



## Artigo Original

# Efeito dos ácidos hialurônicos como condroprotetores em modelo experimental de osteoartrose<sup>☆</sup>

Marcello Zaia Oliveira<sup>\*</sup>, Mauro Batista Albano, Mario Massatomo Namba, Luiz Antônio Munhoz da Cunha, Renan Rodrigues de Lima Gonçalves, Evaldo Silva Trindade, Lucas Ferrari Andrade e Leandro Vidigal

Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

### INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 3 de fevereiro de 2013

Aceito em 9 de abril de 2013

Palavras-chave:

Osteoartrose

Ácido hialurônico

Ligamento cruzado anterior

Joelho

Coelhos

### R E S U M O

**Objetivo:** analisar os efeitos do ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo experimental de osteoartrose em coelhos.

**Métodos:** foram alojados de modo aleatório 44 coelhos da raça California, machos, em três grupos (PR, S e P) e submetidos a ressecção do ligamento cruzado anterior do joelho direito. Decorridas três semanas do procedimento cirúrgico iniciaram-se as três injeções intra-articulares semanais de ácido hialurônico nativo (Polireumin<sup>®</sup>)-PR, ácido hialurônico de cadeia ramificada (Synvisc<sup>®</sup>)-S e soro fisiológico 0,9%-P. Todos os animais foram sacrificados após 12 semanas do ato cirúrgico e os platôs tibiais dos joelhos infiltrados foram dissecados. Cortes histológicos da cartilagem das áreas de apoio com maior espessura dos platôs tibiais foram corados com Alcian Blue pH = 1,0, Alcian Blue pH = 2,5 e Azul de Toluidina para pesquisa da quantidade de proteoglicanos. A intensidade de coloração foi quantificada em um aparelho de microscopia ZeissImager Z2 Metasystems e analisada pelo software MetaferMsearch. A análise estatística consistiu no uso dos testes Kolmorov-Smirnov, análise de variância (Anova), t de Student e qui-quadrado. O nível de significância usado foi de 5%.

**Resultado:** o efeito condroprotetor dos ácidos hialurônicos usados no estudo foi demonstrado quando comparado ao do grupo controle, porém, feita a comparação entre si, não houve diferença estatística quanto à condroproteção.

**Conclusão:** os ácidos hialurônicos testados obtiveram efeito condroprotetor, sem diferença estatística com relação aos diferentes pesos moleculares.

© 2013 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

<sup>☆</sup> Trabalho desenvolvido no Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

<sup>\*</sup> Autor para correspondência.

E-mail: [marcellozaia@yahoo.com.br](mailto:marcellozaia@yahoo.com.br) (M.Z. Oliveira).

## Effect of hyaluronic acids as chondroprotective in experimental model of osteoarthritis

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Osteoarthritis  
Hyaluronic acid  
Anterior cruciate ligament  
Knee  
Rabbits

**Objective:** to analyze the effects of hyaluronic acid of different molecular weights in an experimental model of osteoarthritis in rabbits.

**Methods:** forty-four male California rabbits were divided randomly into three groups and underwent resection of the anterior cruciate ligament in his right knee. After three weeks of the surgical procedure began three weekly intra-articular injections of hyaluronic acid native (Polireumin®)-PR, hyaluronic acid branched chain (Synvisc®)-S and 0.9% saline-P. All animals were sacrificed after twelve weeks of surgery and tibial plateau infiltrated the knees were dissected. Histological cartilage of the support areas of the tibial plateaus were stained with Alcian Blue pH 1.0, Alcian Blue pH = 2.5 and toluidine blue for research on the amount of proteoglycans. The intensity of staining was quantified on a Zeiss microscope apparatus Imager Z2 MetaSystems and analyzed by software MetaferMsearch.

**Results:** the effect of chondroprotector hyaluronic acids used in the study was confirmed when compared to the control group, but the comparison made between them, there was no statistically significant difference regarding chondroprotection.

**Conclusion:** the hyaluronic acids tested had chondroprotective effect, with no statistical difference with regard to the different molecular weights.

© 2013 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

## Introdução

A osteoartrose (OA) é a enfermidade articular mais frequente da população mundial, com prevalência superior a 10% após os 50 anos, apresenta alterações histológicas da cartilagem e pode acarretar importantes limitações funcionais.<sup>1,2</sup> A OA é o resultado de vários fatores na disfunção articular e caracteriza-se por degeneração da cartilagem e simultânea proliferação de tecido ósseo, cartilaginoso e conectivo.<sup>3</sup> Dentre várias modalidades de tratamento disponíveis atualmente, a terapia com injeções intra-articulares de ácido hialurônico (AH) tem demonstrado efeito benéfico no controle dos sintomas da OA do joelho.<sup>4</sup>

O AH, um polissacarídeo da família dos glicosaminoglicanos, contribui para a homeostase da articulação normal e apresenta-se em menor concentração e com peso molecular diminuído no líquido sinovial, nas articulações com osteoartrose.<sup>5,6</sup> O AH administrado em forma de injeções intra-articulares pode potencializar os efeitos regenerativos do AH endógeno sobre a cartilagem articular, restituir a viscoelasticidade do líquido sinovial, contribuir para a síntese de AH pelos sinoviócitos e prevenir a degradação de proteoglicanos e fibras de colágeno da matriz extracelular. Estimula o metabolismo, previne a apoptose dos condrócitos e inibe a degradação condral e as respostas inflamatórias articulares.<sup>6</sup> Atribui-se a esses efeitos da terapia com uso de AH não só a sua capacidade de amenizar os sintomas relacionados à osteoartrose, mas também a sua interferência na progressão da degeneração articular.<sup>5-7</sup>

Considerando a abrangência e as implicações da OA do joelho, compreende-se atualmente a importância do diagnóstico e tratamento em suas fases iniciais, de maneira a minimizar suas consequências.<sup>8</sup> Por não haver até o presente momento intervenções que sejam capazes de inibir sua

evolução, sobressaem as opções que permitem a redução da sua progressão. Injeções intra-articulares de diferentes tipos de AH poderiam ser usadas com essa finalidade.

Para avaliar os efeitos dessas substâncias na gonartrose, se propôs nesta pesquisa o uso de um modelo experimental de OA que se assemelha àquela observado na espécie humana. A secção do ligamento cruzado anterior (LCA) do joelho de coelho, a "soldra" (termo usado na anatomia veterinária para a articulação similar ao joelho humano em pequenos animais como coelhos e cães), mimetiza as alterações morfológicas e bioquímicas observadas na osteoartrose humana, o que permite a reprodução acurada dos resultados obtidos.<sup>9,10</sup>

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das injeções intra-articulares do AH nativo (Polireumin®, TRB Pharma, São Paulo, Brasil) e do AH com cadeias ramificadas (Synvisc®, Novartis, São Paulo, Brasil), separadamente e comparativamente entre si, na OA induzida pela secção do LCA dos joelhos de coelhos.

## Materiais e métodos

Este experimento foi desenvolvido no biotério do curso de pós-graduação da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR avaliou e aprovou o protocolo de pesquisa usado neste trabalho (Registro CEP/SD: 001.004 SI 06-06).

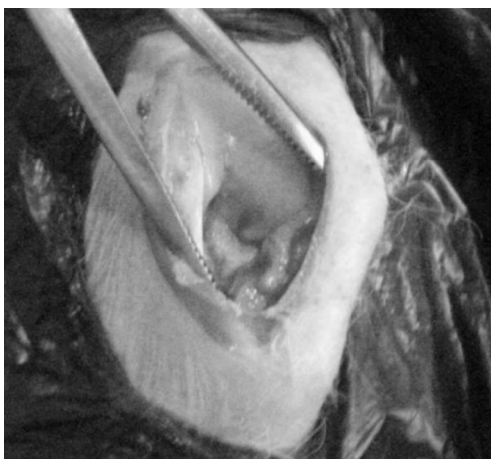
Foram usados 44 coelhos da raça California, machos, que permaneceram alojados antes e durante os procedimentos, em biotério, em gaiolas, com dois animais em cada uma, com alimentação padronizada e livre acesso à água. Foram mantidos em controle de luz (ciclo claro-escuro de 12 horas), com temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), umidade e nível de ruídos mantidos estáveis, com o peso médio de 3,5 kg. Todos os animais inicialmente foram submetidos à ressecção do LCA. O joelho direito foi escolhido apenas como padronização do experimento.



**Figura 1 – Foto da incisão cutânea e capsulotomia do LCA.**

O procedimento cirúrgico consistiu em anestesia pré-operatória com 10 mg/kg de cloridrato de cetamin (Dopalen<sup>®</sup>) e 50 mg/kg de cloridrato de xilasina (Anasedan<sup>®</sup>), administrados na mesma seringa, de forma intramuscular (IM), no ventre dos músculos semimembranáceo e semitendíneo do membro posterior direito. Na mesma ocasião foi administrada injeção de 14.400 UI de penicilinas e 6 mg de estreptomicinas (Pentabiótico Veterinário Reforçado<sup>®</sup> – Eurofarma) como antibioticoprofilaxia e Flunamine<sup>®</sup> (Bayer), na dose de 2,2 mg/kg, por via IM, para analgesia pós-operatória.

O joelho direito foi submetido a tricotomia e a antisepsia com polivinilpirrolidona (Povidini<sup>®</sup>). Após a aplicação de campos estéreis, foi feita incisão parapatelar medial na pele e no tecido subcutâneo, seguida de capsulotomia e luxação lateral da patela (fig. 1). O joelho foi então posicionado em flexão máxima, o que permitiu a visualização do ligamento cruzado anterior. Esse foi seccionado com lâmina de bisturi n<sup>o</sup> 15 (fig. 2), a articulação foi irrigada com solução salina isotônica e procedeu-se à capsulorrafia e sutura da pele com mononáilon 4.0 (fig. 3).



**Figura 2 – Foto da exposição do LCA.**



**Figura 3 – Foto da sutura da pele.**

Um coelho do Grupo 2 e outro do Grupo 3 evoluíram com infecção do sítio operatório com extensão articular e foram excluídos da pesquisa.

Os coelhos permaneceram alojados nas suas respectivas gaiolas após o ato operatório, sem restrição de apoio aos membros operados. Foram distribuídos randomicamente em três grupos com 14 animais cada um. Decorridas três semanas do procedimento cirúrgico iniciaram-se as respectivas injeções intra-articulares. O volume dos ácidos hialurônicos foi de 0,3 mL, similar ao usado em pequenas articulações de seres humanos. Grupo P: controle, três infiltrações com intervalo semanal de solução salina isotônica (SF0,9%); Grupo PR: três infiltrações com intervalo semanal de ácido hialurônico nativo (Polireumin<sup>®</sup>); Grupo S: três infiltrações com intervalo semanal de ácido hialurônico ramificado (Synvisc<sup>®</sup>).

Foram submetidos à eutanásia após 12 semanas do ato cirúrgico. Para isso foram previamente anestesiados como descrito anteriormente e submetidos a injeção intracárdica de tiopental (5 mL) e cloreto de potássio (10 mL). Os platôs tibiais foram ressecados assepticamente, imersos em frasco contendo formol a 10%. Os frascos foram etiquetados para identificação dos grupos e enviados ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas.

Os platôs tibiais foram descalcificados. Os mediais na área de maior espessura da cartilagem foram submetidos a microtomia no plano sagital para confecção de três lâminas por platô tibial com o uso das colorações Alcian Blue pH = 1,0, Alcian Blue pH = 2,5 e Azul de Toluidina e inclusos em parafina.

As lâminas coradas foram enviadas ao Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná no Setor de Ciências Biológicas.

As lâminas histológicas foram digitalizadas automaticamente em um microscópio ZeissImager Z2 Metasystems, com o uso do software MetaferMSearch, com pós-montagem com VSlide. Então, as regiões da cartilagem foram selecionadas com a ferramenta de snapshot do software MetaViewer.

As fotos foram analisadas no software ImageJ, com o uso da ferramenta de RGB Stack para as colorações Alcian Blue pH = 1,0, Alcian Blue pH = 2,5 e Color Deconvolution "RGB" para Azul de Toluidina. Posteriormente, a porcentagem de área marcada foi calculada após um threshold seguido de quantificação.<sup>11</sup>

Todas as substâncias estudadas foram adquiridas com recursos próprios dos pesquisadores, sem auxílio financeiro externo.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância fator único (Anova) seguida por testes F e T não pareados, considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Os gráficos foram construídos com a média de desvio padrão, com o uso do software Microsoft Excel 2007. A avaliação dos dados foi objetiva, padronizada pelo computador, e subjetiva, pelas notas dadas pelo biólogo responsável pela quantificação de coloração no teste qui-quadrado. As notas 1, 2 e 3 foram classificadas como ruim, intermediário e excelente.

## Resultados

As lâminas descalcificadas e coradas com Alcian Blue pH = 1,0, Alcian Blue pH = 2,5 e Azul de Toluidina mostraram a presença de glicosaminoglicanos em maior quantidade, nos grupos PR (Polireumin<sup>®</sup>) e S (Synvisc<sup>®</sup>), quando comparados ao grupo controle P (placebo). O nível de significância usado para todas as análises foi de 5%.

A avaliação da intensidade de coloração dos cortes histológicos corados pelo Alcian Blue pH = 1,0, Alcian Blue pH = 2,5 e Azul de Toluidina pelo aparelho de microscopia ZeissImager Z2 Metasystems gerou resultados que foram dispostos em tabelas e gráficos. A seguir estão os gráficos fornecidos pelo programa, representativos da intensidade real da coloração mensurada em cada grupo das colorações citadas anteriormente.

Por meio da análise usada, cada lâmina gerou um dado dentro do conjunto de dados para cada grupo, que foram "P", "PR" ou "S", totalizando 24 lâminas/indivíduos analisados (oito para cada grupo). Para a análise estatística, a hipótese nula ( $H_0$ ) foi: não há diferença entre as variáveis independentes; a hipótese alternativa ( $H_1$ ): há diferença entre as variáveis independentes. O valor de alfa usado foi 0,05.

Os valores para cada coloração estão presentes nas tabelas 1-4. O teste Kolmogorov-Smirnov constatou que os dados

**Tabela 1 – Números da quantificação do Azul de Toluidina**

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

têm uma distribuição normal (dados não mostrados). Sendo assim, foram usados os testes paramétricos: análise de variância (Anova) fator único e testes t de Student não pareados assumiram variâncias iguais. No teste F foi constatado que as variâncias dos grupos não diferem entre si dentro de uma mesma coloração. Nas colorações de Azul de Toluidina e Alcian Blue pH = 2,5, mas não para pH = 1,0, a Anova apontou para uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) (dados não mostrados). Sendo assim, para essas duas colorações com diferença na Anova foram feitos testes t de Student. Para a coloração de Azul de Toluidina somente diferiram os grupos P versus PR (tabela 2). Para o Alcian Blue pH = 2,5 diferiram os grupos P versus PR e P versus S, mas esse último somente no unicaudal (tabela 5). Para se testar estatisticamente se de fato há diferenças entre os valores do grupo P e S, foi feita uma análise não paramétrica para variáveis categóricas. Para isso, em vez de se analisarem as lâminas com o uso do software ImageJ, foram dadas notas de 1 a 3 para a intensidade de coloração, que, quanto maior a nota, mais intensa a coloração por Alcian Blue pH = 2,5, como descrito anteriormente.<sup>12</sup>

O teste estatístico usado foi o de qui-quadrado de contingência ( $\chi^2$ ). Para esse teste a  $H_0$  foi que os grupos P e S não diferem no padrão de intensidade de coloração, enquanto que na  $H_1$  os grupos P e S são diferentes no padrão de intensidade de coloração. O n usado foi de 16 (oito para cada grupo de tratamento), alfa de 0,05, grau de liberdade dois e  $\chi^2$  tabelado = 5,991. O  $\chi^2$  calculado foi de 32,14286 (tabela 6). Como o valor do  $\chi^2$  calculado é maior do que o tabelado, rejeita-se  $H_0$  e aceita-se a hipótese alternativa.

**Tabela 2 – Análises do teste t de Student da tabela 1**

Informações	Comparações 2 a 2					
	P	PR	P	S	PR	S
Média	53,9	81,2	53,9	68,9	81,2	68,9
Variância	607	277,4	608	382,3	277,4	382,3
Observações	8	8	8	8	8	8
Variância agrupada	442,7		495,1		329,8	
$H_0$ diferença	0		0		0	
df	14		14		14	
t calculado	-2,6		-1,3		1,3	
P ( $T \leq t$ ) unicaudal	0,01		0,10		0,10	
t crítico unicaudal	1,8		1,8		1,76131	
P ( $T \leq t$ ) bicaudal	0,02		0,20		0,20	
t crítico bicaudal	2,1		2,1		2,1	

**Tabela 3 – Números da quantificação do Alcian Blue pH = 1,0**

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

**Tabela 4 – Números da quantificação do Alcian Blue pH = 2,5**

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

## Discussão

Estudos que comparam a eficiência dos ácidos hialurônicos de diferentes pesos moleculares foram publicados nas últimas décadas. Os dados obtidos são discrepantes por causa de seus resultados e modos de avaliação.<sup>13</sup> Na prática clínica tem-se dado preferência ao ácido hialurônico de alto peso molecular para o tratamento da osteoartrose com base em estudos como os feitos por Atamaz et al.<sup>14</sup> e Wobig et al.,<sup>15</sup> que usaram o modelo de osteoartrose em humanos, compararam os ácidos hialurônicos de pesos moleculares diferentes com soro fisiológico infiltrado intra-articularmente e obtiveram resultados melhores com o uso dos ácidos hialurônicos de maior peso molecular, em critérios clínicos e não histológicos.

Entretanto, segundo Karlsson et al.,<sup>16</sup> que estudaram ácidos hialurônicos de diferentes pesos moleculares em infiltrações intra-articulares em humanos com osteoartrose, não ocorreu diferença significativa entre os ácidos hialurônicos de pesos moleculares distintos em critérios clínicos e não histológicos.

Essas controvérsias levaram à feitura deste estudo, no qual se comparou o efeito de um hialuronato de alto peso molecular (Synvisc®) com outro de baixo peso (Polireumin®). Para isso usou-se um modelo experimental de osteoartrose.

O modelo experimental em pequenos animais, que mais se assemelha à osteoartrose presente no ser humano, é a transecção do ligamento cruzado anterior no joelho de coelhos. Mimetiza as alterações morfológicas e bioquímicas observadas em seres humanos com osteoartrose.<sup>5</sup> O coelho

foi o animal escolhido por causa do fácil manejo, do menor custo e por ter vasta literatura que ratifica seu uso para os fins de obtenção de osteoartrose induzida. O prazo do estudo de 12 semanas é relativamente curto para obtenção de AO, porém é o tempo médio usado na maioria dos estudos encontrados na literatura. A anatomia do joelho do coelho é de fácil dissecação e visualização do ligamento cruzado anterior, o que facilita o procedimento cirúrgico de sua transecção.<sup>9,10,17,18</sup>

No presente estudo o manejo com os animais e a dissecação cirúrgica dos joelhos dos coelhos foram de fácil execução. A incisão da pele, a capsulotomia medial com visualização do ligamento cruzado anterior e sua transecção foram de modo rápido e prático. Os platôs dos joelhos submetidos a esse procedimento apresentaram sinais de lesão macroscópica evidente; principalmente os do grupo controle P (placebo-SF 0,9%).<sup>19</sup>

Colorações histológicas específicas para glicosaminoglicanos foram escolhidas para avaliar a cartilagem articular por causa da sua alta sensibilidade para detecção de proteoglicanos. As colorações Alcian Blue pH = 1,0, Alcian Blue pH = 2,5 e Azul de Toluidina têm grande capacidade de corar glicosaminoglicanos e proteoglicanos e foram usadas com êxito em vários estudos histológicos de cartilagem.<sup>20-23</sup> O Alcian Blue pH = 1,0 cora glicosaminoglicanos de modo geral nos diferentes tecidos; já o Alcian Blue pH = 2,5 e o Azul de Toluidina coram especificamente proteoglicanos.

O uso do microscópio ZeissImager Z2 Metasystems e do software MetaferMsearch permitiu a mensuração da intensidade de coloração das lâminas de tecido cartilaginoso.

**Tabela 5 – Testes t de Student da tabela 4**

Informações	Comparações 2 a 2					
	P	PR	P	S	PR	S
Média	41,8	72,2	41,8	63,7	72,2	63,7
Variância	499,7	497,8	499,7	559,1	497,8	559,1
Observações	8	8	8	8	8	8
Variância agrupada	498,7		529,4		528,4	
H <sub>0</sub> diferença	0		0		0	
Df	14		14		14	
t calculado	-2,7		-1,9		0,7	
P (T ≤ t) unicaudal	0,01		0,04		0,2	
t crítico unicaudal	1,8		1,8		1,8	
P (T ≤ t) bicaudal	0,02		0,08		0,5	
t crítico bicaudal	2,1		2,1		2,1	

**Tabela 6 – Dados categóricos da análise do Alcian Blue pH = 2,5**

Grupos de tratamento	Notas		
	1	2	3
P (n=8)	62,5% (5)	12,5% (1)	25% (2)
S (n=8)	25% (2)	12,5% (1)	62,5% (5)

Nota –  $\chi^2$  calculado = 32,14286.

Obteve-se maior intensidade de coloração no grupo S (Synvisc®) e PR (Polireumin®), em relação ao grupo controle P (placebo-SF 0,9%); portanto, as lâminas descalcificadas e coradas com Alcian Blue pH = 1,0, Alcian Blue pH = 2,5 e Azul de Toluidina mostraram a presença de glicosaminoglicanos em maior quantidade, quando comparadas com as do grupo controle P (placebo). Isso confirma a hipótese de que os ácidos hialurônicos testados atuam como condroprotetores, pois preservam uma maior quantidade de proteoglicanos no tecido cartilaginoso dos joelhos infiltrados com hialuronatos.

Não houve diferença estatística na comparação da intensidade de coloração das lâminas dos joelhos infiltrados com ácido hialurônico de alto peso com as de baixo peso molecular. A transposição dos dados encontrados neste estudo em coelhos podem não refletir do mesmo modo em seres humanos.

Paralelamente foi feita uma avaliação de intensidade de coloração por visão direta das lâminas, ou seja, examinador dependente. Para isso foi solicitado a um biólogo que avaliasse as lâminas conferindo-lhes notas. Esse profissional fez a classificação em notas das lâminas coradas com Alcian Blue pH = 2,5 em 1, 2 e 3 como ruim, intermediário e excelente. Obtiveram-se também resultados que confirmaram os resultados conferidos pelo aparelho, ou seja, houve diferença estatística entre os grupos tratados com hialuronatos quando comparados com o grupo placebo e não houve diferença estatística entre os grupos infiltrados com hialuronatos, independentemente do peso molecular. Os dados subjetivos foram avaliados pelo teste qui-quadrado.

A literatura que compara os diferentes pesos moleculares dos hialuronatos nesse modelo experimental é escassa. Shimizu et al.,<sup>24</sup> em um estudo feito em coelhos, concluíram que os ácidos hialurônicos de baixo peso molecular foram superiores aos de maior peso molecular. Não se encontrou nesse estudo a dose usada nas infiltrações para melhor comparação com o presente estudo. No nosso estudo usaram-se aplicações intra-articulares por três semanas como usualmente é feito em seres humanos e o volume aplicado foi de 0,3 mL das três substâncias testadas (ácido hialurônico nativo, ácido hialurônico ramificado e soro fisiológico). A meia vida do ácido hialurônico nativo é de 13 horas, enquanto a do ácido hialurônico ramificado é de 36 horas. O volume de 0,3 mL foi determinado por ser essa a dose recomenda nas pequenas articulações dos seres humanos.<sup>25</sup>

Ghosh e Guidolin,<sup>26</sup> com o uso de modelo experimental de transecção do ligamento cruzado anterior em cães, obtiveram melhores resultados com os ácidos hialurônicos de menor peso molecular. Os mesmos autores, em um estudo *in vitro*, encontraram melhores resultados com o uso de ácido

hialurônico de maior peso molecular, o que contrariou seus estudos em animais. Seria melhor estimulador da produção de componentes da matriz celular, o que poderia ser parcialmente explicado, pois o ácido hialurônico de menor peso molecular penetraria na matriz extracelular mais facilmente, maximizaria sua concentração e promoveria sua interação com as células alvo da sinóvia. Além disso, há evidências de que a ligação das moléculas do ácido hialurônico com os receptores celulares é dependente do peso molecular.<sup>12,13</sup>

Várias são as hipóteses do mecanismo de ação dos ácidos hialurônicos na articulação não patológica dos seres humanos. O ácido hialurônico funcionaria em uma das hipóteses como modulador, por meio da interação com receptores CD44 presentes nos sinoviócitos, atuaria bioquimicamente na articulação e diminuiria a produção de citocinas, prostaglandinas e metaloproteinases.<sup>27-30</sup> Outros efeitos comprovados do ácido hialurônico são recuperar as propriedades fisiológicas do líquido sinovial, diminuir a pressão da força peso e melhorar a distribuição do peso exercido na articulação. Portanto, apresenta importante papel nos efeitos mecânicos articulares.<sup>31</sup>

Resumindo, neste estudo os dados encontrados confirmam os achados de Karlsson et al.,<sup>16</sup> que estudaram os efeitos dos hialuronatos de diferentes pesos moleculares em infiltrações intra-articulares, em humanos com osteoartrose; indicam não haver diferenças quanto ao peso molecular dos ácidos hialurônicos em relação à condroproteção.

## Conclusão

A análise dos efeitos das substâncias ácido hialurônico nativo e ácido hialurônico de cadeia ramificada no modelo experimental de osteoartrose em coelhos demonstrou caráter condroprotetor quando comparados aos do grupo controle (SF 0,9%). Quando o ácido hialurônico de cadeia nativa e o ácido hialurônico de cadeia ramificada foram comparados entre si, não houve diferença estatística significativa.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lin YH, Hou SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14(12):1237-47.
- Bedson J, Jordan K, Croft P. The prevalence and history of knee osteoarthritis in general practice: a case-control study. *FamPract*. 2005;22(1):103-8.
- Lotz M. Osteoarthritis year 2011 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012;20(3):192-6.
- Altman RD, Moskowitz R. Intraarticular sodium hyaluronate (Hyalgan) in the treatment of patients with osteoarthritis of the knee: a randomized clinical trial. *Hyalgan Study Group*. *J Rheumatol*. 1998;25(11):2203-12.

5. Yoshimi T, Kikuchi T, Obara T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Itoh H, et al., Iwata H, Miura T. Effects of high-molecular-weight sodium hyaluronate on experimental osteoarthrosis induced by the resection of rabbit anterior cruciate ligament. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;(298): 296-304.
6. Schiavinato A, Finesso M, Cortivo R, Abatangelo G. Comparison of the effects of intra-articular injections of Hyaluronan and its chemically cross-linked derivative (Hylan G-F20) in normal rabbit knee joints. *Clin Exp Rheumatol.* 2002;20(4):445-54.
7. Hulmes DJ, Marsden ME, Strachan RK, Harvey RE, McInnes N, Gardner DL. Intra-articular hyaluronate in experimental rabbit osteoarthritis can prevent changes in cartilage proteoglycan content. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12(3):232-8.
8. Cooper C, Snow S, McAlindon TE, Kellingray S, Stuart B, Coggon D, et al. Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(5):995-1000.
9. Moskowitz RW. Experimental models of osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Altman RD, Buckwalter JA, Goldberg VM, Hochberg MC, editors. *Osteoarthritis: diagnosis and medical/surgical management.* 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1992. p. 213-52.
10. Sah RL, Yang AS, Chen AC, Hant JJ, Halili RB, Yoshioka M, et al. Physical properties of rabbit articular cartilage after transection of the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res.* 1997;15(2):197-203.
11. Andrade LF. Avaliação da ação do medicamento M1 sobre o melanoma murino "in vivo" [dissertação]. Curitiba. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2011.
12. Chow MT, Tschopp J, Möller A, Smyth MJ. NLRP3 promotes inflammation-induced skin cancer but is dispensable for asbestos-induced mesothelioma. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(10):983-6.
13. Jüni P, Reichenbach S, Trelle S, Tschannen B, Wandel S, Jordi B, et al. Viscosupplementation Trial Gro\*up. Efficacy and safety of intraarticular hylan or hyaluronic acids for osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2007;56(11):3610-9.
14. Atamaz F, Kirazli Y, Akkoc Y. A comparison of two different intra-articular hyaluronan drugs and physical therapy in the management of knee osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2006;26(10):873-8.
15. Wobig M, Bach G, Beks P, Dickhut A, Runzheimer J, Schwieger G, et al. The role of elastoviscosity in the efficacy of viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a comparison of hylan G-F 20 and a lower-molecular-weight hyaluronan. *Clin Ther.* 1999;21(9):1549-62.
16. Karlsson J, Sjögren LS, Lohmander LS. Comparison of two hyaluronan drugs and placebo in patients with knee osteoarthritis. A controlled, randomized, double-blind, parallel-design multicentre study. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41(11):1240-8.
17. Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage.* 1996;4(2):87-98.
18. Laverty S, Girard CA, Williams JM, Hunziker EB, Pritzker KP. The OARSI histopathology initiative – Recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:S53-65.
19. Albano MB, Vidigal L, Oliveira MZ, Namba N, Silva JL, Pereira Filho FA, et al. Análise macroscópica dos efeitos dos hialuronatos e do corticoesteróide no tratamento da osteoartrose induzida em coelhos de coelhos. *Rev Bras Ortop.* 2010;45(3):273-8.
20. Naito K, Watari T, Furuhashi A, Yomogida S, Sakamoto K, Kurosawa H, et al. Evaluation of the effect of glucosamine on an experimental rat osteoarthritis model. *Life Sci.* 2010;86(13-14):538-43.
21. Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:S113-6.
22. Kuroda T, Matsumoto T, Mifune Y, Fukui T, Kubo S, Matsushita T, et al. Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis. *Ups J Med Sci.* 2011;116(2):107-14.
23. Lin W, Shuster S, Maibach HI, Stern R. Patterns of hyaluronan staining are modified by fixation techniques. *J Histochem Cytochem.* 1997;45(8):1157-63.
24. Shimizu C, Kubo T, Hirasawa Y, Coutts RD, Amiel D. Histomorphometric and biochemical effect of various hyaluronans on early osteoarthritis. *J Rheumatol.* 1998;25(9):1813-9.
25. Furtado R, Natour J. Infiltrações no aparelho locomotor: técnicas para realização com e sem o auxílio de imagem. Artmed: Porto Alegre; 2011.
26. Ghosh P, Guidolin D. Potential mechanism of action of intra-articular hyaluronan therapy in osteoarthritis: are the effects molecular weight dependent? *Semin Arthritis Rheum.* 2002;32(1):10-37.
27. Prieto JG, Pulido MM, Zapico J, Molina AJ, Gimeno M, Coronel P, et al. Comparative study of hyaluronic derivatives: rheological behaviour, mechanical and chemical degradation. *Int J Biol Macromol.* 2005;35(1-2):63-9.
28. Takeshita S, Mizuno S, Kikuchi T, Yamada H, Nakimi O, Kumagai K. The in vitro effect of hyaluronic acid on IL-1 $\beta$  production in cultured rheumatoid synovial cells. *Biomed Res.* 1997;18(3):187-94.
29. Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K. Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. *Semin Arthritis Rheum.* 1998;27(6):392-9.
30. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Malesud CJ. Canine osteoarthritis: effects of endogenous neutral metalloproteoglycanases on articular cartilage proteoglycans. *J Orthop Res.* 1988;6(3):379-88.
31. Peyron JG. Intraarticular hyaluronan injections in the treatment of osteoarthritis: state-of-the-art review. *J Rheumatol Suppl.* 1993;39:10-5.