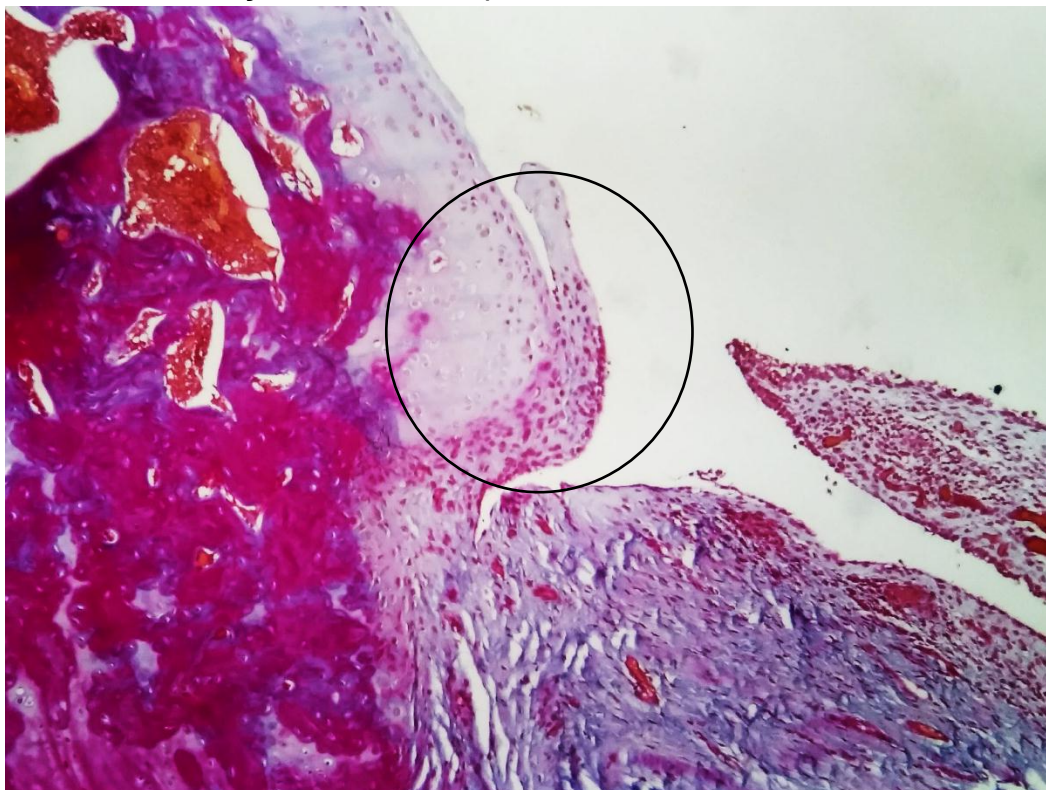
A ausência de cartilagem, indicando desgaste total, em um animal. Apenas um animal apresentou erosão de cartilagem e um animal mostrou flaps de cartilagem.

Houve predomínio da presença de 3 a 4 grupos isógenos de condrócitos/campo sob objetiva de 40x, acometendo cinco animais. Em tres deles houve 1 a 2/campo sob objetiva 40x. Desenvolvimento de condrócitos com disposição colunar foi observado em tres animais.

Em sete animais se observou hipertrofia vilosa da sinóvia variando de discreta a moderada, existindo concomitante hiperplasia de sinoviócitos, sem que fossem observada vacuolização destas células. Nestas áreas houve infiltração linfoplasmocitária na sub intima e também com localização perivascular. Sinóvia recobrando parcialmente a cartilagem estava presente em um animal.

A formação do tecido fibrovascular foi moderada e em todos os animais, e evidente na região de transição da cartilagem de revestimento. A reação inflamatória foi discreta em quatro animais e moderada em outros quatro (FIGURA 31).

Figura 31 Reação inflamatória granulomatosa severa,
Articulação femoro-tíbio-patelar direita.



FONTE: O autor (2018).

Nota: Infiltrado de células inflamatórias na cartilagem articular (círculo).

Rato grupo GS, 30° dia de experimento, Coloração de Mallory objetiva 4x.

GRUPO SEM TRATAMENTO (ST)

Não houve edema, perda da basofilia e úlcera profunda. Em todos havia hiper celularidade superficial e intermediária, hiper celularidade média/profunda e formação de osteófitos.

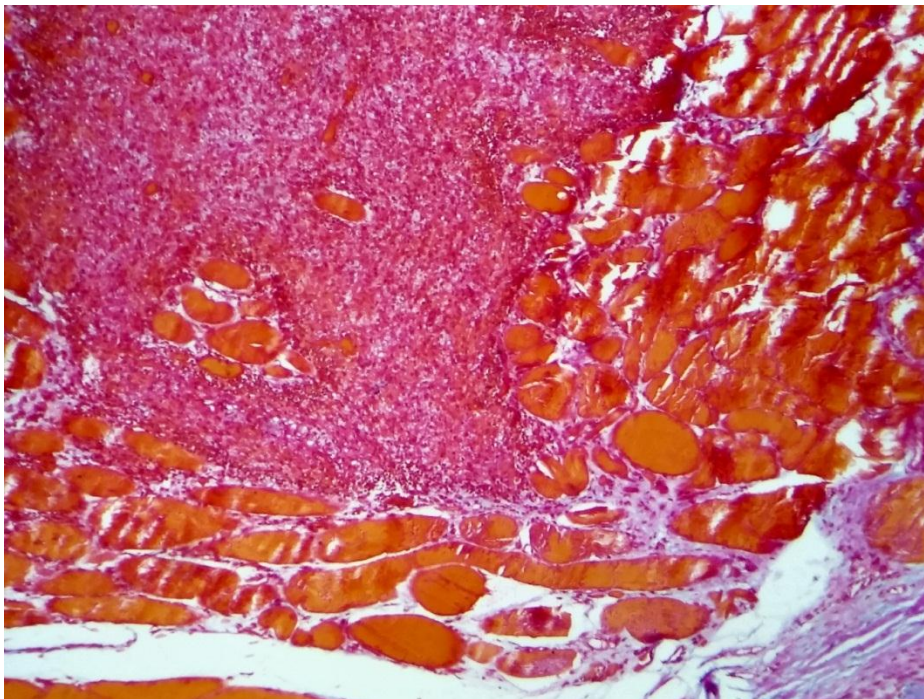
Fissura foi observada em três animais, enquanto que úlcera superficial foi observada em seis animais, e ausência de cartilagem, indicando desgaste total, em um animal. Dois animais apresentaram erosão de cartilagem. Um animal mostrou flaps de cartilagem e tidemarks.

Houve predomínio da presença de 5 ou mais grupos isógenos de condrócitos/campo sob objetiva de 40x, acometendo cinco animais. Em três deles houve 3 a 4 grupos isógenos /campo sob objetiva 40x. Desenvolvimento de condrócitos com disposição colunar foi observado em três animais.

Em todos os animais se observou hipertrofia vilosa da sinóvia variando de discreta a moderada, existindo concomitante hiperplasia de sinoviócitos, sem que fossem observada vacuolização destas células. Nestas áreas houve infiltração linfoplasmocitária na sub íntima e também com localização perivascular. Sinóvia recobrimdo parcialmente a cartilagem estava presente em três animais e em um deles existia esse tecido em espaço trabecular.

A formação do tecido fibrovascular foi moderada e em todos os animais; sendo mais evidente na região de transição da cartilagem de revestimento. A reação inflamatória foi discreta em dois animais, moderada em um e severa em cinco deles. Em três animais houve miosite não purulenta adjacente (FIGURA 32).

Figura 32- Miosite severa, articulação femoro-tíbio-patelar direita.



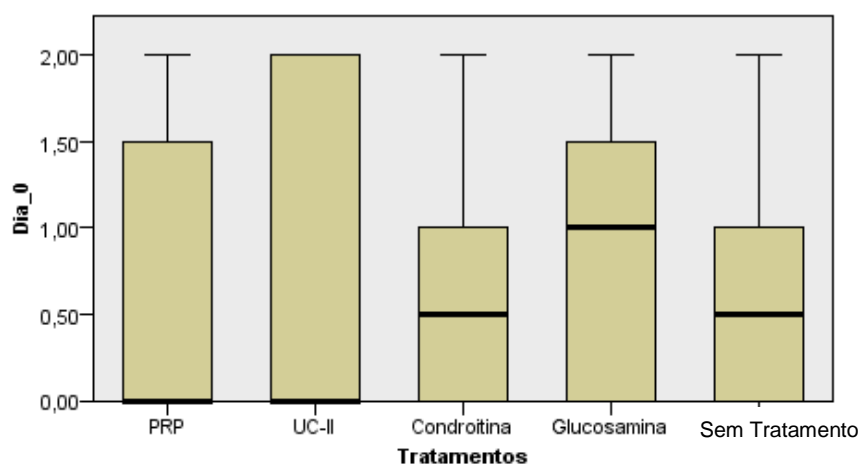
FONTE: O autor (2018).

Nota: Inflamação muscular, Rato grupo ST, 30° dia de experimento.
Coloração de Mallory objetiva 4x.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

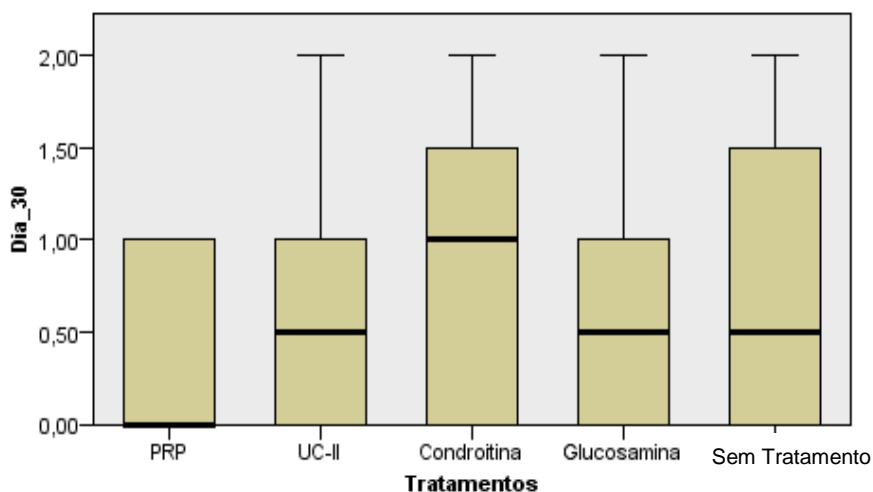
Quando se aplicou o teste de Kruskal-Wallis para a avaliação da indução de osteoartrite, no 8° dia em todos os grupos, observou-se que não houve alterações radiográficas verificadas em ambos os membros, como mostra a mediana (barra preta), demonstrando que todos os ratos apresentaram lesões compatíveis com osteoartrite (GRÁFICO 1).

Gráfico 1- Relação das alterações radiográficas entre os grupos, 8º dia do experimento.



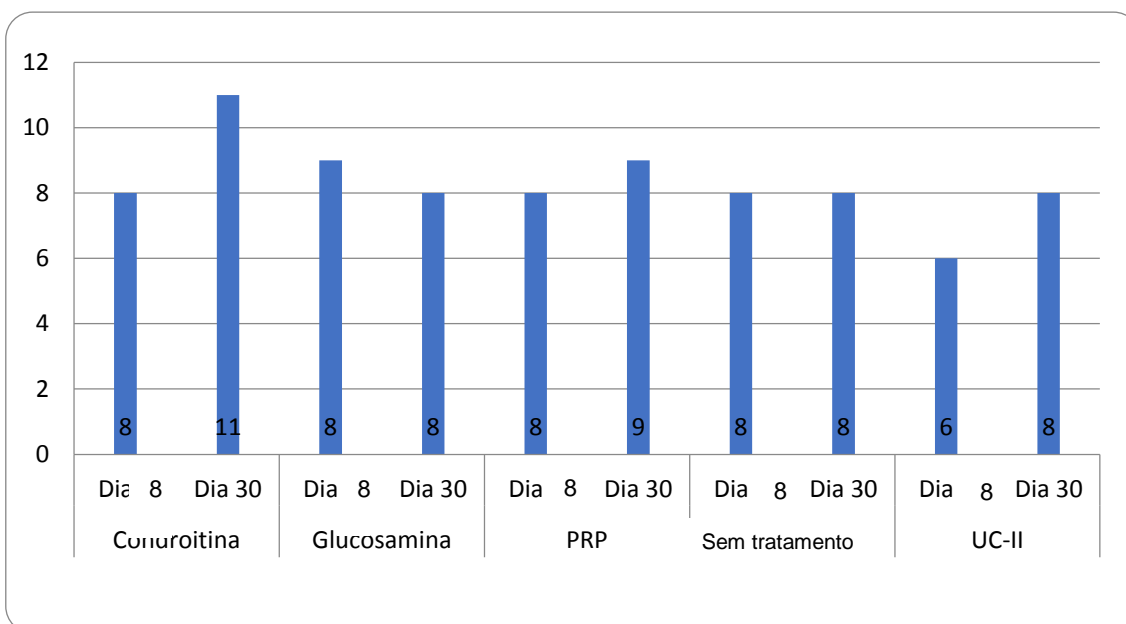
No trigésimo dia do experimento, ao avaliar radiograficamente a resposta ao tratamento, também não foram observadas diferenças no teste de Kruskal-Wallis entre os grupos estudados (GRÁFICO 2).

Gráfico 2 - Relação das alterações radiográficas entre os grupos, 30º dia do experimento.



Através do teste de Wilcoxon pareado verificou-se que os grupos: PRP; UC-II; GS e ST não diferiram significativamente ao comparar as lesões radiográficas do dia 0 e do dia 30. Apenas o grupo CS diferiu negativamente, com significância estatística, a distribuição das lesões do dia 8 do dia 30 (GRÁFICO 3).

Gráfico 3- Resultado da contagem das lesões radiográficas nos dias 8 e 30.



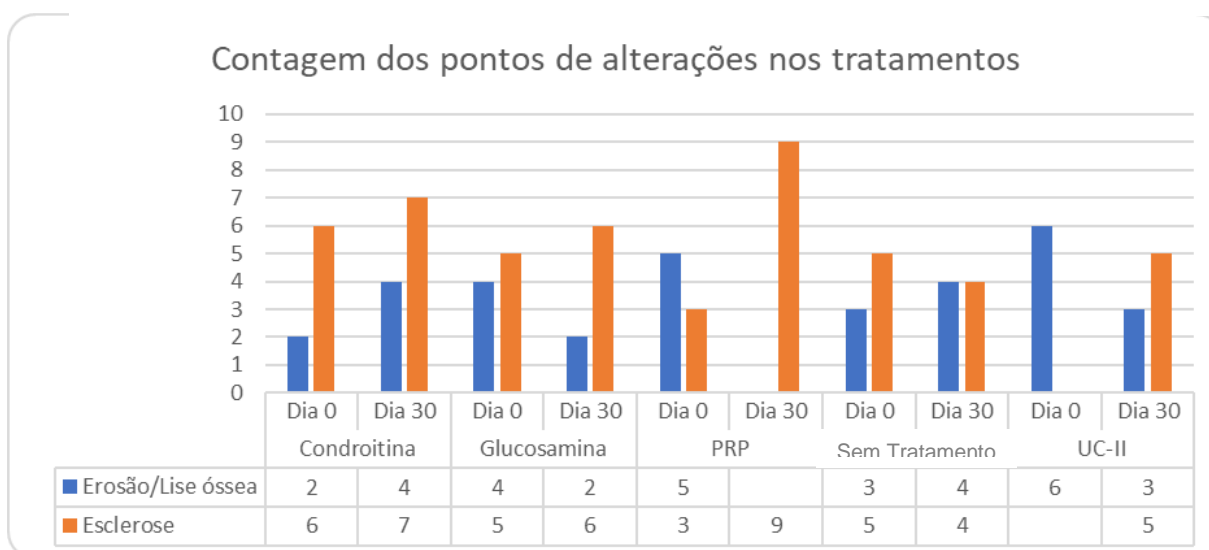
O teste de Wilcoxon pareado verificou as distribuições das lesões entre os dias 8 e 30; e constatou-se que são as mesmas quando analisadas nos grupos PRP, UC-II, Glucosamina e Sem Tratamento. Apenas com o tratamento Condroitina o número de alterações observadas no dia 8 foram significativamente menores do que no dia 30 (TABELA 1).

Tabela 1 Valores representando a contagem de pontos observados

GRUPO	Dia 8	Dia 30
Condroitina	16	16
Erosão/Lise ossea	2	4
Esclerose	6	7
Nc	8	5
Glucosamina	16	16
Erosão/Lise óssea	4	2
Esclerose	5	6
Nc	7	8
PRP	20	20
Erosão/Lise óssea	5	
Esclerose	3	9
Nc	12	11
Sem Tratamento	16	16
Erosão/Lise óssea	3	4
Esclerose	5	4
Nc	8	8
UC-II	16	16
Erosão/Lise óssea	6	3
Esclerose		5
Nc	10	8
Total Geral	84	84

Quando se comparou os grupos entre si, em relação as alterações radiográficas do dia 8 ao dia 30, foi encontrado diferença apenas no grupo Condroitina, pois este grupo não apresentou melhora no parâmetro radiográfico de erosão óssea (dois animais no 8° dia evolui para 4 animais no 30 ° dia) (GRÁFICO 4).

Gráfico 4- Valores representando a contagem de pontos observados de acordo com o padrão de lesão articular radiológica



O grau de osteoartrose foi gerado pela somatória dos pontos das análises de cartilagem, condrócitos, sinóvia e inflamação linfoplasmocitária com células gigantes, para caracterizar o índice de comprometimento da articulação no exame histopatológico (Tabela 2).

Tabela 2 Escore da lesão articular no exame histopatológico

Cartilagem	
Edema	1
Erosão	2
Fissura	3
Úlcera superficial	4
Ausência de cartilagem	5
Hipercelularidade (superficial/intermediária)	6
Hipercelularidade (média/profunda)	7
Perda da basofilia	8
Tidemark	9
Flap	10
Osteófitos	11
	66
Condrócitos	
Necrose condrocito	5
	5
Sinóvia	
Edema	1
Hipertrofia vilosa	2
Hipertrofia/hiperplasia de sinoviócitos	3
Sinoviócitos vacuolizados	4
Sinóvia recobrimdo cartilagem	5
Sinóvia/fibrovascular penetrando osso	6
Ausência de sinóvia	7
Pannus (fibrovascular)	8
	36
Inflamação linfoplasmocitaria com células gigantes	
Discreta	1
Moderada	2
Severa	3
Miosite	4
	7
Total de pontos	114

De acordo com o número da pontuação na análise histopatológica, o resultado do grupo foi classificado de forma igualitária em níveis crescentes do mais leve ao mais grave, sendo o resultado de 1 a 5 pontos foi considerado Nada Digno De Nota (NDN), Muito Baixo com resultado entre 16 a 31 pontos,

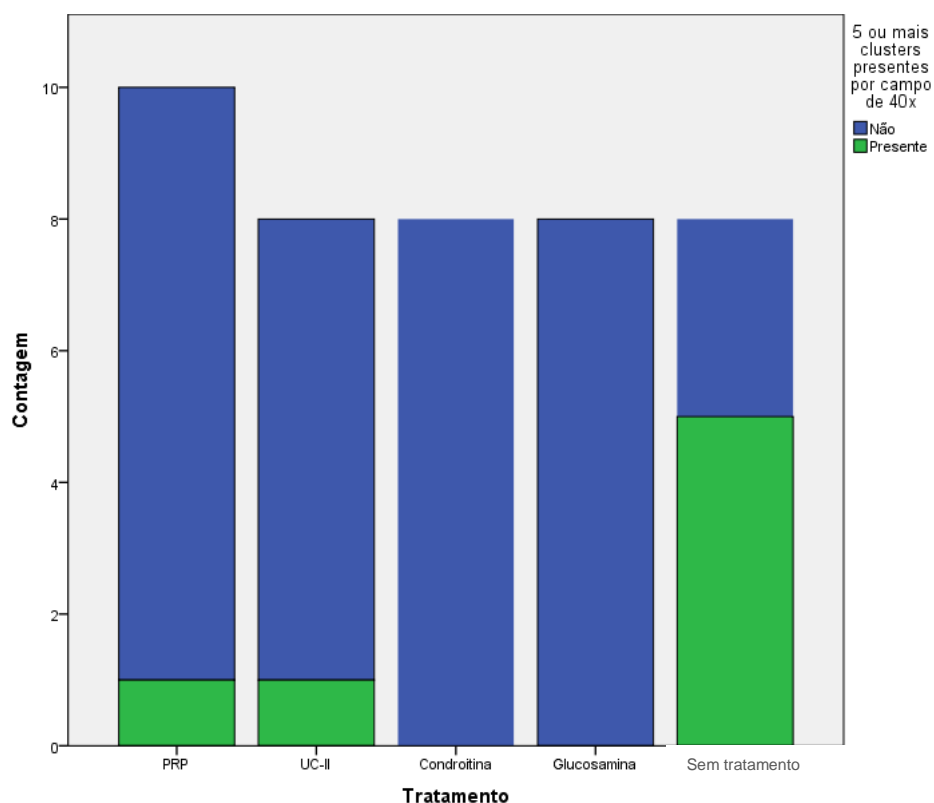
Baixo entre 32 a 47 pontos, Moderado entre 48 a 63 pontos, Alto entre 64 a 79 pontos, Muito alto entre 80 a 95 pontos e Extremo 96 a 114 pontos (Tabela 3).

Tabela 3 Classificação da gravidade de acordo com a pontuação da análise histopatológica.

Grau de osteoartrose	De	Até
NDN	1	15
Muito baixo	16	31
Baixo	32	47
Moderado	48	63
Alto	64	79
Muito alto	80	95
Extremo	96	114

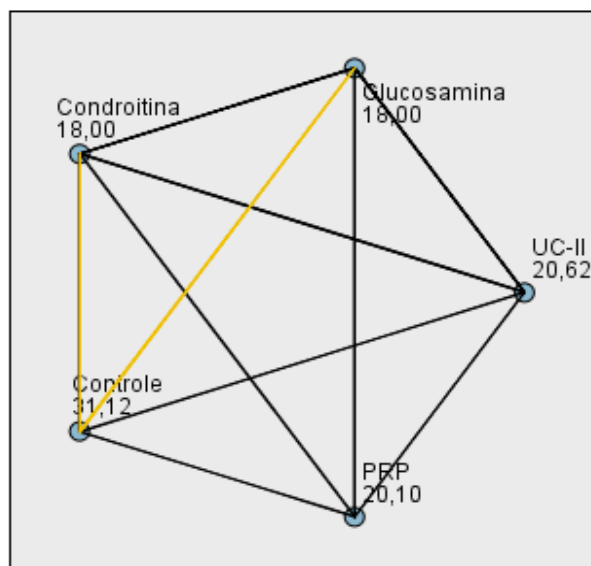
O teste de Kruskal Wallis indicou que o grau de osteoartrose no exame histopatológico apresentou diferenças significativas entre os grupos na avaliação de 5 ou mais *clusters* de condrócitos por campo da objetiva de 40x, e o grupo ST apresentou superioridade em relação aos outros grupos (gráfico 5)

Gráfico 5- Demonstração dos grupos que apresentaram Clusters de condrócitos na avaliação histopatológica.



O teste de Dunn com correção de Bonferroni comparou os grupos entre si na avaliação histopatológica da cartilagem articular, e apresentaram diferença significativa demonstrada pela linha amarela foram os grupos Condroitina – Sem Tratamento ($p=0,014$); e Glucosamina-Sem Tratamento ($p=0,014$) (GRÁFICO 6).

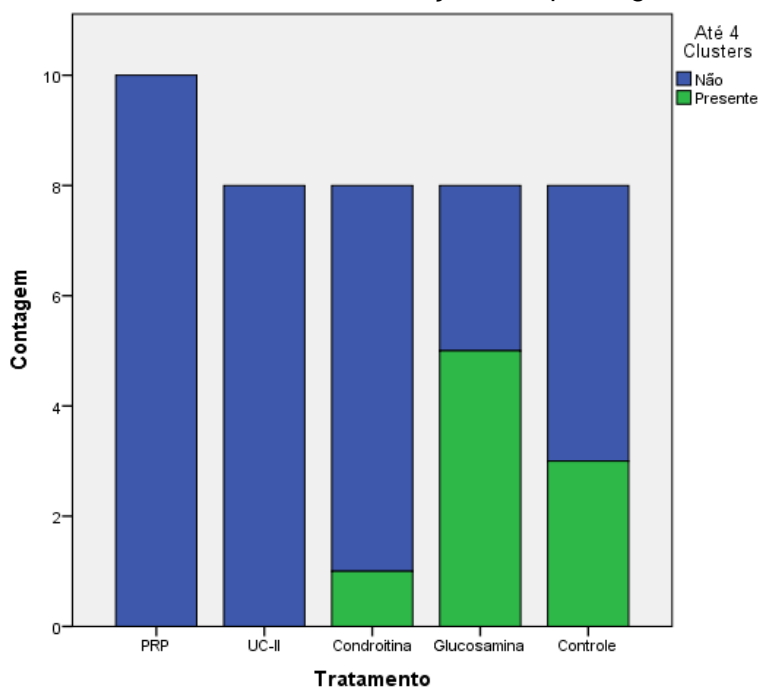
Gráfico 6- Comparação entre os grupos Condroitina- Sem Tratamento e Glucosamina-Sem Tratamento.



Cada nó mostra a posição média de amostra de Grupo.

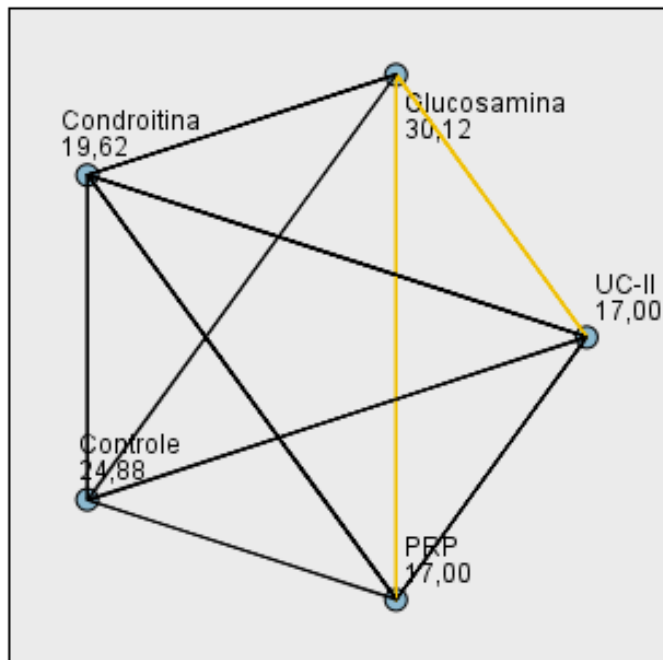
A formação de até 4 *clusters* apresentou diferente distribuição entre os grupos (GRÁFICO 7).

Gráfico 7- Representação dos grupos que apresentaram até 4 clusters de condrócitos na avaliação histopatológica



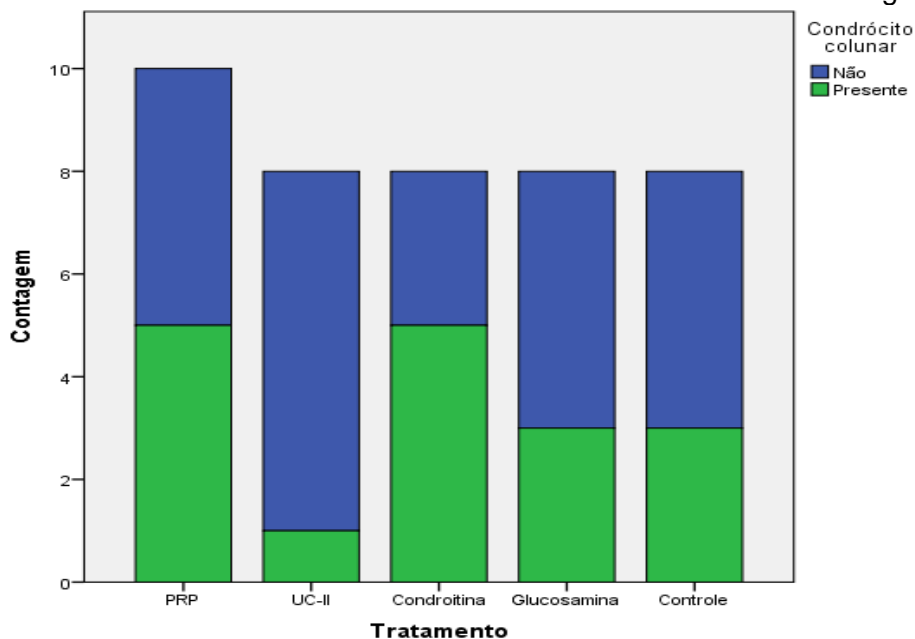
Os pares que apresentaram diferenças entre si foram Glucosamina – UC-II ($p=0,039$); e Glucosamina-PRP ($p=0,023$) (GRÁFICO 8).

Gráfico 8- Comparação entre pares dos grupos Glucosamina – UC-II e Glucosamina-PRP



A distribuição dos condrócitos colunares entre os grupos não apresentaram diferenças significativas (GRÁFICO 9).

Gráfico 9- Distribuição da análise histopatológica com o resultado de condrócitos colunares entre os grupos.



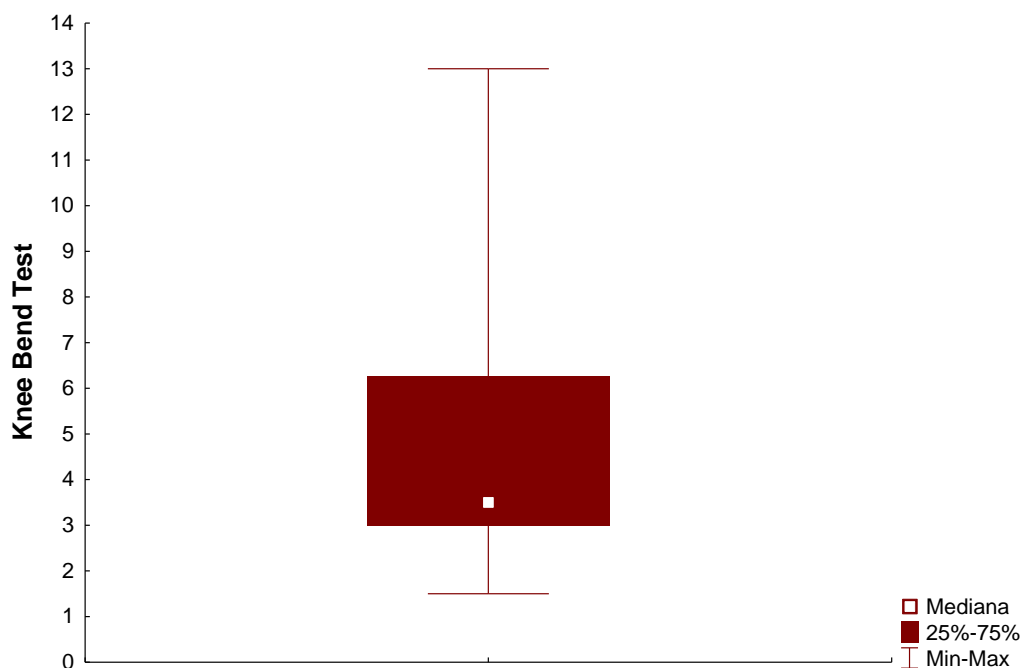
A média do Knee Bend Test foi de 4,5 pontos com desvio padrão de 2,3 . A mediana é 3,5 (metade dos ratos teve escore até 3,5 e a outra metade teve escore acima de 3,5). Os quartis dividem o conjunto de dados em 4 partes iguais: 1º quartil, 2º quartil que é igual à mediana e 3º quartil; 25% dos dados ficam abaixo do 1º quartil, 25% ficam entre 1º quartil e a mediana, 25% ficam entre a mediana e o 3º quartil e 25% acima do 3º quartil. Sendo assim, entre 1º e 3º quartis ficam 50% dos dados centrais. O mínimo é o menor escore encontrado na amostra e máximo é o maior, ou seja, todos os dados estavam entre 1,5 e 13 pontos (TABELA 4).

Tabela 4 Descrição do Knee Bend Test

	n	Mé dia	Desvio padrão	Míni mo	1o qua artil	Medi ana	3o qua artil	Máx imo
KNEE BEND TEST	4 0	4,5	2,3	1,5	3	3,5	6,3	13

No gráfico abaixo (GRÁFICO 10) podem ser visualizados os valores de mediana (quadrado branco), a caixinha definida pelos quartis (25% - 75%, 1º quartil – 3º quartil) e as barras definidas pelo mínimo e máximo.

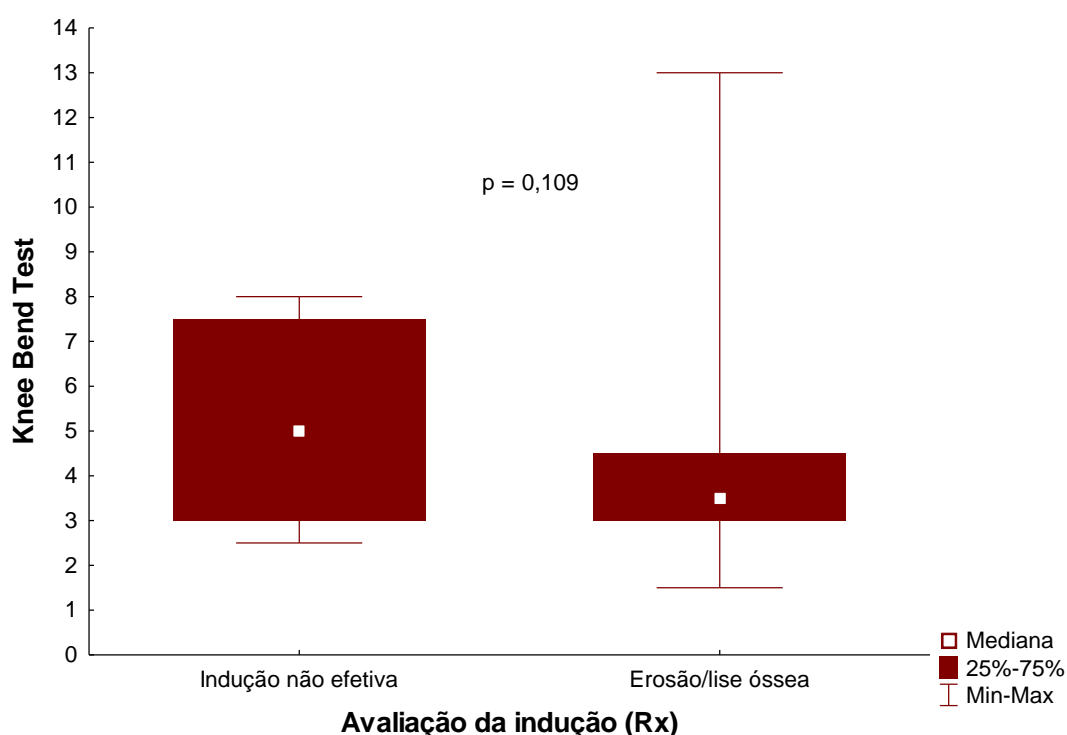
Gráfico 10- Valores de mediana do Knee Bend Test



No comparativo dos resultados do Knee Bend Test com o resultado da avaliação radiológica, na intenção de comparar os sinais clínicos com os achados radiológicos, não houve diferença significativa, considerando que o valor de p foi maior que 0,05, a hipótese é de que não houve diferença significativa, entre ratos com erosão/lise óssea quanto ao resultado do Knee Bend Test.

Observe no gráfico abaixo (GRÁFICO 11) como os valores de Knee Bend Test não diferem de acordo com achados radiológicos.

Gráfico 11- Relação entre Knee Bend e avaliação radiológica



6 DISCUSSÃO

Uma das razões para a falta de compreensão do mecanismo de ação da OA pode ser a ausência de uma verdadeira réplica experimental da doença, como afirma DAMBROSIO et. al., 1981. Entende-se que para a correta avaliação da eficácia de um tratamento medicamentoso, em primeiro lugar é necessário assegurar-se que o indivíduo estudado, de fato apresenta um quadro de OA estabelecido. O entendimento acerca dos processos de estabelecimento e evolução da doença é fundamental para a realização de tratamentos mais eficientes. Nesse contexto, os modelos experimentais inserem-se como alternativas em virtude das limitações associadas aos estudos em humanos.

Também descreveu as cinco principais formas de indução de osteoartrite presentes até então: por agentes infecciosos, por agentes químicos, mecanismos endócrinos alterados, imunológicos e meios físicos. Concluiu que as formas de indução de artrite disponíveis forneciam modelos aceitáveis para o estudo da fisiopatologia da doença articular, mas nenhuma pode ser considerada como uma reduplicação detalhada da evolução e do comportamento da artrite reumatóide.

Dentre os vários modelos de indução, este estudo utilizou o *Saccharomyces Cerevisiae* (Zymosan A®) intra-articular em joelho de ratos. O modelo proposto neste trabalho em ratos segue uma tendência natural em pesquisa básica, onde animais de pequeno porte e com possibilidade de manipulação genética contribuem para a descoberta dos mecanismos bioquímicos envolvidos com a OA. Foram considerados quadros induzidos com sucesso, aqueles que apresentassem sinais radiológicos (diminuição do espaço articular, formação de pannus e erosão/lise óssea) e nociceptivos de AO (knee bend test). E de acordo com os dados coletados ao oitavo dia de experimento, os animais apresentavam todos os sinais de lesão articular devidamente induzida pelo Zymosan A®.

O estudo radiográfico demonstrou imagens sugestivas de osteoartrite em 72.5% das projeções, diferindo do que sugerem SHAKYA et al., 2019 e WIDMER et al., 1994, quando diz que o diagnóstico de osteoartrite em seu estágio inicial, através do uso do raio-x, é considerado um desafio, pois nesta fase as alterações radiográficas de degeneração da cartilagem ainda apresentam-se indetectáveis. A osteoartrite é uma doença que envolve por completo a articulação, incluindo não apenas a cartilagem articular hialina, mas também o osso subcondral, sinóvia, meniscos e ligamentos, e a radiografia

convencional, entretanto, é capaz apenas de descrever as estruturas ósseas da articulação (tecido duro) HASSAN et.al., 2015. Com o agora amplamente disponível uso dos exames de imagem avançadas, ocorreu uma grande mudança de paradigma ao destacar a importância de outros tecidos além do osso articular.

Como a cartilagem hialina não tem inervação e a fonte de dor em pacientes com OA do joelho podem incluir as estruturas articulares intrínsecas já mencionadas e estruturas periarticulares, isso explica a ocorrência de alguns animais possuírem grau avançado de OA visualizado na radiografia, e não apresentarem sinais clínicos e alterações histológicas compatíveis com o grau (PRITZKER, 2006). Apenas o grupo tratado com a condroitina diferiu significativamente a distribuição das lesões do dia 8 do dia 30, apresentando indícios estatísticos de evolução dos sinais imaginalógicos de OA, como visualizado por BAIME, 2006 e sua pesquisa.

As alterações imaginológicas observadas no membro direito no segundo exame radiográfico, realizado no trigésimo dia de medicação no grupo que recebeu o plasma rico em plaquetas, diferiu significativamente da verificada com o tratamento condroitina e do grupo sem tratamento usando o teste de Dunn, comparando entre os pares pela correção de Bonferroni, indicando diminuição dos sinais radiográficos de OA ao se comparar com o primeiro exame (Dia 8 de experimento), sugerindo reconstituição de tecido ósseo, como sugere AGHALOO et al., 2002 e WASTERLAIN et al., 2002. Esta deposição de tecido ósseo pode se dar pela maturação de osteoblastos em osteocitos, gerando a reconstituição óssea radiopaca na radiografia, como cita HAWELLEK et al., 2016.

O Knee bend test é normalmente empregado em caráter comparativo com exames imaginológicos e aplicado antes e depois de um tratamento. No presente trabalho foi comparado os escores com a radiologia a fim de encontrar uma associação entre escores altos do knee bend indicando sintomas de injúria física e sinais radiológicos presentes, o que não foi confirmado. Esse achado corrobora o estudo de FERREIRA-GOMES, 2008, quando afirma que estes testes não são específicos ou sensíveis, levando muitas vezes a resultados positivos falsos ou negativos falsos. Isto porque é quase impossível flexionar uma articulação sem flexionar outras articulações ou tecidos adjacentes, principalmente nos membros pélvicos e extremidades distais dos membros, podendo induzir uma resposta inespecífica e devido a natureza comportamental dos ratos durante a contenção física (referência).

No exame histopatológico realizado através da biópsia da epífise distal femoral direita, a avaliação dos tecidos e células componentes da articulação: cartilagem, condrócitos, sinóvia e infiltrado celular inflamatório, demonstrou que todos os grupos apresentaram grau 6 na classificação histopatológica de PTKER, 2005. Mas o grau de regeneração cartilaginosa, condroproteção e inflamação, variaram entre os grupos.

O grupo PRP, foi o grupo que teve mais presença de condrócitos colunares, este um indicativo de maior qualidade de regeneração articular, devido a maturação e reorganização destas células, corroborando com MELLO et al. 2008. Mas em contrapartida, foi o grupo que apresentou a maior inflamação da sinóvia, com a cápsula sinovial recobrando a cartilagem e presença de pannus e vários pontos da cartilagem articular, podendo ser devido às injeções intra-articulares semanais que os animais receberam (total de quatro aplicações), o PRP é um concentrado natural de substâncias autólogas fatores de crescimento do sangue. Permite de forma simples e de baixo custo maneira minimamente invasiva de obter uma concentração de muitos fatores de crescimento (FILARDO et al., 2011). A aplicação do PRP no tratamento da OA do joelho pode ser considerado uma indicação terapêutica relativamente nova (DE LA MATA et al., 2013). Este estudo foi realizado em 20 pacientes que sofrem OA leve a moderada. Eles foram injetados nos joelhos por PRP para seis injeções em intervalos mensais. Sampson e colegas avaliaram o efeito de três doses mensais doses de PRP em 14 pacientes com OA do joelho refratário para tratamento conservador. Eles observaram uma melhora linear de EVA e resultado de OA de lesão no joelho em 60% dos pacientes no acompanhamento.

O grupo que recebeu o colágeno não desnaturado (UC-II), apresentou considerável lesão cartilaginosa, pois muitos animais tiveram erosão e úlceras superficiais na cartilagem, não ocorrendo a deposição de condrócitos colunares e poucos condrócitos por campo microscópicos (sinais de baixa regeneração articular), e nos parâmetros de avaliação da sinóvia e inflamação linfoplasmocítica, foi o grupo com o maior índice de injúria, indicando baixo poder regenerativo e anti-inflamatória neste modelo experimental, contrapondo CROWLEY et al., 2009, que diz que o UC-II é capaz de dessensibilizar o sistema imunológico, e desta forma previne o ataque auto imune às cartilagens. Por consequência há um bloqueio da inflamação, sem a qual o paciente não apresenta mais o quadro de dor.

DALTILIO et al., 2007 cita que quando o organismo não ataca mais exacerbadamente as cartilagens, é reestabelecida a homeostase entre quebra e

síntese do colágeno tipo II, devolvendo a mobilidade e o conforto ao paciente, promovendo melhora da qualidade de vida.

O grupo que recebeu o sulfato de condroitina, apresentou no tecido cartilaginoso menos flaps e manutenção da tidemark, indicando a preservação tecidual, e foi o grupo, que juntamente com o grupo PRP, que ocorreu a maior deposição de condrócitos colunares. Porém com baixo índice inflamatório nos parâmetros de avaliação sinovial e infiltrado celular. Este efeito condrorregenerador e anti-inflamatório, como citado por MELO et al., 2008. Eles têm ação anti-inflamatória e reduzem a perda de proteoglicanos e de colágeno, ao inibirem enzimas degradativas da cartilagem (hialuronidase, catepsina, elastase, colagenase e metaloproteinases neutras). Além disso, estimulam a síntese de proteoglicanos e colágeno, sendo capazes de aumentar a proliferação dos condrócitos e a biossíntese da matriz (BRANDÃO, 2009). Esses efeitos suportam a hipótese de que as alterações da cartilagem articular, na osteoartrite, podem ser manejadas e que o uso dos glicosaminoglicanos pode complementar o tratamento da doença articular degenerativa (VERHAGEN et al., 2019)

O grupo GS, que recebeu o sulfato de glucosamina, apresentou o melhor índice anti-inflamatório, devido a baixo nível de infiltrado celular inflamatório e preservação da sinóvia, sem edema sinovial e preservação dos sinoviócitos. Na cartilagem articular apresentou menor ausência tecidual devido à úlceras superficiais e nos condrócitos manteve a media moderada de condrócitos por campo. Devido a todas essas características, este grupo foi o que teve os melhores efeitos de condroproteção, atividade anti-inflamatória e moderada condrorregeneração na análise histológica. Sendo o melhor resultado paramétrico em comparativo com os demais grupos, concordando com TORRENT et al., 2014. Em ensaios clínicos, a administração de glucosamina produziu uma alteração benéfica na osteoartrite, demonstrando um efeito condroprotetor que resulta em um atraso significativo na progressão da doença (DAMBROSIO et al., 1981, BRUYERE et al., 2004 e MAGANHIN et al., 2007) Os resultados confirmam achados de outros autores de que a glucosamina teve efeitos benéficos em ratos na superfície articular, que foi a estrutura selecionada para análise neste estudo. Esses autores sugeriram que a glucosamina pode atuar na matriz óssea (WANG et al., 2007) De acordo com essa visão, estudos in vitro demonstraram que a glucosamina inibe os efeitos da interleucina-1, como descreve MAGANHIN et al., 2007.

O grupo sem tratamento apresentou lesão moderada cartilaginosa e

comedido infiltrado inflamatório. A presença de condrócitos em maior quantidade por campo microscópico, mas ainda não colunares, sugere branda regeneração articular. Os mecanismos endógenos cicatriciais são efetivos em animais nutridos e jovens, como descrito por VANKY et al., 1998.

Ainda segundo o autor, a síntese de DNA cartilaginosa foi estudada na placa de crescimento tibial proximal de ratos saudáveis com 25 dias de idade, onde classificou o tecido articular em: zona proliferativa funcional, onde a maioria, se não todos, condrócitos proliferam e uma zona de maturação restante, e foram encontradas na junção condro-óssea após apenas 36 horas, sugerindo uma alta taxa de reconstituição tecidual por animais jovens, saudáveis e sem tratamento específico condrorregenerador.

7 CONCLUSÃO

O Plasma Rico em Plaquetas Intra-articular em joelho de ratos com osteoartrite induzida apresentou melhor efeito condro-regenerador e semelhante ação anti-inflamatória em relação ao Colágeno não-desnaturado, Condroitina e Glucosamina.

REFERÊNCIAS

AGHALOO TL¹, MOY PK, FREYMILLER EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. oct; 60(10):1176-81, 2002.

ATTUR MG, DAVE M, AKAMATSU M, KATOH M, AMIN AR. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage*.10:1-4, 2002.

BAIME; MJ. Glucosamine and chondroitin sulphate did not improve pain in osteoarthritis of the knee. *Evidence-Based Medicine*;11(4):115, 2006.

BOTELHO; S.B., DOS REIS; N.S., Alterações histológicas das cartilagens articulares de ratos albinos, submetidos a processos de envelhecimento natural e artificial, induzido por glicocorticoides. *Investigação - Revista Científica da Universidade de Franca Franca (SP) jan. 2003 / dez. 2005 v. 5 n. 1/6.*

BRANDAO; GDC.,KORUKIAN; M.,BRANDAO ;DDC.,MAININE S.; Association of glucosamine sulphate and chondroitin sulphate for patients with osteoarthritis of the knee. *Rev Bras Med*. 66:405-408, 2009.

BRASIL. Ministério Da Ciência, Tecnologia E Inovação Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal – Diretrizes Da Prática De Eutanásia Do Concea. Brasília, 2013.

BRUYERE O, PAVELKA K, ROVATI LC, DEROISY R, OLEJAROVA M, GATEROVVA J, ET AL. Glucosamine sulfate reduces osteoarthritis progression in postmenopausal women with knee osteoarthritis: evidence from two 3-year studies. *Menopause*. 11:138-43, 2004.

BRUYERE; O., REGINSTER; JY. Glucosamine and chondroitin sulfate as therapeutic agents for knee and hip osteoarthritis. *Drugs Aging*. 24:573–580, 2007.

CAMANHO; GL. Tratamento da osteoartrose do joelho. *Revista Brasileira de Ortopedia*. 26(5): 135-140, 2001.

CROWLEY; DC., LAU; FC., SHARMA; P., Safety and efficacy of undenatured type II collagen in the treatment of osteoarthritis of the knee: a clinical trial. *Int J Med Sci.* 6:312-321, 2009

D'ALTILIO M, PEAL A, ALVEY M, ET AL. therapeutic efficacy and safety of undenatured type II collagen singly or in combination with glucosamine and chondroitin in arthritic dogs. *toxicol mech methods.* 17:189-196. 2007.

D'AMBROSIO E, CASA B, BOMPANI R, SCALI M, SCALI G. Glucosamine Sulphate: a controlled clinical investigation in arthrosis. *pharmacotherapeutica.*;2:504-8, 1981.

DEL CARLO, R.J., GALVÃO, M.R., VILORIA, M.I.V., NATALI, A.J., BARBOSA, A.L.T., MONTEIRO, B.S., PINHEIRO, L.C.P. Imobilização prolongada e remobilização da articulação fêmoro-tíbio-patelar de ratos: estudo clínico e microscópico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.2, p.363-370, 2007

DE LA MATA J. Platelet rich plasma a new treatment tool for the rheumatologist? *Reumatol Clin* ;9:166–71, 2012.

E.G. MELO; V.A. NUNES; C.M.F. REZENDE; M.G. GOMES; C. MALM; V.A. GHELLER. Chondroitin sulfate and sodium hyaluronate in the treatment of the degenerative joint disease in dogs. Histological features of articular cartilage and synovium ,*Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.60 no.1 Belo Horizonte Feb. 2008

FILARDO G, KON E, BUDA R, TIMONCINI A, DI MARTINO A, CENACCHI A, ET AL. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*;19:528–35. 2011.

GERWIN; N., BENDELE; A.M , GLASSON; S., CARLSON; C.S. Histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *The OARSI, Osteoarthritis and Cartilage.* Ed. 18, 24-34, 2010.

GOBBI; A., KARNATZIKOS; G., MAHAJAN; V., MALCHIRA; S., Platelet-Rich Plasma Treatment in Symptomatic Patients With Knee Osteoarthritis: Preliminary Results in a Group of Active Patients. *Sports Health*; 4(2): 162–172, 2012.

GUPTA; RC., SKAGGS; P., STOCKER; A., ET AL. Therapeutic efficacy of undenatured type-II collagen (UC-II) in comparison to glucosamine and chondroitin in arthritic horses. *J Vet Pharmacol Therap.* 32:577-584, 2009.

HASSAN, A.S., EL-SHAFFEY, A.M., AHMED, A.S., HAMED, M.S. Effectiveness of the intra-articular injection of platelet rich plasma in the treatment of patients with primary knee osteoarthritis. *The Egyptian Rheumatologist*, Ed. 37, 119–124, 2015.

HAWELLEK,T., HUBERT, J., HISCHKE, S., KRAUSE, M. et al. Articular cartilage calcification of the hip and knee is highly prevalent, independent of age but associated with histological osteoarthritis: evidence for a systemic disorder. *Osteoarthritis and cartilage*, vol. 24, issue 12, p2092–2099, 2016.

HOFF; J., *Methods of Blood Collection in the Mouse.* Technique volume 29, no. 10 *Lab Animal* november 2000. 47-53.

HUANG;TL., CHANG; CC., LEE; CH., CHEN; SC., LAI; CH., TSAI; CL. Intra-articular injections of sodium hyaluronate (Hyalgan(R)) in osteoarthritis of the knee. a randomized, controlled, double-blind, multicenter trial in the asian population. *BMC Musculoskelet Disord.* 12):221, 2008

IM H.J., LI X., MUDDASANI P., et al. Basic fibroblast growth factor accelerates matrix degradation via a neuro-endocrine pathway in human adult articular chondrocytes. *J Cell Physiol.* 215:452-463, 2008.

KARAPOLAT, S., *O uso de animais em estudos experimentais.* J. bras. pneumol. vol.34 no.11 São Paulo Nov. 2008

KERPPERS; I.I., DE LIMA; C.J., MORETTI; A.B.F, VILLAVARDE, A.B Efeito do light emitting diode (led) na regeneração cartilaginosa em artrose induzida por zimosan. *Encontro de Pós-Graduação e Iniciação Científica – Universidade Camilo Castelo Branco,São José dos Campos, São Paulo., 2013.*

MAGANHIN C.C.; CORREA, O.; GOMES, R.C.T.;SIMÕES, R.; BARACAT, E.C.; SOARES-JR, J.M. Effects of glucosamine on the tibial epiphyseal disk of ovariectomized rats: morphologic and morphometric analysis *Clinics* vol.62 no.5 São Paulo, 2007.

OSTERGAARD, K., PETERSEN, J., ANDERSEN, C.B., BENDTZEN, K., SALTER, D.M. Histologic/Histochemical grading system for osteoarthritic articular cartilage. *Arthritis and Rheumatism*, vol. 40, n. 10, pag. 1776-1771, 1997

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

SHAKYA, R., KEMNITZ, J. WIRTH, W., MASCHEK, S., SHRESTHA, R., DUDA, G.N. ECKSTEIN, F. Efficacy and safety of tramadol HC1 in breakthrough musculoskeletal pain attributed to osteoarthritis. *J Rheumatol* 25:1358-63, 1998.

SANDELL LJ, AIGNER T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*. 3:107-113, 2011.

SILVA JR; F.S. Osteoartrite experimental em ratos: efeito do sulfato de condroitina e sulfato de glucosamina sobre a incapacitação articular e a lesão na cartilagem. [tese] São Paulo- Universidade de São Paulo; 84p. 2007.

TERRA; M., Boas Práticas no Manuseio de Animais de Laboratório: Cuidados com os Animais Experimentais. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de laboratório, Anais de congresso. 47-58, 2013.

The Royal Australian College of General Practitioners. Guideline for the management of knee and hip osteoarthritis. 2nd edn. East Melbourne, Vic: RACGP, 2018.

TORRENT, A., MONTELL, E., VERGÉS, J., RUHÍ, R., MEILIN, S., SONEGO, H., MAINIL-VARLET, P. Chondroprotective activity of acti-joint®, a combination of chondroitin sulfate, glucosamine and a natural ingredient rich in hyaluronic acid. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 22, S324–S325, 2014.

VANKY, I.P. , BROCKSTEDT, A.U., HJERPE, A.A., WIKSTRÖM, A.B. A Kinetic Studies on Epiphyseal Growth Cartilage in the Normal Mouse. In: *Bone* Volume 22, Issue 4, Pages 331-339, April 1998.

VERHAGEN, A.P., FERREIRA, M., REIJNEVELD-VAN DE VENDEL, E.A.E., TEIRLINCK, C.H., RUNHAAR, J., VAN MIDDELKOOP, M., HERMSEN, J. DE GROOT, I.B. et al., Do we need another trial on exercise in patients with knee osteoarthritis?: No new trials on exercise in knee OA. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 27, Issue 9, p1266–1269, 2019.

WANG SX, CHERIAN A, DUMITRIU M, GRYNPAS MD, CARRAN J, WAINMAN D, ET AL. Disease modifying effects of n-butyryl glucosamine in a streptococcal cell wall induced arthritis model in rats. *J Rheumatol*. 34:654-7, 2007.

WASTERLAIN A.S., BRAUN H.J., HARRIS A.H.S., KIM H-J. & DRAGOO J.L. the systemic effects of platelet-rich plasma injection. *am. j. sports med*. 41:186-193, 2013.

ZAKERI; Z., IZADI; S., SOLTANI; F., NAROUIE; B., GHASEMI-RAD; M. Evaluating the effects of ginger extract on knee pain, stiffness and difficulty in patients with knee osteoarthritis. *Journal of Medicinal Plant Research*. 5(15):3375-3379, 2011.

Apêndice 1 - Resultado da graduação segundo os sinais de lesão articular, exames radiográficos realizados dos cinco grupos no oitavo e trigésimo dia de experimento.

8° DIA			
RATO	Art. DIREITA	Art.ESQUERDA	SOMA
1A.	1	0	1
1A..	2	0	2
1A...	2	0	2
1A....	2	0	2
1B.	2	0	2
1B..	0	0	0
1B...	2	0	2
1B....	0	0	0
2A.	0	0	0
2A..	2	0	2
2A...	2	0	2
2A....	0	0	0
2B.	2	0	2
2B..	2	0	2
2B...	2	0	2
2B....	2	0	2
3A.	1	0	1
3A..	1	0	1
3A...	1	0	1
3A....	1	0	1
3B.	2	0	2
3B..	2	0	2
3B...	1	0	1
3B....	1	0	1
4A.	2	0	2
4A..	1	0	1
4A...	2	0	2
4A....	1	0	1
4B.	1	2	3
4B..	1	0	1
4B...	2	0	2
4B....	1	0	1
5A.	1	0	1
5A..	1	0	1
5A...	1	0	1
5A....	2	0	2
5B.	2	0	2
5B..	1	0	1
5B...	2	0	2
5B....	1	0	1

30° DIA			
RATO	ART.DIREITA	ART.ESQUERDA	SOMA
1A.	1	0	1
1A..	1	1	2
1A...	0	1	1
1A....	1	0	1
1B.	0	0	0
1B..	1	1	2
1B...	0	0	0
1B....	1	0	1
2A.	1	0	1
2A..	2	0	2
2A...	1	0	1
2A....	1	0	1
2B.	1	0	1
2B..	1	0	1
2B...	2	0	2
2B....	2	0	2
3A.	1	1	2
3A..	1	0	1
3A...	2	0	2
3A....	2	0	2
3B.	2	1	3
3B..	2	0	2
3B...	1	1	2
3B....	1	0	1
4A.	2	0	2
4A..	1	0	1
4A...	1	0	1
4A....	1	0	1
4B.	2	0	2
4B..	1	0	1
4B...	1	0	1
4B....	1	0	1
5A.	2	0	2
5A..	2	0	2
5A...	1	0	1
5A....	1	0	1
5B.	2	0	2
5B..	2	0	2
5B...	1	0	1
5B....	1	0	1