



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO CARLOS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

**BIOMARCADORES DO METABOLISMO DA CARTILAGEM E SUA RELAÇÃO
COM AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, INFLAMATÓRIAS E FUNCIONAIS:
UM ESTUDO SOBRE A LESÃO CONDRAI SECUNDÁRIA EM JOELHOS HUMANOS**

RENATA NOGUERON FRANCO

São Carlos-SP

2011

RENATA NOGUERON FRANCO

**BIOMARCADORES DO METABOLISMO DA CARTILAGEM E SUA RELAÇÃO
COM AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, INFLAMATÓRIAS E FUNCIONAIS:
UM ESTUDO SOBRE A LESÃO CONDRAI SECUNDÁRIA EM JOELHOS HUMANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisioterapia.

Área de concentração: Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia.

Linha de pesquisa: Fisioterapia nas respostas funcionais e inflamatórias do sistema músculo-esquelético e sua relação com performance física

Orientadora: Profa Dra Stela Márcia Mattiello

Apoio financeiro: CNPq (projeto)

São Carlos-SP

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F825bm

Franco, Renata Nogueron.

Biomarcadores do metabolismo da cartilagem e sua relação com as alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais : um estudo sobre a lesão condral secundária em joelhos humanos / Renata Nogueron Franco. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

107 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Osteoartrite. 2. Marcadores biológicos. 3. Cartilagem articular. 4. Ligamento cruzado anterior. 5. Inflamação. 6. Fisioterapia. I. Título.

CDD: 616.7223 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE RENATA NOGUERON FRANCO, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 28 de fevereiro de 2011.

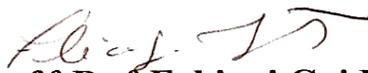
BANCA EXAMINADORA:



**Prof.^a Dr.^a Stela Márcia Mattiello
(UFSCar)**



**Prof. Dr. Thiago Luiz de Russo
(UFSCar)**



**Prof.^a Dr.^a Fabiani Gai Frantz
(USP/FCFRP)**



**Prof.^a Dr.^a Mirhelen Mendes de Abreu
(UFSCar)**



**Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra
(UNICAMP)**

Dedicatória

*Aos meus queridos pais, Edson e Paula,
pela compreensão, apoio, auxílio e carinho em todos os momentos da minha vida,
infinita é a minha gratidão,
amo vocês!*

*Ao meu namorado, Daniel,
pela cumplicidade, companheirismo, apoio e por todo amor e carinho,
pela força nos momentos difíceis, por incentivar este trabalho e não me deixar desistir
A vida é mais bonita e feliz ao seu lado.*

*À querida orientadora Stela Mattiello,
pelos ensinamentos que não se limitaram a parte acadêmica,
pela paciência, incentivo e oportunidade de aprimoramento pessoal e profissional,
muito obrigada!*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus!

Aos meus pais Edson e Paula, à minha irmã Fernanda, aos meus padrinhos Eliana e José, aos meus avós e a todos os meus familiares e amigos, por acreditarem em mim e serem meu alicerce.

Ao professor Dr Edson Rosa Pimentel, por ter me recebido em seu laboratório na Unicamp, por estar sempre disposto a ajudar e ser tão gentil. Obrigada!

À professora Dra Alexandra Ivo Medeiros, pela colaboração na análise das citocinas, pela disposição, pelos ensinamentos compartilhados e pelo clima sempre agradável do laboratório.

Ao professor Dr Moisés Cohen, pela parceria, auxílio e pela colaboração neste projeto.

Ao Dr Márcio Battistella, por ter me recebido tão bem em sua equipe, pela imensa colaboração e auxílio nas coletas. Foram essenciais!

Ao Dr Daniel de Barros Leite Ferreira Ribeiro, por ter me ajudado prontamente na coleta dos controles e no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr Joicemar Tarouco Amaro, pela ajuda e disposição.

À instrumentadora Gi, pela amizade e colaboração durante as coletas.

Ao Donizete, do laboratório Biolab, pela ajuda nos processamentos das amostras, por ter aberto as portas do laboratório tão gentilmente.

À amiga querida e enfermeira Fernanda, que se prontificou em ajudar na coleta do sangue dos controles.

À querida amiga Carolina Dias, companheira de doutorado, companheira de casa, sua ajuda foi fundamental, não só neste trabalho, mas pela sua presença na minha vida. Obrigada pela amizade e conselhos.

Ao companheiro de laboratório Fernando, vulgo Zé, por toda a ajuda nas análises e nos imprevistos automobilísticos da semana.

Ao técnico Chico, do laboratório de biologia molecular da Unicamp, pela auxílio e aprendizado.

Às grandes amigas Vanessa e Valéria, pela amizade, apoio nas horas difíceis, alegria dos bons momentos e pelos cafés e bate-papos sempre animados.

À antiga companheira de apartamento Lúcia Souza Magro, pelo companheirismo, pelo apoio, pela amizade e pelas jantas compartilhadas.

Aos amigos e colegas do laboratório LAFAR, pela companhia e ajuda mútua.

À coordenadora Marluci Barbieri, pelo imenso apoio, pela participação e pela amizade.

Aos voluntários da pesquisa, pela boa vontade e por confiarem no meu trabalho.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro ao projeto.

A todos que contribuíram de alguma forma para esse projeto.

“Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que pérolas, e tudo o que podes desejar não é comparável a ela”. Provérbios 3:13-15.

RESUMO

FRANCO, R.N. **Biomarcadores do metabolismo da cartilagem e sua relação com as alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais: um estudo sobre a lesão condral secundária em joelhos humanos.** 2011. 107 f. Tese (Doutorado em Fisioterapia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

A osteoartrite (OA), doença articular degenerativa, é uma das causas mais frequentes de dor do sistema músculo-esquelético e de incapacidade para o trabalho no Brasil e no mundo. É uma doença crônica, multifatorial, que leva a uma incapacidade funcional progressiva. Pode surgir em decorrência de lesões em estruturas como ligamento cruzado anterior e/ou meniscos (OA pós-traumática), e neste caso, pode afetar indivíduos em qualquer faixa etária. O desenvolvimento da osteoartrite inclui múltiplas mudanças na matriz extracelular da cartilagem, o que altera a configuração morfológica normal da articulação envolvida, levando a um desequilíbrio entre a síntese e degradação dos produtos desta matriz. Apesar da OA não ser considerada primordialmente como uma doença inflamatória, a inflamação articular tem demonstrado um potencial amplificador do processo degenerativo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar potenciais marcadores biológicos no soro e no líquido sinovial, e em seguida correlacioná-los uns com os outros e com as alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais encontradas em sujeitos com lesão crônica do ligamento cruzado anterior (LCA). Para este estudo foram utilizadas técnicas de: zimografia, para verificar a atividade das metalopeptidases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9); Ensaio imunoenzimático (ELISA), para constatar a presença das citocinas sistêmicas e locais; contagem manual de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) por microscopia óptica e espectrofotometria para a análise dos glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs). Os resultados apontaram para uma inflamação articular e sistêmica na lesão crônica do LCA, pela detecção de citocinas sistêmicas e locais, pela atividade das MMP-9 e pelo influxo de neutrófilos. Houve interações entre citocinas sistêmicas e locais, nas quais nem sempre uma citocina exerce a mesma função no soro e no líquido sinovial. As interleucinas (IL) ligadas à degradação da cartilagem na lesão crônica do LCA foram IL-12, IL-6 e IL-8 e as ligadas à dor e a perda de função foram IL-6 e IL-8. Em contrapartida, a MMP-2 apresentou correlação negativa com os danos na cartilagem. Conclui-se que, as moléculas estudadas apresentam potencial como biomarcadores, sendo suas alterações sugestivas de lesão e degradação da cartilagem. E ainda, que após o evento traumático responsável pelo rompimento do LCA, o ambiente permanece inflamado cronicamente e que esta inflamação é crucial para o alto índice de OA pós-traumática.

Palavras-chaves: osteoartrite pós-traumática, lesão condral, citocinas, células polimorfonucleares e mononucleares, glicosaminoglicanos, metalopeptidases.

ABSTRACT

FRANCO, R.N. **Biomarkers of cartilage metabolism and its relationship with morphological, inflammatory and functional changes: a study of secondary chondral injury in human knees.** 2011. 107 f. Tese (Doutorado em Fisioterapia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

Osteoarthritis (OA), a degenerative joint disease, is one of the most frequent causes of pain in the musculoskeletal system and of the inability to work in Brazil and the world. It is a multi-factor, chronic disease, leading to progressive functional inability. It can arise as a result of injuries to structures such as the anterior crossed ligament and/or meniscus (post-traumatic OA), which, in this case, can affect individuals in any age range. The development of osteoarthritis includes multiple changes in the extracellular cartilage matrix, altering the normal morphological configuration of the joint involved, leading to a lack of equilibrium between the synthesis and degradation of products in this matrix. Although OA is not considered primordially as an inflammatory disease, inflammation of the joint has been shown to be a potential amplifier of the degenerative process. Thus the objective of the present study was to analyze potential biological markers in the serum and synovial fluid, and then correlate them with one another and with the morphological, inflammatory and functional alterations found in individuals with chronic injury of the anterior crossed ligament (ACL). The following techniques were used in the study: zymography, to determine the activity of the metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9); an immune-enzymatic assay (ELISA) to determine the presence of systemic and local cytokines; and a manual count of inflammatory cells (mononuclear and polymorphonuclear) by optical microscopy and spectrophotometry, in order to analyze for sulfated glycosaminoglycans (GAGs). The results indicated joint and systemic inflammation in chronic injury of the ACL by the detection of systemic and local cytokines, by the activity of MMP-9 and by the inflow of neutrophils. There were interactions between systemic and local cytokines, in which a cytokine did not always exert the same function in the serum as in the synovial fluid. The interleukines (IL) connected to degradation of the cartilage in chronic injury of the ACL were IL-12, IL-6 and IL-8, and those connected to pain and loss of function were IL-6 and IL-9. In counterpart, MMP-2 showed a negative correlation with the damage to the cartilage. It was concluded that the molecules studied had potential as biomarkers, since alterations were suggestive of injury and degradation of the cartilage. In addition, after the traumatic event resulting in rupture of the ACL, the ambient remained chronically inflamed and this inflammation was crucial for the high index of post-traumatic OA.

Keywords: post-traumatic osteoarthritis, chondral injury, cytokines, polymorphonuclear and mononuclear cells, glycosaminoglycans, metalloproteinases.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Fatores que contribuem para a síntese e a degradação da cartilagem. 17
- Figura 2.** Desenho esquemático da matriz extracelular da cartilagem. 17

MANUSCRITO 1

- Figura 1.** Concentração de citocinas detectáveis no soro nos grupos do estudo. 29
- Figura 2.** Concentração de citocinas detectáveis no líquido nos grupos do estudo. 30

MANUSCRITO 2

- Figura 1.** Grupos baseados no comprometimento condral descrito durante artroscopia. 44
- Figura 2.** Análise da MMP-2 nos grupos. 48
- Figura 3.** Análise da MMP-9 84kDa nos grupos. 48
- Figura 4.** Análise da MMP-9 110kDa nos grupos. 49
- Figura 5.** Níveis de IL-12 e IL-10 nos grupos do estudo. 50

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Tabela 1. Características antropométricas dos sujeitos.	26
Tabela 2. Citocinas detectáveis e não detectáveis no soro e líquido sinovial.	28
Tabela 3. Correlações significativas entre as citocinas do sangue e do líquido com as variáveis do estudo. Valor de R.	31
Tabela 4. Correlações significativas entre as concentrações de citocinas do sangue (à esquerda) e as concentrações de citocinas do líquido (à direita). Valor de R.	31

MANUSCRITO 2

Tabela 1. Características dos grupos com relação às variáveis: tempo de lesão relatada e células MNC e PMN. Variáveis descritas em média e desvio padrão.	47
Tabela 2. Correlação entre as variáveis. Valor de R.	50

MANUSCRITO 3

Tabela 1. Características dos grupos com relação ao índice de massa corpórea (IMC), idade e tempo de lesão relatada.	65
Tabela 2. Valor de R das correlações entre dor e função com as características dos sujeitos.	71
Tabela 3. Valor de R das correlações entre as características dos sujeitos e as variáveis inflamatórias, proteolíticas e de <i>turnover</i> . Estão representados os valores significantes.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
BCA	Ácido Bicinconínico
BIPED	<i>Burden of Disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of Intervention and Diagnostic</i>
BSA	Soroalbumina bovina
DMMB	Azul de dimetilmetileno
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EVA	Escala Visual Analógica
GAGs	Glicosaminoglicanos sulfatados
ICRS	<i>International Cartilage Repair Society</i>
IKDC	Comitê internacional de documentação do joelho
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
LCA	Ligamento Cruzado Anterior
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metalopeptidase
MNC	Mononucleares
NO	Óxido Nítrico
OA	Osteoartrite
PMN	Polimorfonucleares
RNA	Ácido ribonucléico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TGF-β	Fator β de transformação de crescimento
TIMP	Inibidor tecidual de metalopeptidase
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	14
2. INTRODUÇÃO.....	16
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivo específico.....	20
4. MANUSCRITO 1.....	21
4.1. Introdução.....	24
4.2. Materiais e Método.....	25
4.2.1. <i>Sujeitos</i>	25
4.2.2. <i>Coleta do sangue e do Líquido Sinovial</i>	26
4.2.3. <i>Detecção de citocinas do soro e líquido sinovial</i>	26
4.2.4. <i>Análises Estatísticas</i>	27
4.3. Resultados.....	28
4.3.1. <i>Soro</i>	28
4.3.2. <i>Líquido</i>	28
4.4. Discussão.....	32
4.5. Conclusão.....	35
5. MANUSCRITO 2.....	38
5.1. Introdução.....	41
5.2. Materiais e Método.....	43
5.2.1. <i>Sujeitos</i>	43
5.2.2. <i>Aspiração do Líquido Sinovial</i>	44
5.2.3. <i>Dosagem de proteínas</i>	44
5.2.4. <i>Zimografia</i>	45
5.2.5. <i>Detecção de citocinas do líquido</i>	45
5.2.6. <i>Citologia</i>	45
5.2.7. <i>Análises Estatísticas</i>	46
5.3. Resultados.....	47
5.4. Discussão.....	52
5.5. Conclusão.....	55

6. MANUSCRITO 3.....	60
6.1. Introdução.....	63
6.2. Materiais e Método.....	65
6.2.1. <i>Sujeitos.....</i>	65
6.2.2. <i>Escala de dor</i>	65
6.2.3. <i>Avaliação subjetiva da função do joelho.....</i>	66
6.2.4. <i>Número de afecções.....</i>	66
6.2.5. <i>Coleta do Líquido Sinovial.....</i>	66
6.2.6. <i>Avaliação Macroscópica da Cartilagem Articular.....</i>	66
6.2.7. <i>Dosagem de Glicosaminoglicanos Sulfatados.....</i>	67
6.2.8. <i>Dosagem de proteínas.....</i>	67
6.2.9. <i>Zimografia.....</i>	68
6.2.10. <i>Detecção de citocinas do líquido sinovial.....</i>	68
6.2.11. <i>Citologia.....</i>	68
6.2.12. <i>Análises Estatísticas.....</i>	69
6.3. Resultados.....	70
6.4. Discussão.....	74
6.5. Conclusão.....	77
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E ENCAMINHAMENTOS FUTUROS.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
APÊNDICES.....	86
APÊNDICE A - ARTIGO DE QUALIFICAÇÃO.....	87
APÊNDICE B - Termo de consentimento.....	94
APÊNDICE C - Informações do voluntário.....	97
ANEXOS.....	99
ANEXO A - Aprovação do comitê de ética.....	100
ANEXO B- Avaliação Subjetiva do joelho IKDC	102
ANEXO C - EVA – Escala visual analógica.....	106

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A Osteoartrite (OA) é a forma mais comum de artrite das articulações sinoviais, acomete mais de 80% da população de idosos, sendo a doença mais prevalente entre indivíduos com mais de 65 anos de idade (FELICE et al., 2002). A Organização Mundial de Saúde definiu a OA como a 8ª causa de morbidade mundial em 2000 (FRENCH et al., 2009).

A lesão do ligamento cruzado anterior (LCA) demonstrou ser o maior fator de risco para o desenvolvimento da OA, com 50% de chance de o indivíduo vir a desenvolver OA sintomática 10 a 20 anos após o reparo da lesão (CATTERALL et al., 2010). Esta doença progride em um padrão que inclui dor articular, perda de força, incapacidade para marcha e redução da aptidão física (FRANSEN, 2003). A incapacidade resultante reduz a qualidade de vida e aumenta riscos de morbidade e mortalidade (JORDAN, 2003). Apesar deste quadro, os tratamentos clínicos existentes ainda são sintomáticos e paliativos, enquanto que o diagnóstico comumente é realizado quando a lesão condral já está evoluída (LOHMANDER, 1994).

As estatísticas brasileiras apontam que 40% das consultas e 7,5% dos casos de afastamento do trabalho, incluindo a aposentadoria por invalidez do INSS, são devidas ao diagnóstico de OA. Assim, considerando o tratamento, os efeitos colaterais, as perdas funcionais e a perda da produtividade do indivíduo, a OA é uma das doenças mais caras e limitantes, despertando um grande interesse médico-social (FELICE et al., 2002).

A OA pode ser descrita como primária ou idiopática, quando não há uma causa aparente, ou secundária, quando há um fator predisponente, como, por exemplo, lesões no ligamento cruzado anterior e/ou meniscos e/ou lesão osteocondral, que são comuns em traumas na atividade física e desportiva. Neste caso, a progressão da doença, tem se mostrado mais rápida, podendo afetar indivíduos jovens, adultos e idosos. (FELSON; ZHANG, 1998).

Há um crescente interesse na definição do papel da inflamação na OA e na relação desta inflamação com a perda da cartilagem, o que poderia auxiliar no diagnóstico precoce e na evolução dos tratamentos para a doença. Como a OA resulta de eventos biológicos e mecânicos cumulativos que induzem a um desequilíbrio entre síntese e degradação dos tecidos articulares (ADAMAPOULOS et al., 2006), surgiu a idéia de se identificar as alterações na cartilagem por meio dos biomarcadores, ou seja, moléculas da matriz cartilaginosa, proteases ou citocinas envolvidas na perda gradual da cartilagem articular, por

apresentarem um grande potencial de mensuração dos processos patogênicos envolvidos no desencadear da doença.

Recentemente, Bauer et al. (2006) propuseram uma classificação para os biomarcadores na osteoartrite, denominada BIPED (*Burden of Disease, Investigative, Prognostic, Efficacy of Intervention and Diagnostic*), que procura classificar os biomarcadores nos seguintes critérios: a) Marcadores de diagnóstico: identificam a doença pela sua presença; b) Marcadores de gravidade da doença: avaliam a gravidade ou extensão da doença; c) Marcadores de prognóstico: prevêm o aparecimento da OA ou a progressão da doença; d) Marcador de eficácia de intervenção: fornecem informações sobre a eficácia de tratamentos e intervenções; e) Marcadores investigativos: não se encaixam nas categorias acima, porém podem trazer informações importantes para futuras pesquisas.

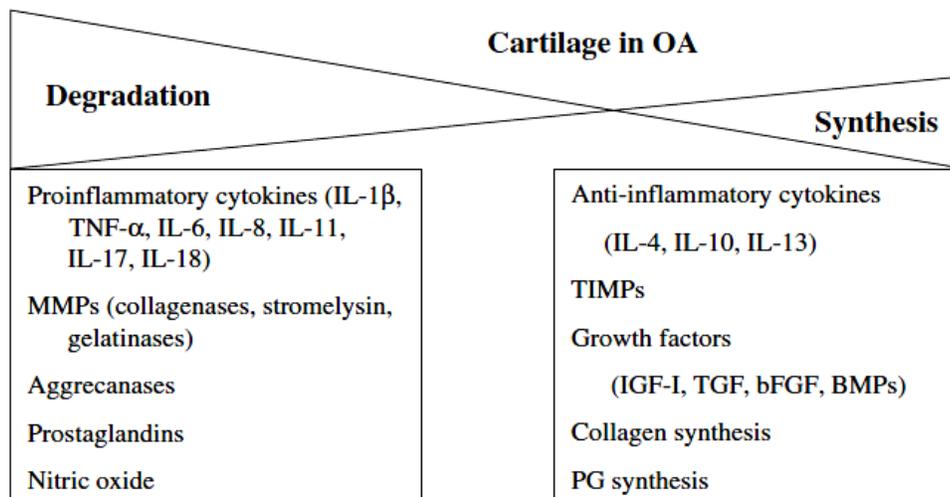
Neste estudo transversal ou *cross-sectional*, o foco é a lesão condral secundária ao rompimento do ligamento cruzado anterior, quadro precursor do desenvolvimento da OA pós-traumática. Sendo assim, pela classificação BIPED, os biomarcadores avaliados no presente estudo poderiam se enquadrar em marcadores de diagnóstico, marcadores de gravidade da doença ou marcadores investigativos.

2. INTRODUÇÃO

A lesão do ligamento cruzado anterior (LCA) traz diversas conseqüências à articulação, como o comprometimento da estabilidade estática. Conseqüentemente, ocorre uma deficiência na função motora do joelho, desencadeando sobrecargas na articulação e micro lesões na cartilagem articular, que posteriormente levam ao aparecimento da OA. Entretanto, o mecanismo responsável pela degeneração da cartilagem após a ruptura do LCA ainda é pouco entendido. A instabilidade mecânica não é o único fator responsável na fisiopatologia da OA pós traumática, que envolve vários processos bioquímicos e microscópicos dentro do ambiente articular e do tecido cartilaginoso (TIDERIUS et al., 2005).

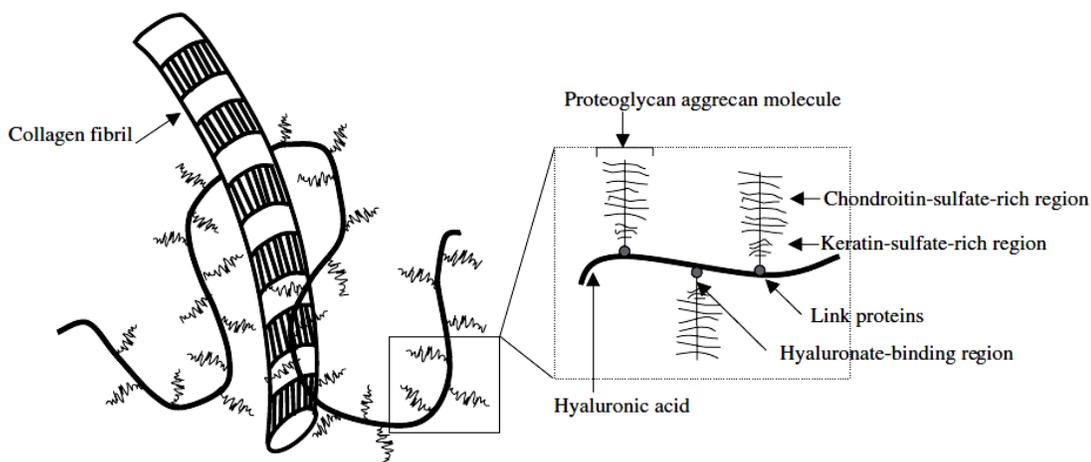
A integridade condral é dependente da complexa rede de colágeno tipo II, proteoglicanos e proteínas acessórias. A rede de colágeno apresenta uma atividade metabólica relativamente inerte, visto que outros constituintes, como o agregado de proteoglicanos, submetem-se a um distinto processo de *turnover*, no qual a quebra metabólica e a remoção de moléculas da matriz extracelular (MEC) estão equilibradas com a síntese e deposição de novas moléculas. As mudanças moleculares ocorridas são conseqüências de eventos de síntese e degradação, regulados por muitos fatores celulares e extracelulares. Entretanto, no início e decorrer de afecções articulares degenerativas, como a OA, este equilíbrio metabólico é interrompido, com o aumento do catabolismo e prejuízo da síntese de componentes da MEC (DALHBERG et al., 1994; MORELAND, 2003), conforme mostra a figura 1.

A MEC é formada por agregados de proteoglicanos entrelaçados em fibrilas de colágeno (figura 2). O proteoglicano é formado por um núcleo protéico central e possui glicosaminoglicanos sulfatados (sulfato de condroitina e queratan sulfato) ligados a esse núcleo. Esses proteoglicanos podem ser encontrados como monômeros e também na forma de agregados. O agregado de proteoglicanos é composto de uma cadeia de ácido hialurônico central (GAG não sulfatado) com múltiplos monômeros de proteoglicano ligados a ele (VANWANSEELE; LUCCHINETTI; STÜSSI, 2002). Os glicosaminoglicanos (GAGs), têm sido estudados por serem indicadores do *turnover* da cartilagem (ELSAID et al., 2008).



Extraído de: Moreland, 2003.

Figura 1. Fatores que contribuem para a síntese e a degradação da cartilagem. Enquanto no tecido normal estes fatores estão em equilíbrio, na osteoartrite (OA) há um predomínio da degradação (MORELAND, 2003).



Extraído de: Moreland, 2003

Figura 2. Desenho esquemático da matriz extracelular da cartilagem.

A principal célula do tecido cartilaginoso é o condrócito, que é responsável pela produção da MEC e de seus componentes. Os condrócitos também são capazes de sintetizar uma variedade de enzimas proteolíticas, entre elas as metalopeptidases (MMPs), que também podem ser secretadas por células inflamatórias. O aumento da atividade proteolítica é apontado como a causa primária da destruição patológica da cartilagem na OA (MARINI et

al., 2003), porém também desenvolvem um papel importante durante os processos inflamatórios na tentativa de combater a lesão e manter a homeostasia do tecido (OKADA, 2000). Em condições normais as MMPs estão presentes em níveis baixos, geralmente na forma latente, podendo ser ativadas por citocinas. A atividade destas proteases pode ser regulada por enzimas inibidoras teciduais de metalopeptidases (TIMPs) (MAKOWSKI, RAMSEY, 1998; OKADA, 2000; YOSHIHARA et al., 2000; MARQUETTI et al., 2008).

Apesar da OA ser preferencialmente definida como uma doença crônica e degenerativa a uma doença inflamatória, a existência e relevância de mudanças inflamatórias na membrana sinovial têm sido demonstradas e estudadas por vários autores (MARINI et al, 2003; GOLDRING, 2000).

Iniciada a degradação da cartilagem, as células sinoviais e inflamatórias fagocitam os produtos da quebra do tecido liberados no líquido sinovial e secretam citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL) 1, a IL-6 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), envolvidos no desenvolvimento da OA (STANNUS et al., 2010; VALDES et al., 2010; GOEKOOP et al., 2010; ADAMAPOULOS et al., 2006; AMIN; ABRAMSON, 1998). Estas citocinas são responsáveis pelo aumento nos níveis de prostaglandinas e de óxido nítrico (NO), descritos como mediadores da inflamação e destruição da cartilagem (BENITO et al., 2005; FIORITO et al., 2005; BRENNER et al., 2003). A presença desses componentes no líquido articular estimula as atividades proteolíticas das células inflamatórias, o que resulta em maior liberação de fragmentos da cartilagem (proteoglicanos e glicosaminoglicanos) no líquido sinovial. Estes fragmentos presentes no líquido podem ser potencialmente agravantes do quadro de OA, já que, segundo trabalhos de Moore et al. (1989, 1993), existe uma relação quimiotática entre os glicosaminoglicanos e as células PMN. Todo este processo contribui para a formação de um ciclo que pode perpetuar o processo osteoartrítico e ser importante na progressão da doença (FRANCO et al., 2008; AMIN; ABRAMSON, 1998).

Na lesão cartilaginosa, a rede de colágenos perde sua integridade e estas macromoléculas são quebradas, liberando seus fragmentos para o líquido sinovial. Estas variações na composição celular e humoral do líquido sinovial refletem as mudanças nos tecidos sinoviais, dos quais o fluido é uma continuidade, e as concentrações dos produtos metabólicos refletem os mecanismos de síntese e degradação dos componentes dos tecidos articulares, inclusive da cartilagem articular (FRISBIE et al., 2008; ADAMAPOULOS et al., 2006). Portanto, a análise deste líquido pode ser um método precoce e confiável de diagnóstico desta doença (RORVIK; GRONDAL, 1995).

Apesar das pesquisas, clinicamente, os diagnósticos e tratamentos ainda não englobam as descobertas descritas acima. Normalmente, o diagnóstico só é realizado quando o paciente apresenta dor, disfunção, efusão e diminuição do espaço articular, porém quando isto ocorre a lesão condral já esta evoluída (LOHMANDER, 1994). Do mesmo modo, as terapias atuais da OA são sintomáticas e visam impedir a progressão da doença, porém, com pouco sucesso. Para o avanço nas propostas de tratamento da OA é necessário maior conhecimento do mecanismo patogênico da doença, principalmente antes que ocorra a instalação do ciclo crônico de degradação da cartilagem (PAGURA et al., 2005).

Até o momento, o líquido sinovial é considerado o melhor fluído para analisar os eventos bioquímicos articulares (FRISBIE et al., 2008; ADAMAPOULOS et al., 2006) e sua coleta também é o procedimento local menos invasivo, porém é limitada pela dificuldade da punção e pela quantidade de líquido ser pequena em articulações sem edema. Por este motivo outros fluídos corporais vem sendo estudados, entre eles o plasma sanguíneo, já que as alterações osteoartíticas envolvem um processo dinâmico de todos os elementos que compõem a articulação, tais como cartilagem, membrana sinovial, osso subcondral, ligamentos e músculo periarticular (FRISBIE et al., 2008; PAGURA et al., 2005). No entanto, poucos estudos investigaram possíveis correlações sistêmicas e locais de biomarcadores. Sendo assim, a análise de líquido sinovial e plasma sanguíneo de um mesmo indivíduo é de grande importância, assim como um melhor conhecimento patogênico local.

Enfim, a associação das informações fornecidas pela avaliação morfológica da cartilagem, feita durante a artroscopia, com a análise das citocinas, do *turnover* e da ação proteolítica sobre a cartilagem articular, podem levar a um quadro mais fidedigno dos processos envolvidos no desenvolvimento e progressão da OA. O conhecimento do mecanismo patogênico e a associação com biomarcadores sistêmicos podem alterar o tratamento paliativo atual para um tratamento preventivo e curativo, em que a atuação clínica ocorra antes das alterações instaladas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Analisar potenciais marcadores biológicos no soro e no líquido sinovial, e em seguida correlacioná-los uns com os outros e com as alterações morfológicas, inflamatórias e funcionais encontradas em sujeitos com lesão crônica do LCA.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar e correlacionar a concentração de citocinas sistêmicas e locais em lesões condrais de diferentes graus após o rompimento crônico do LCA em joelhos humanos.
- Verificar a relação entre as gelatinases e a presença da IL-12 e IL-10 na inflamação articular crônica de sujeitos com ruptura do LCA em diferentes estágios de lesão condral.
- Verificar a relação da dor e da função com a atividade proteolítica e inflamatória na degradação da cartilagem em indivíduos com lesão crônica do LCA.

4. MANUSCRITO 1

Franco RN, Ribeiro DBLF, Battistella M, Medeiros AI, Cohen M, Mattiello SM. A progressão de lesões condrais em joelhos com ruptura do ligamento cruzado anterior e a produção de citocinas sistêmicas e locais.

A PROGRESSÃO DE LESÕES CONDRAIS EM JOELHOS COM RUPTURA DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR E A PRODUÇÃO DE CITOCINAS SISTÊMICAS E LOCAIS.

R.N. Franco[†], D.B.L.F. Ribeiro^{‡‡}, M. Battistella[‡], A.I. Medeiros[‡], M Cohen^{††}, S.M. Mattiello[†].

[†] Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

[‡] Departamento de Imunologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.

^{††} Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil.

^{‡‡} Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.

[‡] Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia, Limeira, SP, Brasil

Resumo

Objetivo: analisar e correlacionar a concentração de citocinas sistêmicas e locais em lesões condrais de diferentes graus após o rompimento crônico do Ligamento cruzado anterior (LCA). **Métodos:** o estudo incluiu 92 sujeitos de ambos os sexos, sendo 77 do sexo masculino e 15 do sexo feminino com média de idade de 32 ± 9.52 que apresentaram lesão crônica do ligamento cruzado anterior. Os sujeitos foram divididos em grupos pelo grau de lesão condral: GC (grupo controle), grupo grau 0, grupo grau 1- 2 e grupo grau 3-4. As citocinas foram quantificadas no soro e líquido sinovial empregando o método de ELISA. Foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e de correlação de Spearman. **Resultados:** há diferenças na concentração de citocinas sistêmicas e locais nos grupos estudados e a ação das citocinas é diferente no soro e no líquido sinovial. A produção de IL-6, IL-8 e IL-12 local está relacionada à degeneração da cartilagem, ao contrário do TGF- β . O efeito das diferentes citocinas garante a permanência da inflamação ao longo do tempo, mesmo nas lesões crônicas. **Conclusão:** A interação entre as citocinas sistêmicas e locais apontou que um aumento da IL-8 e da IL-1 β no soro podem estar relacionados ao aumento da IL-8 no líquido. E ainda, que a IL-6, IL-8 e a IL-12, presentes no líquido, estão ligadas à degradação da cartilagem e correlacionam-se entre si, podendo agir de forma sinérgica no ambiente articular, porém, a IL-12 no soro apresenta uma ação diferente, na qual a queda na concentração sistêmica desta citocina sugere lesões condrais e do LCA.

Palavras chave: citocinas; ligamento cruzado anterior; lesão condral; osteoartrite secundária.

4.1. Introdução

A lesão do ligamento cruzado anterior (LCA) é um importante fator de risco para o desenvolvimento da Osteoartrite (OA) pós-traumática, contudo os mecanismos envolvidos na patogênese desta doença ainda necessitam de investigação (Elsaid et al., 2008). Na OA, a alteração patológica mais importante é a degeneração da cartilagem, que tem sido relacionada a uma produção abundante de citocinas na articulação lesada, (Gobizie et al., 2007).

As citocinas são glicoproteínas solúveis de baixo peso molecular que são reguladoras de reações inflamatórias e imunes. Elas são responsáveis por processos anabólicos e catabólicos que envolvem a integridade da cartilagem articular (Goekoop et al., 2010; Goldring, Goldring, 2004; Oliveira, 2007). Mastócitos e células inflamatórias secretam citocinas e estas estimulam a atividade proteolítica, aumentam os níveis de prostaglandinas e óxido nítrico (NO), que são mediadores da inflamação e destruição da cartilagem (VALDES et al., 2010; GOEKOOP et al., 2010; BRENNER et al., 2003).

As citocinas pró-inflamatórias, principalmente a interleucina (IL) 1 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) exercem um papel de destaque na destruição da cartilagem e no desenvolvimento da OA (Goekoop et al., 2010; Schuerwegh et al., 2003). No entanto, a IL-8 e a IL-6 também estão associadas à degradação da cartilagem, incapacidade funcional e doenças degenerativas articulares, como a OA (Valdes et al., 2010; Sakao et al., 2009; Oliveira, 2007). Ainda é possível encontrar na literatura outras citocinas com potenciais biomarcadores, como é o caso do fator β de transformação de crescimento (TGF- β), porém suas ações na OA não estão bem esclarecidas.

Alguns trabalhos avaliaram a presença de citocinas após a lesão do LCA, analisando marcadores no soro (Catterall et al., 2010) ou no líquido sinovial (Cuellar et al., 2010; Catterall et al., 2010; Elsaid et al., 2008; Marks, Donaldson, 2005; Irie, Uchiyama, Iwaso, 2003) em casos crônicos e agudos, porém, estudos comparando as citocinas sistêmicas e locais concomitantemente ainda são escassos na literatura, bem como estudos que avaliem as alterações condrais precoces decorrentes da ruptura do LCA e as citocinas envolvidas nos diferentes estágios da lesão condral.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar e correlacionar a concentração de citocinas sistêmicas e locais em lesões condrais de diferentes graus após o rompimento crônico do LCA em joelhos humanos.

4.2. Materiais e método

4.2.1. Sujeitos

179 sujeitos de ambos os sexos foram avaliados para este estudo. Sessenta e cinco sujeitos foram excluídos por apresentarem: alterações sistêmicas cardio-respiratórias e/ou reumáticas, presença de sangue na amostra de líquido sinovial, realização de infiltrações articulares e limitações na amplitude de movimento de 0 a 90 graus.

Assim, de acordo com os critérios aplicados, o estudo incluiu 92 sujeitos de ambos os sexos, sendo 77 do sexo masculino e 15 do sexo feminino com média de idade de 32 ± 9.52 anos. Entre os sujeitos analisados, 20 eram saudáveis (controle) e 72 apresentaram lesão crônica do ligamento cruzado anterior (tempo de lesão de 34.6 ± 51.3 meses), associado ou não à lesão meniscal, que foram distribuídos em grupos pelo grau de lesão condral, de acordo com o ICRS (*Internacional Cartilage Repair Society, 2000*):

- GC – grupo controle: sem qualquer história de doença, lesão, trauma, cirurgia, dor no último mês ou fratura de membro inferior, bem como exames normais da articulação do joelho (n= 20). O membro inferior avaliado foi o membro dominante.

- G0 – grupo grau 0- cartilagem normal (n= 26).

- G1-2 – grupo grau 1 e 2 - fibrilação, irregularidades e fissuras de superfície com profundidade < que 50% da cartilagem (n= 17).

- G3-4 – grupo grau 3 e 4 - irregularidades e fissuras com profundidade > que 50% da cartilagem até o osso subcondral (n= 29).

A pontuação do grau de destruição tecidual foi definida utilizando o parâmetro “Score máximo”, representado pelo maior grau de lesão da cartilagem (escala de 0 a 4) encontrado em qualquer uma das regiões dos côndilos femoral, tibial, patela e tróclea.

As características antropométricas dos grupos são apresentadas na tabela 1. Os sujeitos realizaram exames clínicos e de imagem e tiveram indicação cirúrgica via artroscópica para reparo da estrutura lesada. Nenhum voluntário fez uso de anti-inflamatórios (AINEs) nas 3 semanas anteriores da punção de líquido sinovial.

Os voluntários foram esclarecidos quanto às razões do estudo, seus objetivos e procedimentos e assinaram um termo de consentimento como requerido pela Resolução 196/96 do *National Health Committee*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos, registrado no Conselho Nacional de Saúde – Protocolo nº 297/2008.

Tabela 1. Características antropométricas dos sujeitos.

	GC (n= 20)	G0 (n= 26)	G1-2 (n= 17)	G3-4 (n= 29)
Idade (anos)	28.2 ± 8.4	30.3 ± 10.1	34.1 ± 7.2	35 ± 9.8
IMC (Kg/m ²)	23.7 ± 3.8	24.4 ± 3.1	26.1 ± 3.7	26.9 ± 4.3
Peso (Kg)	67.8 ± 16.2	75.2 ± 10.3	80 ± 14	83.6 ± 15.6
Altura (m)	1.67 ± 0.09	1.75 ± 0.07	1.74 ± 0.07	1.76 ± 0.06

IMC- índice de massa corpórea.

4.2.2. Coleta do sangue e do Líquido Sinovial

O sangue foi coletado por procedimento padrão, sendo colhidos 4 ml da fossa antecubital. A amostra foi conservada em geladeira para posterior análise.

A punção do líquido sinovial do joelho lesado foi realizada sob anestesia, previamente às cirurgias. A agulha foi inserida na região suprapatelar lateral do joelho para coleta do líquido da bolsa subquadriceptal. A coleta do grupo controle foi feita de maneira semelhante, porém não houve intervenção cirúrgica posterior, sendo realizada a limpeza e assepsia da face antero-lateral, seguida de anestesia local com 0.5 ml de xilocaína a 1%, sem vasoconstritor. Todos os fluídos foram quantificados em relação ao seu volume puro e armazenados em endorfes a -80°C em freezer (Forma Scientific) para posterior processamento e análise.

4.2.3. Detecção de citocinas do soro e líquido sinovial

O sangue após coleta ficou em repouso na geladeira por 4 horas. A seguir, foi centrifugado a 1500g por 10 min e o sobrenadante foi congelado a -80°C.

O líquido sinovial foi centrifugado a 1700 g por 10 minutos, retirado o sobrenadante e também congelado a -80°C.

Após descongelamento, as citocinas foram quantificadas no soro e líquido sinovial de acordo com instruções do fabricante empregando o método de ELISA “sandwich”. As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TGF- β (BD Biosciences) foram detectadas empregando anticorpos de captura, citocinas-padrão e anticorpos associados à biotina e amplificados com avidina-peroxidase. Como substrato foi utilizado TMB e a reação foi bloqueada adicionando ácido sulfúrico (1 M de H₂SO₄) aos poços. As absorbâncias das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

4.2.4. Análises Estatísticas

Aplicaram-se testes de normalidade e homogeneidade para as variáveis do estudo, sendo indicados testes não paramétricos para análise dos dados. Foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal–Wallis, seguido de comparações múltiplas quando indicado (*Prisma Statistica 5*). O teste de correlação de Spearman (*Statistica for Windows version 7*) foi feito entre citocinas sistêmicas, locais e entre as variáveis IMC, idade, tempo e grau de lesão. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

4.3. Resultados

Não houve diferença entre os grupos quanto às variáveis idade ($p= 0.09$) e IMC ($p= 0.11$). Na população estudada as citocinas detectadas no soro e no líquido foram diferentes entre os grupos, conforme mostra a tabela 2

Tabela 2. Citocinas detectáveis e não detectáveis no soro e líquido sinovial

Citocinas	SORO				LÍQUIDO			
	GC	G0	G1-2	G3-4	GC	G0	G1-2	G3-4
TGF- β	D	D	D	D	D	D	D	D
IL-1 β	D	D	D	D	D	D	D	D
IL-6	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D
IL-8	ND	D	D	D	ND	D	D	D
IL-10	ND	ND	ND	D	ND	D	ND	D
IL-12	D	D	D	D	D	D	D	D
TNF- α	ND	D	ND	D	ND	ND	ND	ND

D-detectável. ND-não detectável.

As figuras 1 e 2 ilustram a concentração das citocinas no soro (figura 1) e no líquido sinovial (figura 2).

4.3.1. Soro:

Houve diferença significativa na concentração de TGF- β entre o grupo controle (GC) e o grupo com lesão condral leve (G1-2), porém a concentração volta a subir nos graus mais avançados. A IL-1 β não apresentou diferenças estatisticamente significativas em sua concentração nos grupos estudados. A IL-8 não foi detectável no grupo controle, mas foi nos grupos com lesão, porém a diferença não foi significativa. Houve diferenças significativas entre o GC e os demais grupos (grau 0, 1-2 e 3-4) para a concentração da IL-12, ou seja, houve redução da IL-12 do soro na lesão crônica isolada do LCA, mesmo sem comprometimento da cartilagem. A IL-10 apresentou baixa concentração na amostra do trabalho, não tendo diferença entre os grupos.

4.3.2. Líquido:

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para o TGF- β , a IL-1 β e a IL-10. A IL-6 e a IL-8 apresentaram diferenças significativas entre o GC e o grupo com grau de lesão condral mais avançado (G3-4). Quanto a IL-12, o GC foi

significativamente diferente dos grupos G1-2 e G 3-4 (comportamento contrário ao do soro), apresentando um aumento na concentração da IL-12 com a lesão condral.

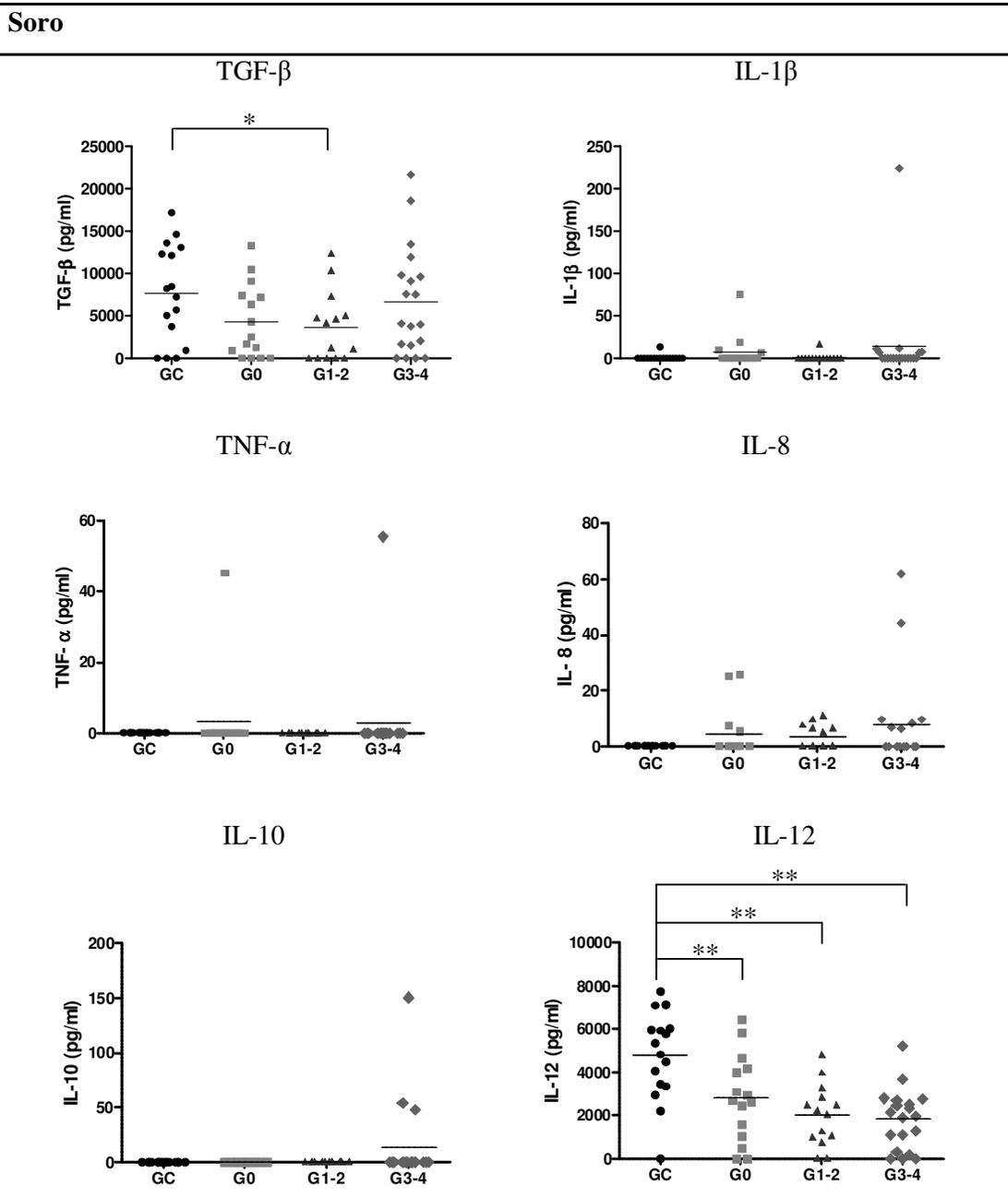


Figura 1. Concentração de citocinas detectáveis no soro nos grupos do estudo. A média da concentração está em destaque nos gráficos. Note que a IL-6 no soro não foi detectável.

*Diferença significativa com $p < 0.05$. **Diferença significativa com $p < 0.01$

Líquido

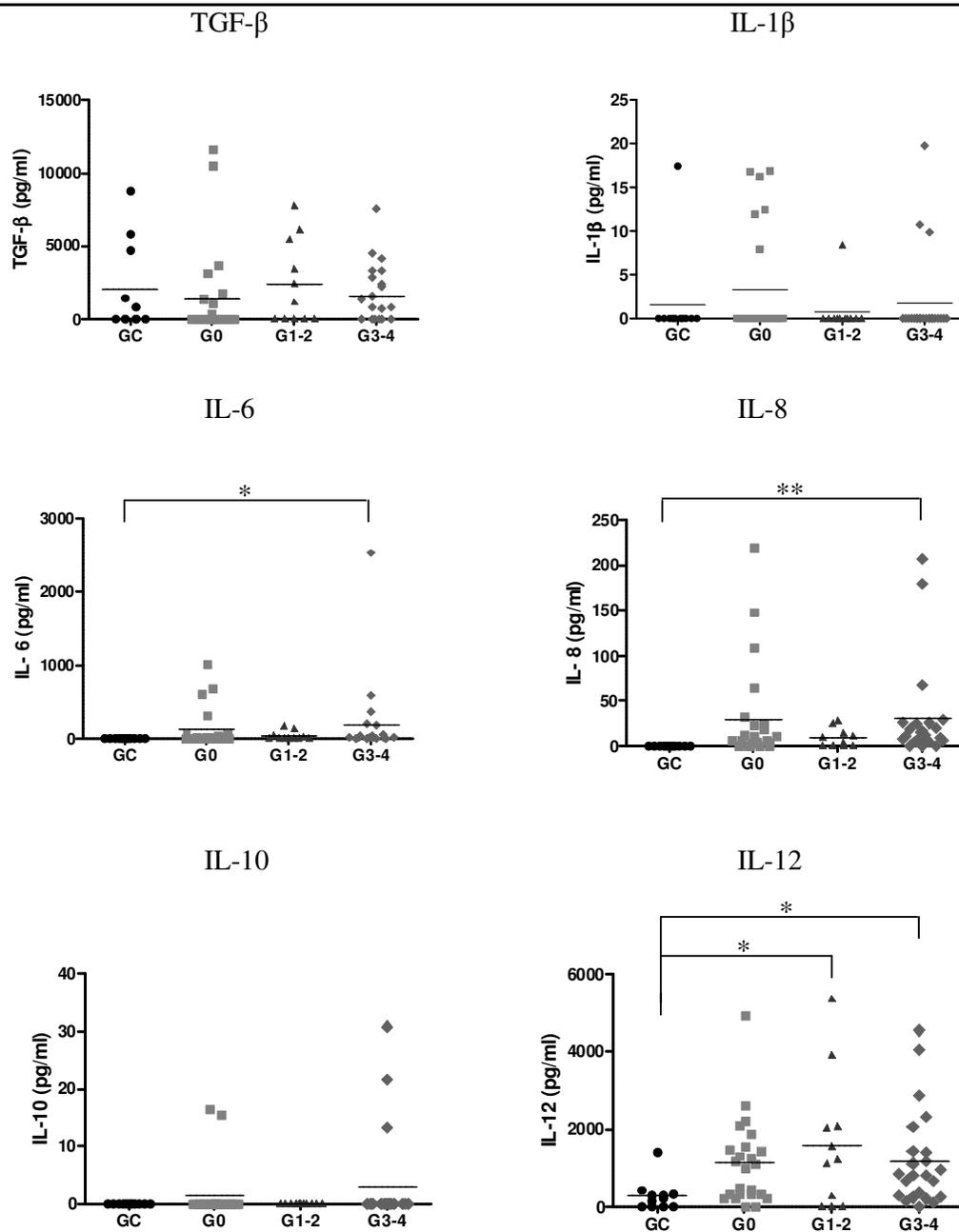


Figura 2. Concentração de citocinas detectáveis no líquido nos grupos do estudo. A média da concentração está em destaque nos gráficos. Note que o TNF- α no líquido não foi detectável. *Diferença significativa com $p < 0.05$. **Diferença significativa com $p < 0.01$

As citocinas do soro e do líquido apresentaram correlações entre si e com as demais variáveis do estudo, como destacado na tabela 3. Foram encontradas correlações positivas e significativas entre a IL-8 local com a IL-1 β ($R = 0.41$, $p < 0.01$) e IL-8 sistêmica ($R = 0.38$,

$p < 0.05$). Uma correlação negativa e significativa foi verificada entre o TGF- β local e a IL-1 β do soro ($R = -0.34$, $p < 0.05$).

Quanto às correlações com as variáveis do estudo, foram encontradas correlações moderadas e positivas entre o grau de lesão e as citocinas do líquido TGF- β ($R = 0.42$, $p < 0.05$), IL-6 ($R = 0.52$, $p < 0.01$) e IL-8 ($R = 0.45$, $p < 0.05$) e correlação negativa e significativa com a citocina do soro IL-12 ($R = -0.45$, $p < 0.01$). O tempo de lesão mostrou correlação positiva e significativa com o TGF- β local ($R = 0.50$, $p < 0.01$), e a idade apresentou valores de correlação positiva e significativa com as citocinas sistêmicas IL-6 ($R = 0.73$, $p < 0.01$) e IL-8 ($R = 0.62$, $p < 0.01$).

Tabela 3. Correlações (R) entre as citocinas sistêmicas e locais com as variáveis do estudo.

	Líq sinovial	TGF- β (pg/ml)	IL1- β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)	Tempo Lesão \S (meses)	Grau (ICRS)	IMC (Kg/m ²)	Idade (anos)
Soro										
TGF- β										-0.29*
IL-1 β		-0.34*			0.41**					
IL-8					0.38*					
IL-12								-0.45**	-0.41**	
Tempo lesão		0.50**						0.35**		
Grau (ICRS)		0.42*		0.52**	0.45*	0.23*	0.35**		0.34**	0.32**
IMC			-0.36*	0.48**					0.34**	0.45**
idade				0.73**	0.62**				0.32**	0.45**

Valores de significância * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$. \S tempo de lesão relatado pelos sujeitos.

No mesmo ambiente (local ou sistêmico) também foram encontradas correlações entre as citocinas (tabela 4). No sangue a melhor correlação foi positiva e significativa entre a IL-1 β e a IL-8 ($R = 0.37$, $p < 0.01$) e no líquido houve correlações moderadas, positivas e significativas entre a IL-6 com a IL-8 ($R = 0.69$, $p < 0.01$) e com a IL-12 ($R = 0.44$, $p < 0.05$) e entre a IL-8 com a IL-12 ($R = 0.56$, $p < 0.01$). Sinergia da IL-12 com IL-8 e IL-6, que também foram relacionadas com o grau de lesão condral.

Tabela 4. Correlações significativas entre as concentrações de citocinas do sangue (à esquerda) e as concentrações de citocinas do líquido (à direita). Valor de R.

Sangue versus sangue				Líquido versus líquido			
TGF- β	vs	IL-1 β	0.25*	TGF- β	vs	IL-12	0.21*
IL-1 β	vs	IL-8	0.37**	IL-6	vs	IL-8	0.69**
IL-12	vs	IL-8	-0.24*	IL-6	vs	IL-12	0.44*
				IL-8	vs	IL-12	0.56**

Valores de significância * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

4.4. Discussão

Os resultados mostram que há diferenças na concentração de citocinas sistêmicas e locais nos grupos estudados, o que nos sugere uma inflamação crônica persistente após a lesão do LCA.

Mais especificamente, foi possível observar que já existe alteração na concentração de citocinas na lesão crônica isolada do LCA, mesmo sem comprometimento da cartilagem, como foi visto no grupo grau 0. Neste grupo pudemos identificar uma redução do TGF- β e da IL-12 no soro e um aumento da IL-1- β , IL-6, IL-8 e IL-12 no líquido sinovial, porém, somente a redução na IL-12 do soro foi considerada significativa na comparação com o grupo controle.

Diferentemente de trabalhos anteriores (Nelson et al., 2009), o TGF- β no soro mostrou uma relação com graus iniciais da lesão condral (G1-2), em que ocorre uma queda na sua concentração, porém esta queda não persiste nos graus avançados, no qual a concentração volta a subir. Estudos experimentais e com humanos tem demonstrado que o TGF- β está envolvido com a condrogênese, osteogênese e síntese de colágeno tipo II e agrecan (Verdier et al., 2005), sendo crucial para a manutenção da cartilagem e quando deficiente, resulta em mudanças como na OA (Anitua et al., 2009).

Segundo Verdier e colaboradores (2005) o TGF- β é o principal fator de oposição da ação da IL-1 no metabolismo dos condrócitos e é importante no reparo da cartilagem. Na OA instalada os condrócitos perdem progressivamente a sensibilidade ao TGF- β e a sua interação com a IL-1, reduzindo a sua ação inibidora (Pujol et al., 2008). Um comportamento semelhante ocorreu na amostra deste estudo, em que houve uma correlação negativa entre o TGF- β do líquido e o IL-1 β do soro, embora no ambiente sistêmico a interação entre ambas citocinas fosse diretamente proporcional. A perda de sensibilidade ao TGF pode ser responsável pela elevação de sua concentração como uma tentativa de compensação na OA, como foi visto no trabalho de Ning e colaboradores (2010) e na correlação positiva com o grau de lesão condral visto em nossos resultados, pois embora o TGF- β possa potencialmente estimular reparo da cartilagem, sua expressão descontrolada pode levar a um excesso indesejável da síntese da matriz (Verdier et al., 2005).

Já a IL-12 mostrou ter ações diferentes sistêmica e localmente, curiosamente há uma queda na sua concentração no soro no grupo com lesão do LCA (G0) e nos grupos com lesão condral (G1-2 e G3-4), independente do grau de lesão da cartilagem. Contudo, verificou-se uma ação contrária no líquido sinovial, em que houve uma elevação com a lesão das

estruturas articulares, sendo que diferença significativa foi vista nos grupos com lesão condral (G1-2 e G3-4). A IL-12 foi descrita na literatura como provedora da conversão de um processo inflamatório agudo para um processo imuno destrutivo crônico, além disso, a inibição da síntese de condrócitos foi um dos efeitos nocivos da inflamação articular com o aumento da concentração de IL-12 vista por Joosten e colaboradores (2002). Estes autores observaram um número elevado de células inflamatórias em cortes histológicos do tecido sinovial na presença de concentrações elevadas de IL-12, com perda de proteoglicanas, morte de condrócitos e erosão da cartilagem. Porém, com base em nossos resultados para a concentração da IL-12 sistêmica, podemos inferir que esta citocina tem ações inflamatórias diferentes no sangue e no líquido, pois, além de estar mais elevada no soro do grupo controle, sua concentração sistêmica também apresentou uma correlação negativa com o grau de lesão condral. A atuação da IL-12 no sistema auto-imune e no soro de sujeitos com lesão da condral não está totalmente esclarecida.

Corroborando com trabalhos que apontaram que a IL-12 pode agir em sinergia com outras citocinas e auxiliar na produção do óxido nítrico (Joosten et al., 2002), verificamos na população estudada correlação positiva entre a IL-12 do líquido e as IL-6 e IL-8, que também estão relacionadas entre si. Estas citocinas são responsáveis pelo aumento nos níveis de prostaglandinas e de óxido nítrico (NO), descritos como mediadores da inflamação e da destruição da cartilagem (Brenner et al., 2003; Abramson et al., 2001a, 2001b). Sendo assim, a presença local da IL-12 deve ser vista com cautela após a lesão do LCA.

Neste estudo não encontramos diferenças nas citocinas apontadas pela literatura como peças chave na patogênese da OA, que são a IL-1 β e TNF- α (Bondeson et al., 2006, Goekoop et al., 2010), talvez por eles analisarem quadros de OA instalada, com alterações macroscópicas e radiográficas, como osteófitos e diminuição do espaço articular. Elsaid e colaboradores (2008) verificaram que a IL-1 β , TNF- α e a IL-6 também estavam elevadas nos casos recentes de lesão do LCA, a primeira declinando após cerca de 3 meses e as duas últimas em torno de 6 meses da lesão. Como a amostra do nosso trabalho tem uma média de tempo de lesão em torno de 34,6 meses, as concentrações de IL-1 β e TNF- α já poderiam estar muito baixas para serem detectáveis. E ainda, apesar da lesão condral ser crônica, a osteoartrite propriamente dita, com os sinais descritos acima, não estaria instalada de fato, inclusive nos grupos com grau mais grave de lesão cartilaginosa.

Com base na concentração de citocinas analisadas neste trabalho, verificou-se que o fator desencadeante do processo inflamatório na OA pós-traumática ainda é o rompimento do LCA, e que mesmo em casos de lesão crônica, algumas das citocinas apontadas em lesões

agudas do LCA (IL-6, IL-8) (Cuellar et al., 2010; Elsaid et al., 2008; Irie, Uchiyama referenciam, Iwasa, 2003), ainda são produzidas, e que a manutenção destas leva ao comprometimento da cartilagem, como nos sugere os trabalhos que verificaram alteração destas citocinas na OA instalada (Goekoop et al., 2010, Valdes et al., 2010, Scanzello et al., 2009) e que estão de acordo com nossos resultados, que também apontaram uma concentração da IL-6 e da IL-8 aumentadas significativamente no líquido sinovial dos grupos com lesão condral avançada (G3-4).

Enfim, os dados apresentados mostram que, com exceção da IL-8, nenhuma outra citocina analisada apresentou correlação entre sua concentração sistêmica e local, sugerindo que a interação entre elas não é direta, a exemplo da IL-1 β soro com o TGF- β e a IL-8 do líquido. E ainda, que em alguns casos como a IL-12, sua ação possa ser diferente no sangue e no líquido sinovial. Desta forma, investigações sobre a patogênese e a progressão da lesão condral, precoce à instalação da OA, devem ser feitas não apenas no soro ou no líquido, mas sim em ambos.

4.5. Conclusão

Nas condições experimentais realizadas os resultados apontaram que, a inflamação articular e sistêmica, determinada pela presença de citocinas, está presente nos portadores de lesão crônica do LCA. A interação entre as citocinas sistêmicas e locais apontou que um aumento da IL-8 e da IL-1 β no soro podem estar relacionados ao aumento da IL-8 no líquido.

E ainda, que a IL-6, IL-8 e a IL-12, presentes no líquido, estão ligadas à degradação da cartilagem e correlacionam-se entre si, podendo agir de forma sinérgica no ambiente articular, porém, a IL-12 no soro apresenta uma ação diferente, na qual a queda na concentração sistêmica desta citocina sugere lesões condrais e do LCA.

Referências

- Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001a;15:831–845.
- Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001b;3: 535
- Anitua E, Sánchez M, de la Fuente M, Azofra J, Zaldueño M, Aguirre JJ, Andía I. Relationship between Investigative Biomarkers and Radiographic Grading in Patients with Knee Osteoarthritis. *Int J Rheumatol*. 2009; 2009: 747432, 4.
- Bondeson J, Wainwright SD, Laudr S, Amos N, Hughes C. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(6):R187.
- Brenner SS, Klotz U, Alschner DM, Mais A, Lauer G, Schweer H, Hannsjo WS, Fritz P, Bierbach U. Osteoarthritis of the knee – clinical assessments and inflammatory markers *OsteoArthritis and Cartilage* 2003; 12, 469–475.
- Catterall JB, Stabler TV, Flannery CR, Kraus VB. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254). *Arthritis Res Ther* 2010; 12:R229.
- Cuellar, VG, Cuellar JM, Golish R, Yeomans DC, Scuderi G. Cytokine profiling in acute anterior ligament injury. *J Arthrosc Rel Surg* 2010; 26(10): 1296-1301.
- Elsaid KA, Fleming BC, Oksendahl HL, Machan JT, Fadale PD, Hulstyn MJ, Shalvoy R, Jay GD. Decreased lubricin concentration and markers of joint inflammation in synovial fluids from patients with anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum* 2008; 58(6): 1707-1715.
- Gobizie R, Kho A, Krastins B, Sarracino DA, Thornhill TS. High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(2):2-15.
- Goekoop RJ, Kloppenburg M, Kroon HM, Frolich M, Huizinga TWJ, Westendorp RGJ, Gussekloo J. Low innate production of interleukin-1 β and interleukin-6 is associated with the absence of osteoarthritis in old age. *Osteoarthritis Cartilage* 2010 jul; 18(7): 942-7.
- Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Rel Res* 2004; 427S:S27-S36.
- ICRS Document: Clinical cartilage injury evaluation system. January 2000.
- Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee* 2003; 10: 93-96.
- Joosten LA, Heuvelmans-Jacobs M, Lubberts E, van de Loo FA, Bakker AC, Helsen MM, Richards CD, van den Berg WB. Local interleukin-12 gene transfer promotes conversion of an acute arthritis to a chronic destructive arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002 May;46(5):1379-89.

Marks PH, Donaldson MLC. Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee. *J Arthroscopic Rel Surg* 2005; 21(11):1342-1347.

Nelson AE, Frang F, Shi XA, Kraus VA, Stabler T, Renner JB, Schwartz TA, Helmick CG, Jordan JM. Failure of serum transforming growth factor-beta (TGF- β) as a biomarker of radiographic osteoarthritis at the knee and hip: a cross-sectional analysis in the Johnston County Osteoarthritis Project. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:772-776.

Ning L, Ishijima M, Kaneko H, Kurihara H, Arikawa-Hirasawa E, Kubota M, Liu L, Xu Z, Futami I, Yusup A, Miyahara K, Xu S, Kaneko K, Kurosawa H. Correlations between both the expression levels of inflammatory mediators and growth factor in medial perimeniscal synovial tissue and the severity of medial knee osteoarthritis. *Int Orthop*. 2010 Jun ; DOI 10.1007/s00264-010-1045-1.

Oliveira DMG. Índices plasmáticos de interleucina-6, força muscular e capacidade funcional em idosos da comunidade [dissertação de mestrado] Federal University of Minas Gerais/Br 2007; 79p.

Pujol JP, Chadjichristos C, Legendre F, Bauge C, Beauchef G, Andriamanalijaona R, Galera P, Boumediene K. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect Tissue Res*. 2008;49(3):293-7.

Sakao K, Takahashi KA, Arai Y, Saito M, Honjo K, Hiraoka N, Asada H, Shin-Ya M, Imanishi J, Mazda O, Kubo T. Osteoblasts derived from osteophytes produce interleukin-6, interleukin-8, and matrix metalloproteinase-13 in osteoarthritis. *J Bone Miner Metab* 2009; 27(4):412-23.

Scanzello CR, Umoh E, Pessler F, Diaz-Torne C, Miles T, Dicarlo E, Potter HG, Mandl L, Marx R, Rodeo S, Goldring SR, Crow MK. Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009 Aug;17(8):1040-8.

Schuerwegh AJ, Dombrecht EJ, Stevens WJ, Van Offel JF, Bridts CH, De Clerck LS. Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 Sep;11(9):681-7.

Valdes AM, Arden NK, Tamm A, Kisand K, Doherty S, Pola E, Cooper C, Tamm A, Muir KR, Kerna I, Hart D, O'Neil F, Zhang W, Spector TD, Maciewicz RA, Doherty M. A meta-analysis of interleukin-6 promoter polymorphisms on risk of hip and knee osteoarthritis 2010 May ;18(5): 699-704

Verdier MP, Seité S, Guntzer K, Pujol JP, Boumédiène K. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int*. 2005 Mar;25(2):118-24.

5. MANUSCRITO 2

Franco RN, Cintra Neto PFA, Medeiros AI, Cohen M, Peviani SM, Dias CNK, Mattiello SM.

A atividade da gelatinase e a expressão da IL-12 e IL-10 na progressão da lesão condral após ruptura do ligamento cruzado anterior.

**A ATIVIDADE DA GELATINASE E A EXPRESSÃO DA IL-12 E IL-10 NA
PROGRESSÃO DA LESÃO CONDRAL APÓS RUPTURA DO LIGAMENTO
CRUZADO ANTERIOR.**

R.N. Franco[†], P.F.A. Cintra Neto[†], A.I. Medeiros[‡], M. Cohen^{††}, S.M. Peviani[†], C.N.K. Dias[†]
e S.M. Mattiello[†].

[†] Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

[‡] Departamento de Imunologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.

^{††} Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo, SP,
Brasil.

Resumo

Objetivo: verificar a relação entre as gelatinases e a presença da interleucina (IL) 12 e IL-10 na inflamação articular crônica de sujeitos com ruptura do LCA em diferentes estágios de lesão condral. **Material e Método:** O estudo incluiu 59 sujeitos (48 do sexo masculino e 11 do sexo feminino) com média de idade de 39.16 ± 13.14 anos divididos em um grupo controle (grupo I) e 3 grupos, baseados no nível de lesão condral: grupo II (lesões leves), grupo III (lesões moderadas) e grupo IV (lesões graves). O líquido sinovial foi puncionado e processado. A morfometria manual, das células inflamatórias mononucleares (MNC) e polimorfonucleares (PMN), foi realizada por microscopia óptica após coloração com May-Grünwald-Giemsa. A atividade das metalopeptidases (MMPs) e das citocinas foram verificadas por meio das técnicas de zimografia e ELISA respectivamente. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com o Post hoc de Newman-Keuls. Também foi utilizada a correlação de Spearman. **Resultados:** não houve diferenças quanto à atividade da MMP-2 em relação aos grupos estudados e sua expressão mostrou correlação negativa com a gravidade das lesões. Não houve diferenças significativas entre os grupos quanto às células MNC. As PMN não foram encontradas no controle. A MMP-9 teve uma maior atividade nos grupos lesados com relação ao grupo controle. Foi detectada a IL-12 na amostra, a qual foi relacionada com os danos na cartilagem e com a MMP-9. A IL-10 foi pouco detectada. Houve interação entre as citocinas, as células e as gelatinases. **Conclusão:** Os PMN, as MMP-9 e a IL-12 parecem estar relacionados entre si e terem participações importantes no ciclo de destruição da cartilagem. Os resultados apresentados sugerem que uma supressão eficiente da expressão da IL-12 e da MMP-9 poderiam levar ao controle ou à diminuição da inflamação articular nestes indivíduos.

Palavras chave: cartilagem; gelatinase; interleucina-12; leucócitos polimorfonucleares e mononucleares; osteoartrite pós-traumática.

5.1. Introdução

Os danos no tecido condral favorecem o desenvolvimento da osteoartrite (OA), que progride de forma mais rápida quando a lesão da cartilagem ocorre após um trauma, comum em atividades esportivas, que pode envolver estruturas como ligamento cruzado anterior (LCA) e/ou meniscos (Dalhberg et al., 1994; Tiderius et al., 2005).

A identificação dos primeiros sinais de lesão condral, por exames de imagem ainda é difícil, apesar do alto nível das técnicas utilizadas (Marini et al., 2003). Assim, o monitoramento das lesões por meio dos marcadores biológicos tornou-se uma possibilidade precoce de avaliação e acompanhamento do micro-ambiente articular (Mazières et al., 2006), o qual reflete a integridade do tecido cartilaginoso que é dependente da complexa rede de colágeno tipo II, proteoglicanos e proteínas acessórias.

O início e desenvolvimento de afecções articulares degenerativas, como as advindas da ruptura crônica do LCA, modificam o equilíbrio metabólico do tecido cartilaginoso, pelo aumento do catabolismo (Dalhberg et al., 1994; Gupta et al., 2007). Desta forma, iniciada a degradação da cartilagem, as células sinoviais e inflamatórias fagocitam os produtos da quebra do tecido deixados no líquido sinovial e secretam citocinas pró-inflamatórias (Adamopoulos et al., 2006). Estas citocinas são responsáveis pelo aumento nos níveis de prostaglandinas e de óxido nítrico (NO), descritos como mediadores da inflamação e destruição da cartilagem (Benito et al., 2005; Fiorito et al., 2005).

Paralelamente à via de degradação condral, determinada pelas células inflamatórias da sinovite, os condrócitos sintetizam uma variedade de enzimas proteolíticas, entre elas as metalopeptidases (MMPs), que também estão diretamente envolvidas na quebra da matriz extracelular (MEC) (Marini et al., 2003). Estas enzimas desenvolvem um papel importante durante os processos inflamatórios na tentativa de combater a lesão e manter a homeostasia do tecido (Okada, 2000). Em condições normais as MMPs estão presentes em níveis baixos, geralmente na forma latente, sendo ativadas por citocinas e secretadas também por células inflamatórias. A sua atividade pode ser regulada por enzimas inibidoras teciduais de metalopeptidases (TIMPs) (Makowski, Ramsey, 1998; Okada, 2000; Yoshihara et al., 2000; Marquetti et al., 2008b). O aumento da atividade proteolítica é apontado como a causa primária da destruição patológica da cartilagem.

Considerando que a composição celular e humoral do líquido sinovial refletem as mudanças nos tecidos sinoviais (Adamopoulos et al., 2006; Shmerling, 1994; Frisbie et al., 2008), vários componentes e moléculas articulares têm sido estudados com o intuito de se

identificar marcadores biológicos, como é o caso da atividade das MMPs (Pelletier et al., 2010), entre elas, a gelatinase A – MMP-2 (72-kDa) e a gelatinase B – MMP-9 (forma tripla 92-,130-e 225-kDa). As gelatinases são derivadas de neutrófilos, estão elevadas após stress mecânico (Makowski, Ramsey, 1996, 1998; Kurz et al., 2005) e parecem estar relacionadas com o avanço da degradação da cartilagem (Myers, Brandt, Albrecht, 2000; Okada, 2000; Gupta et al., 2007, Yang et al., 2008).

Sabe-se que ocorre uma manutenção da inflamação articular no período crônico da lesão do LCA (Franco et al.,2008), porém, o motivo da persistência dessa inflamação ainda não está clara. Os glicosaminoglicanos livres, liberados pela degradação da cartilagem, foram apontados como uma das possíveis causas do influxo de neutrófilos (Franco et al.,2008), contudo, para o avanço das estratégias de tratamento e controle da doença, os mediadores inflamatórios da lesão condral devem ser rigorosamente investigados. Desta forma, a importância da inflamação na patofisiologia da OA tem sido reconhecida (Ning et al., 2010).

A interleucina (IL) 12 é descrita na literatura como responsável pela conversão do processo inflamatório agudo em imuno-destrutivo crônico (Joosten et al., 2002), enquanto a IL-10 já foi apontada como supressora da gravidade da inflamação causada pela IL-12 (Kim et al., (2000). Sendo assim, o risco de vir a desenvolver OA após a lesão do LCA pode estar relacionado à presença e interação destas citocinas com as proteases no líquido articular.

Portanto, estabelecer o perfil proteolítico na degradação da cartilagem é tão importante quanto verificar os mediadores responsáveis por ele. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a relação entre as gelatinases e a presença da IL-12 e IL-10 na inflamação articular crônica de sujeitos com ruptura do LCA em diferentes estágios de lesão condral.

5.2. Materiais e método

5.2.1. Sujeitos

Setenta sujeitos de ambos os sexos foram avaliados para este estudo. Vinte e um sujeitos foram excluídos por apresentarem: alterações sistêmicas cardiorrespiratórias e/ou reumáticas, ausência de líquido sinovial durante a coleta, presença de filetes de sangue na amostra de líquido sinovial, presença de lesão pregressa à atual, presença de qualquer doença osteomioarticular do membro inferior contra-lateral, realização de infiltrações articulares, limitações na amplitude de movimento de 0 a 90 graus, ou tempo de lesão menor que 4 semanas ou superior a 14 meses.

Assim, de acordo com os critérios aplicados, o estudo incluiu 59 sujeitos de ambos os sexos, sendo 48 do sexo masculino e 11 do sexo feminino com média de idade de 39.16 ± 13.14 anos. Entre os participantes, 12 eram saudáveis e o restante apresentou lesão do LCA devido a trauma durante a prática de futebol, associado ou não à lesão do menisco. Foram feitos exames clínicos e de imagem e 47 tiveram indicação cirúrgica via artroscópica para reconstrução ligamentar.

Os sujeitos analisados foram divididos em grupos de acordo com a gravidade da lesão condral (figura 1), que foi verificada pela artroscopia (Ficat, Philippe, Hungerford, 1979; Maiotti, Campi, 1990; Maiotti et al., 2000; Marini et al., 2003):

- a) Grupo I – controle, sem lesão ligamentar e sem lesão condral - não apresentaram nenhum tipo de afecção no joelho relatada e avaliada clinicamente ($n = 12$ e 24.5 ± 2.19 anos);
- b) Grupo II – lesões condrais leves - lesões fechadas, ou seja, superfície da cartilagem aparentemente intacta, mas com indicativo de edema durante a palpação ($n = 16$ e 37.93 ± 13.02 anos);
- c) Grupo III – lesões condrais moderadas – lesões abertas, ou seja, com fissuras, mas sem exposição de osso subcondral ($n = 16$ e 41.73 ± 10.04 anos);
- d) Grupo IV – lesões condrais graves – lesões abertas com exposição de osso subcondral ($n = 15$ e 52.25 ± 7.12 anos).

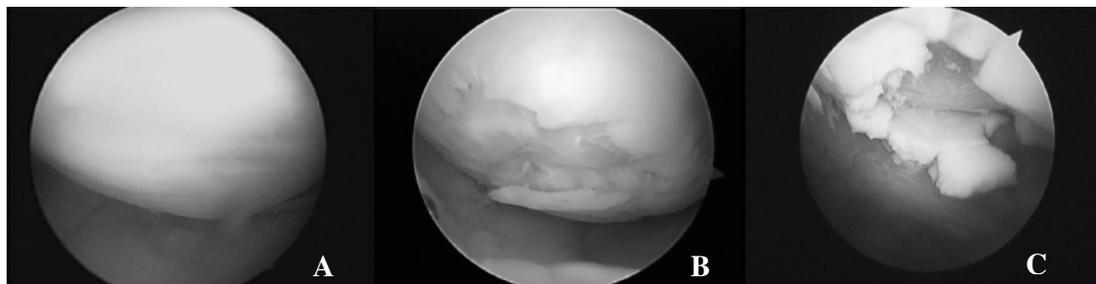


Figura 1. Grupos baseados no comprometimento condral descrito durante artroscopia. **A.** Grupo II – Lesões leves - superfície da cartilagem aparentemente intacta, mas com indicativo de edema durante a palpação. **B.** Grupo III – Lesões moderadas – com fissuras, mas sem exposição de osso subcondral. **C.** Group IV – Lesões graves – com exposição de osso subcondral.

Nenhum voluntário relatou trauma recorrente ou fez uso de anti-inflamatórios (AINEs) nas 3 semanas anteriores da punção de líquido sinovial.

Os voluntários foram esclarecidos quanto às razões do estudo, seus objetivos e procedimentos e assinaram um termo de consentimento como requerido pela Resolução 196/96 do *National Health Committee*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos - protocolo nº 297/2008.

5.2.2. Aspiração do Líquido Sinovial

A coleta do líquido sinovial do joelho lesado foi realizada por meio de punções prévias às cirurgias. Para este procedimento, foi feita a tricotomia da face ântero-lateral do joelho lesado e, após anestesia, a punção, pelo cirurgião. A agulha foi inserida na região supra patelar lateral do joelho para coleta do líquido da bolsa subquadriceptal.

Todos os fluídos foram quantificados em relação ao seu volume puro e divididos em três amostras para armazenamento.

Posteriormente a cada coleta sinovial, o material foi congelado a -80°C em freezer (Forma Scientific) até seu processamento e análise.

5.2.3. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o kit BCATM Protein Assays (Pierce), segundo instruções do fabricante. Esse método é baseado no ácido bicinconínico (BCA) para detecção colorimétrica e quantificação de proteínas totais. Foi construída uma curva padrão baseada nas concentrações de 25 $\mu\text{g/ml}$ a 2000 $\mu\text{g/ml}$ de BSA (soroalbumina

bovina). As absorbâncias da curva padrão e das amostras de interesse foram lidas a 562 nm e a concentração protéica foi estimada a partir delas.

5.2.4. Zimografia

As amostras de líquido sinovial dos sujeitos foram diluídas para uma concentração de 2 µg/ml. Iguais quantidades de proteínas totais (30 µg/poço) foram submetidas à eletroforese em triplicatas. A técnica de zimografia, conforme descrita por Cleutjens e colaboradores (1995), consistiu de géis de poliacrilamida a 10% contendo gelatina (1mg/ml). Após aproximadamente 2 horas de eletroforese, os géis foram lavados 2 vezes durante 30 min em solução de 2.5% de Triton X-100 para remoção do SDS e em seguida incubado em tampão de substrato (Tris-HCL 50 mM pH 8.0, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0.02%) a 37 °C por 24 horas. Após este tempo, os géis foram corados com Cromassie Blue por 30 minutos, e então, descorados com ácido acético: metanol: água (1: 4: 5) para visualização das bandas de atividade.

As amostras também foram incubadas com EDTA (15 mM), para verificar se as proteases eram metalopeptidases, uma vez que o EDTA inibe sua atividade. Para documentação, os géis foram fotografados utilizando uma câmera (Cânon PowerShot G6) e as médias de intensidade das bandas foram analisadas utilizando o software Gene Tool versão 3.06 (Syngene).

5.2.5. Detecção de citocinas do líquido

O líquido sinovial foi centrifugado a 1700 g por 10 minutos, retirado o sobrenadante e também congelado a -80°C.

Após descongelamento, as citocinas foram quantificadas no líquido sinovial de acordo com instruções do fabricante empregando o método de ELISA “sandwich”. As citocinas IL-10 e IL-12 (BD Biosciences) foram detectadas empregando anticorpos de captura, citocinas-padrão e anticorpos associados à biotina e amplificados com avidina-peroxidase. Como substrato foi utilizado TMB e a reação foi bloqueada adicionando ácido sulfúrico (1 M de H₂SO₄) aos poços. As absorbâncias das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

5.2.6. Citologia

O líquido sinovial armazenado foi preparado para análise citológica, sendo processado em cito-centrífuga FANEM®, modelo CITOSPIN® - 248 por 5 minutos, sob uma rotação de

1.500g, sendo utilizado 100 µl em cada amostra do recipiente, previamente a citocentrifugação. Posteriormente o material foi fixado a seco e corado pela coloração especial de May-Grünwald-Giemsa (He et al., 2002; Makowski, Ramsey, 1998; Franco et al., 2008).

Foram identificadas à presença e o número de células polimorfonucleares e mononucleares do líquido sinovial, através de contagem manual via microscopia óptica. As análises das lâminas foram feitas por dois avaliadores. O microscópio utilizado foi o Microscópio de Luz, Axiolab (Zeiss) num aumento de 40X.

O cálculo do número de campos/lâminas para cada sujeito da amostra foi feito a partir do método estatístico distribuição de Bernoulli, no qual foi considerado o número total de campos da lâmina para cada sujeito e o número de células inflamatórias presentes no líquido sinovial normal e inflamado (Nagase, 1997; Franco et al., 2008). Este resultado apresenta uma margem de erro de aproximadamente 3 pontos percentuais para cima ou para baixo, com uma confiança de 95%.

5.2.7. Análises Estatísticas

O programa utilizado para as análises foi *Statistica for Windows* (version 7). Aplicaram-se testes de normalidade (Shapiro Wilk's W test) e homogeneidade (Levene) para as variáveis do estudo, sendo indicado o teste não paramétrico para análise dos dados. Portanto, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e posteriormente o Post hoc de Newman-Keuls. Também foi utilizada a correlação de Spearman para se obter a relação entre as variáveis do estudo: MMPs, células inflamatórias, citocinas, idade, tempo de lesão e nível de comprometimento da cartilagem.

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

5.3. Resultados

A tabela 1 mostra as características dos grupos do estudo, quanto ao tempo de lesão relatada pelos sujeitos e número de células MNC e PMN.

Tabela 1. Características dos grupos com relação às variáveis: tempo de lesão relatada e células MNC e PMN. Variáveis descritas em média e desvio padrão.

	Tempo de lesão (dias)	Celulas PMN (n°/ml)	Células MNC (n°/ml)
Grupo I (n=12)		0	1312.50 ± 1013.57
Grupo II (n=16)	129.86 ± 95.91	128.33 ± 115.41	2021.55 ± 1614.87
Grupo III (n=16)	79.83 ± 76.41	148.43 ± 177.84	4815.06 ± 9566.45
Grupo IV(n=15)	210.45 ± 169.31	156.25 ± 158.57	4579.86 ± 3676.56
Valor de p	0.15	0.09	0.21

Não houve diferença significativa entre os grupos para o tempo de lesão. Quanto às células MNC também não foram encontradas diferenças entre os grupos, inclusive o controle. No caso das PMN, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos lesados (II, III, IV), porém o grupo controle (grupo I) não apresentou células PMN.

Todas as bandas encontradas nos géis foram inibidas quando incubadas com EDTA, indicando realmente se tratar de MMPs, as quais foram identificadas pelo seu peso molecular. As bandas ativas, enfatizadas conforme proposta de Marquetti e colaboradores (2008a), foram 72-62 kDa, 92-84 kDa e 130-110 kDa, que correspondem respectivamente a MMP-2, MMP-9 (monomérica) e MMP-9 (heterodimérica).

Os níveis de MMP-2 e MMP-9 nos diferentes grupos são apresentadas nas figuras 2, 3 e 4. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a MMP-2 (Figura 2). Para a MMP-9 de banda 84 kDa, houve diferença significativa entre os grupos lesados e o controle ($p < 0.05$). Contudo, para a MMP-9 de banda 110 kDa, mesmo com o grupo controle não apresentando forma ativa desta MMP, não houve diferença significativa entre ele e os demais grupos (II, III e IV), porém, quando comparamos os níveis dos grupos com lesão para a banda 110 kDa com os níveis mostrados para a banda 84 kDa, verificamos que o valor em unidades arbitrárias foi menor para a banda 110 kDa (Figura 3 e 4).

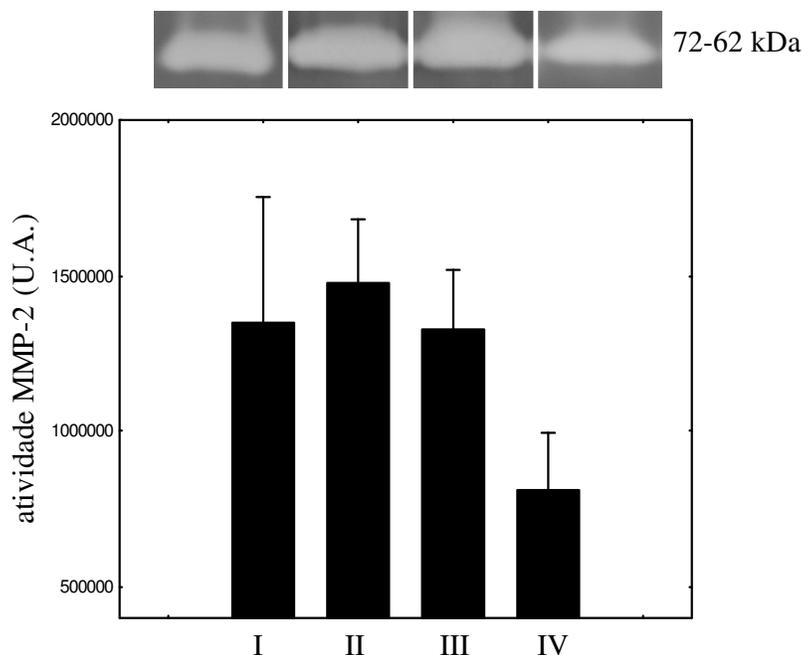


Figura 2. Análise da MMP-2 nos grupos. Os géis foram analisados por densitometria e a atividade da banda 62 kDa foi expressa em unidades arbitrárias (U.A.). Os valores foram apresentados por média \pm erro padrão da média, $p < 0.05$. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

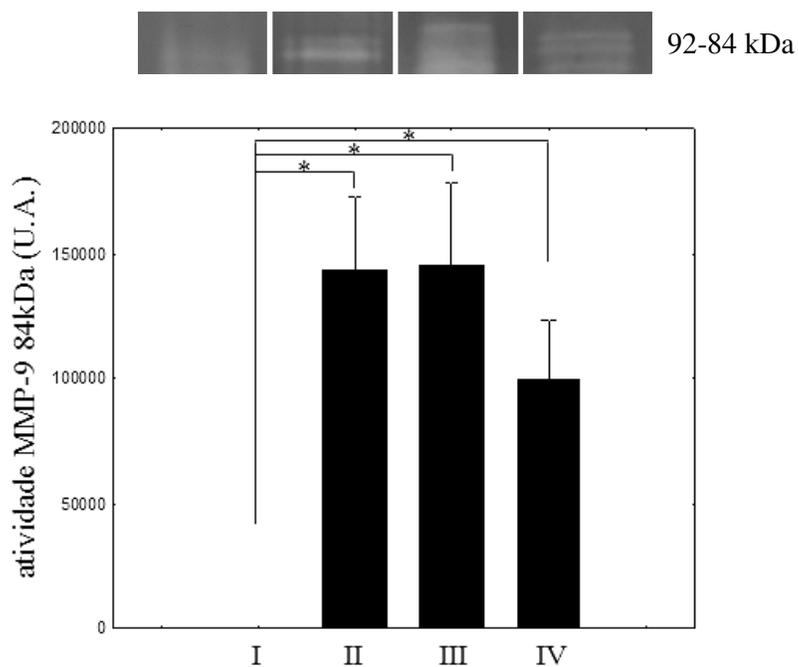


Figura 3. Análise da MMP-9 84kDa nos grupos. Os géis foram analisados por densitometria e a atividade da banda foi expressa em unidades arbitrárias (U.A.). Os valores foram

apresentados por média \pm erro padrão da média, $p < 0.05$. * Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo I, que apresentou atividade 0, com os demais grupos (II, III e IV).

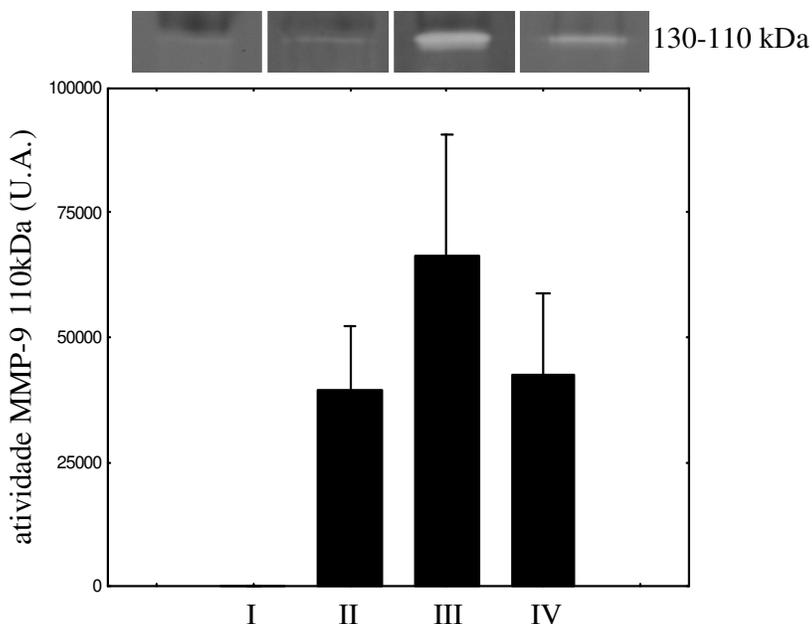


Figura4. Análise da MMP-9 110kDa nos grupos. Os géis foram analisados por densitometria e a atividade da banda foi expressa em unidades arbitrárias (U.A.). Os valores foram apresentados por média \pm erro padrão da média, $p < 0.05$. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Ambas as citocinas, a pró-inflamatória IL12 e a anti-inflamatória IL-10 foram detectáveis na amostra do estudo, porém a IL-10 só foi detectável no grupo II (em 7.5% das amostras do grupo) e no grupo III (em 22% das amostras do grupo) e não foram consideradas significativas as diferenças entre grupos para a IL-10. Já a IL-12 foi detectável em 100% das amostras do grupo II, III e IV, e no grupo I a detecção ocorreu 25 % das amostras, as quais também apresentaram os menores valores, conforme mostra a figura 5. Houve diferença significativa entre os grupos para a IL-12.

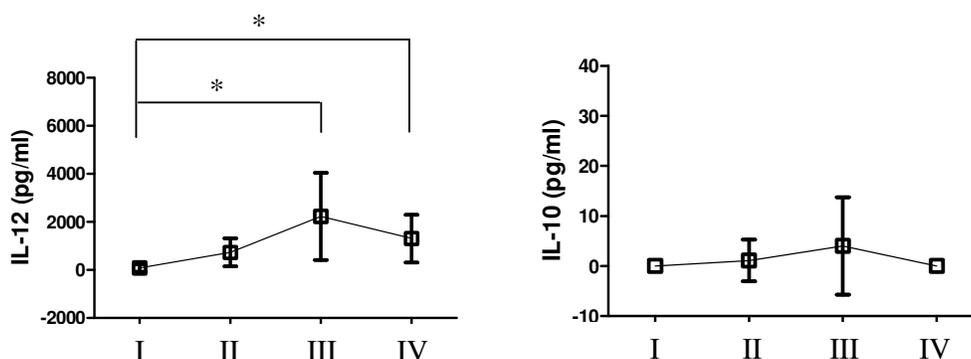


Figura 5. Níveis de IL-12 e IL-10 nos grupos do estudo. Os valores foram apresentados por média \pm desvio padrão. * Diferença significativa entre o grupo I e os grupos III e IV ($p < 0.01$).

O valor de correlação e de significância estatística entre as variáveis do trabalho são mostrados na tabela 2

Tabela 2. Correlação entre as variáveis. Valor de R.

	MMP-2 (U.A.)	MMP-9 84 kDa (U.A.)	Temp Lesão (dias)	MNC (n°/ml)	PMN (n°/ml)	Dan Cart	IL-10 (pg/ml)	IL-12 (pg/ml)
MMP-2	1	0.55**	-0.34*	-	-	-0.29*	-0.35*	-0.43**
MMP-9 (84 kDa)		1	-	-	0.47**	-	-	0.33*
Temp Les			1	-	-	0.44**	-	-
MNC				1	0.78**	-	-	0.47**
PMN					1	-	-	0.53**
Dan Cart						1	-	0.40**
IL-10							1	-
IL-12								1

* para $p < 0.05$. ** para $p < 0.01$. Temp les – tempo de lesão até a coleta do líquido sinovial.

Dan Cart – gravidade dos danos na cartilagem

Para o teste de correlação, a MMP-2, ambas MMP-9, as citocinas IL-10 e IL-12 e as células PMN e MNC não apresentaram correlação com a idade. A MMP-2 apresentou correlação negativa fraca com o tempo de lesão ($R = -0.34$, $p < 0.05$) assim como com os danos na cartilagem ($R = -0.29$, $p < 0.05$). A MMP-9 (84 kDa) teve uma correlação positiva moderada com as PMN ($R = 0.47$, $p < 0.01$) e com a MMP-2 ($R = 0.55$, $p < 0.01$). As células PMN e MNC apresentaram uma correlação positiva forte entre si ($R = 0.78$, $p < 0.01$). O tempo de lesão teve uma relação positiva moderada com o nível de acometimento condral ($R = 0.44$, $p < 0.01$). A

MMP-9 (110 kDa) não apresentou correlações significativas com as variáveis do estudo. As células PMN e MNC apontaram uma correlação positiva com a citocina pró-inflamatória IL-12 ($R=0.53$, $p<0.01$ e $R= 0.47$, $p<0.01$ respectivamente). A interação da MMP-2 foi negativa com a IL-10 ($R= -0.35$, $p<0.05$), enquanto a da MMP-9 (84 kDa) foi positiva com a IL-12 ($R= 0.33$, $p<0.05$). A citocina IL-12 teve uma correlação positiva com os danos na cartilagem ($R= 0.40$, $p < 0.01$).

5.4. Discussão

Os resultados mostraram um processo inflamatório articular persistente no líquido sinovial devido ao influxo de neutrófilos e pela presença da IL-12 pró-inflamatória nos grupos lesados da amostra estudada.

O número elevado de células inflamatórias e a expressão de IL-10 e IL-12 sem nenhuma correlação com o tempo de lesão apontam para uma manutenção da inflamação após o período agudo do trauma, corroborando com resultados anteriores (Franco et al., 2008). Frisbie e colaboradores (2008) também apontaram para a manutenção de uma sinovite e de um ambiente inflamado nos casos de OA induzida em cavalos. Apesar do grupo controle apresentar o menor número de MNC/ml, não houve diferença estatística com os outros grupos. Estes valores estão acima dos valores de leucócitos encontrados em estudos anteriores, em que foi considerado inflamado os líquidos sinoviais com cerca de 200 a 2000 células inflamatórias/mm³, e normal, os líquidos com menos de 50 células inflamatórias/mm³, sendo o predomínio de células MNC e apenas 10% do total de PMN (Platt et al., 1993; Shmerling et al., 1994; Mattiello-Sverzut et al., 2003), apontando que há presença de maior processo inflamatório na população deste estudo.

Os danos condrais apresentaram uma correlação positiva com o tempo da lesão, o que denota que na população estudada, quanto maior o tempo da lesão, maior o grau de lesão da cartilagem, o que pode ser explicado pela alteração da biomecânica articular, favorecendo os microtraumas, estimulando mediadores inflamatórios e o ciclo de lesão ao longo do tempo (Dalhberg et al., 1994; Fiorito et al., 2005).

As MMPs são endopeptidases dependentes de cálcio (Ca⁺⁺) ou zinco (Zn⁺⁺), que são importantes na degradação e remodelamento da MEC (Marquetti et al., 2008b). Nossos dados mostraram que a atividade da MMP-2 está presente em todos os grupos do estudo, sem diferença significativa entre eles, porém a atividade foi maior no grupo controle e em estágios iniciais da lesão condral, diminuindo no estágio avançado. A expressão da MMP-2 também mostrou uma correlação negativa com os danos na cartilagem e com a IL-12 pró-inflamatória, o que aponta que a gelatinase A, quando ativa, pode não estar envolvida nos processos de degeneração da cartilagem, e por outro lado, estar envolvida no *turnover* normal do tecido, confirmando estudos anteriores (Arican et al., 2000; Gepstein et al., 2002).

A ausência da atividade das MMPs-9 no grupo controle, e a correlação da banda 84 kDa com os neutrófilos e com a IL-12, nos sugere que a expressão da gelatinase B esteja envolvida nos processos de degeneração da cartilagem. Assim, o número elevado de células

PMN, a ação da citocina pró-inflamatória e conseqüentemente a atividade da MMP-9 agravariam a perda de proteoglicanos da MEC.

Há diferentes formas de regulação da atividade das proteases, como: a) autoativação (Nagase, 1997); b) modulação por moléculas de GAG, como ácido hialurônico, ativando MMP-9 e estimulando MMP-2 e sulfato de queratana, inibindo as mesmas gelatinases (Isnard, Robert, Renard, 2003); c) regulação pelas interleucinas (Gepstein et al., 2002; He et al., 2002; Maiotti et al., 2000); d) relação entre a as proteases e o ambiente inflamado (Marini et al., 2003), em especial entre as MMP-9 e os neutrófilos e macrófagos, pois esta protease pode ser produzida por ambas as células e, ainda, por osteoclastos e linfócitos (Makowski, Ramsby, 2003; Okada, 2000; Yoshihara et al., 2000).

O comportamento das MMPs neste estudo está de acordo com estudos prévios que demonstraram que o RNA mensageiro da MMP-9 e a expressão da sua proteína foram encontrados somente em sujeitos com OA, enquanto que o RNA mensageiro da MMP-2 é detectado em ambas as populações, saudáveis e com OA. A gelatinase B tem se mostrado predominante nas doenças da cartilagem (Gupta et al., 2007; Milner et al., 2006).

No trabalho experimental de Kim et al (2000) foi identificado uma supressão da inflamação pela ação da IL-10, porém na população estudada esta citocina foi pouco detectada, ou seja, sua atividade foi vista em apenas alguns dos sujeitos da amostra, sugerindo que, caso haja uma atenuação da inflamação pela IL-10, ela não ocorre em todos os indivíduos. O fator determinante da expressão da IL-10 pode ser objeto de novos estudos.

A IL-12 foi apontada como responsável pela transformação de um processo agudo para um processo crônico, pela inibição da síntese de condrocitos e por estimular a produção de interferon- α (IFN- α) e óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (Joosten et al., 2002). A correlação positiva moderada entre a IL12 e as células MNC e PMN, aponta para uma possível interação entre esta citocina e as células inflamatórias. A relação diretamente proporcional entre a IL-12 e os danos na cartilagem também sugere que sua presença é determinante para o avanço da lesão condral.

Assim, verificou-se que existe um processo inflamatório nos líquidos sinoviais de indivíduos com lesão pós-traumática e que persiste ao longo do tempo. Apesar da literatura apontar a IL-6 como uma das principais citocinas pró-inflamatórias da patogênese da OA (Stannus et al., 2010; Valdes et al., 2010), a IL-12 também demonstrou estar associada com a degradação da cartilagem, com o influxo de células inflamatórias e com a gelatinase B. Talvez sua expressão seja mais pronunciada no líquido sinovial de sujeitos que ainda não desenvolveram OA, porém possuem lesão condral.

Yang e colaboradores (2008) analisaram a influência dos AINES sobre as gelatinases e verificaram que estes antiinflamatórios inibiram os níveis de MMP-2 e MMP-9, porém não se sabe o efeito dos AINES na síntese de proteoglicanas. Sendo que a MMP-2 parece estar relacionada somente ao *turnover* fisiológico da cartilagem, seria interessante a inibição específica da MMP-9. Como a IL-12 tem relações diferentes e inversas com os dois tipos de gelatinases, novos estudos poderiam verificar as reações bioquímicas envolvidas nesta relação e procurar identificar drogas que ajam de maneira seletiva na MMP-9.

Portanto, baseado em nossos resultados verificamos que a IL-12 e a MMP-9 estão relacionadas à degradação da cartilagem em sujeitos com lesão crônica do LCA, e que, caso ocorram tentativas de compensação e reparo pela IL-10 e pela MMP-2 elas são insuficientes para conter a degradação da cartilagem, indicando que o catabolismo ainda supera o anabolismo nestes indivíduos. Os resultados apresentados sugerem que uma supressão eficiente da expressão da IL-12 e da MMP-9 poderia levar ao controle ou à diminuição da inflamação articular nestes indivíduos.

5.5. Conclusão

A inflamação do líquido sinovial é de grande relevância para os processos metabólicos e bioquímicos que ocorrem na articulação. Os neutrófilos (PMN), as gelatinases B (MMP-9) e a citocina IL-12 parecem estar relacionados entre si e terem participações importantes no ciclo de destruição da cartilagem. Ao contrário, a MMP-2 parece estar relacionada ao *turnover* fisiológico e a IL-10, pouco expressa na população estudada, ainda não tem uma ação clara na lesão crônica do LCA. Enfim, o rompimento ligamentar requer cuidados primários no controle da inflamação e da ação proteolítica, pois, independente do tempo de lesão e da realização de reconstrução cirúrgica, os microtraumas devem ser evitados.

Referências

- Adamopoulos IE, Danks L, Itonaga I, Locklin RM, Sabokbar A, FergusonDJP, Athanasou NA. Stimulation of osteoclast formation by inflammatory synovial fluid. *Virchows Arch* 2006; 449: 69-77.
- Arican M, Coughlan AR, Clegg PD, Carter SD. Matrix metalloproteinases 2 and 9 activity in bovine synovial fluids. *J Vet Med A* 2000; 47:449-456.
- Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, Van den Berg W, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64: 1263-1267.
- Bondeson J, Wainwright SD, Laudr S, Amos N, Hughes C. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8(6):R187.
- Cleutjens JPM, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in rat myocardium after infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1995; 27:1281-1292.
- Cohen NP, Foster RJ, Mow VC. Composition and Dynamics of Articular Cartilage: Structure, Function and Maintaining Healthy State. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998 Oct;28(4):203-15.
- Dalberg L, Roos H, Saxne T, Heinegard D, Lark MW, Hoerrner, LA, Lohmander LS. Cartilage metabolism in the injured and uninjured knee of the same patient. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 823-827.
- Ficat RP, Philippe J, Hungerford DS. Chondromalacia patellae: a system of classification. *Clin Orthop* 1979; 144:55-62
- Fiorito S, Magrini L, Adrey J, Mailhe D, Brouty-Boyé D. Inflammatory status and cartilage regenerative potential of synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and chondropathy. *Rheumatol* 2005; 44:164-171.
- Franco RN, Cintra Neto PFA, Pimentel ER, Cohen M, Lima, GEG, Mattiello-Rosa SMG. Correlation between inflammatory cells and sulfated glycosaminoglycan concentration in synovial fluid of subjects with secondary knee osteoarthritis. *J Rheumatol* 2008; 35:1096-101.
- Frisbie DD, Al-Sobayll F, Billingham RC, Kawak CE, McIlwraith CW. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercises and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16(10):1196-204.
- Gepstein A, Shapiro S, Arbel G, Lahat N, Livne E. Expression of matrix metalloproteinases in articular cartilage of temporomandibular and knee joints of mice during growth, maturation, and aging. *Arthritis Rheum* 2002; 46(12):3240-3250.
- Gupta K, Shukla M, Cowland JB, Malemud CJ, Haqqi TM. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Expressed in Osteoarthritis and Forms a Complex With Matrix Metalloproteinase 9. *Arthritis Rheum* October 2007; 56(10):3326-3335.

He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA. Synthesis of interleukin 1h, tumor necrosis factor-a and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with anti-inflammatory cytokines. *J Rheumatol* 2002; 29: 546-53.

Isnard N, Robert L, Renard G. Effect of sulfated GAGs on the expression and activation of MMP-2 and MMP-9 in corneal and dermal explant cultures. *Cell Biol Int* 2003; 27: 779-784

Joosten LAB, Heuvelmans-Jacobs M, Lubberts E, Van de Loo FAJ, Bakker AC, Helsen MMA, Richards CD, Van der Berg WB. Local interleukin-12 gene transfer promotes conversion of an acute arthritis to a chronic destructive arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46(5):1379-89.

Kim WU, Min SY, Cho ML, Youn J, Min JK, Lee SH. The role of IL-12 in inflammatory activity os patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 200; 119:175-81.

Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schu'nke M. Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Ann Anat* 2005; 187:473-485.

Maiotti M, Campi A. Lê lesioni condrali Del ginocchio: classificazione artroscopica. *G Ital Ortop Traumatol* 1990; 17: 35-40.

Maiotti M, Monteleone G, Tarantino U, Fasciglione G, Marini S Coletta M. Correlation between osteoarthritic cartilage damage and levels of proteinases and proteinase inhibitors in synovial fluid from the knee joint. *Arthroscopy: J Arthrosc Rel Surg* 2000; 16, 5: 522-526.

Makowski GS, Ramsey M. binding of matrix metalloproteinase 9 to fibrin is mediated by amorphous calcium-phosphate. *Inflammation* 1998; 22 (6):599-617.

Makowski GS, Ramsey M. Calibrating Gelatin Zymograms with Human Gelatinase Standards. *Anal Biochem* 1996; 236: 353-356.

Makowski GS Ramsby ML. Zymographic analysis of latent and activated forms of matrix metalloproteinase-2 and-9 in synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 77-81.

Mankin HJ. The respons of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg* 1982; 64A, 460-66.

Marini S, Fasciglione GF, Monteleone G, Maiotti M, Tarantino U, Coletta M. A Correlation between knee cartilage degradation observed by arthroscopy and synovial proteinases activities. *Clin Biochem* 2003; 36:295-304.

Marquetti, RC, Prestes J, Stotzer, US, Paschoal M, Leite RD, Perez SE, Selistre-de-Araujo HS. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 2008a; 29:559-63.

Marquetti RC, Prestes J, Paschoal M, Ramos OH, Perez SE, Carvalho HF. Matriz metallopeptidase 2 activity in tendon regions: effects os mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. *Eur J Appl Physiol* 2008b; 104:1087-93.

Mattiello-Sverzut AC, Mattiello-Rosa SM, Terrugi A Jr, Jorge FAJ, Rodrigues ARA, Salvini TF. Inflammatory cell content of synovial fluid and morphological evaluation of the vastus lateralis oblique muscle in patients with anterior cruciate ligament disruption. *Braz. J. morphol. Sci.* 2003; 20(1): 19-24.

Mazières B, Garnero P, Guéguen A, Abbal M, Berdah L, Lequesne M, Nguyen M, Salles J-P, Vignon, E, Dougados M. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH Cohort. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:354-359.

Milner JM, Rowan AD, Cawston TE, Young DA. Metalloproteinase and inhibitor expression profiling of resorbing cartilage reveals pro-collagenase activation as a critical step for collagenolysis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R142.

Myers SL, Brandt KD, Albrecht ME. Synovial fluid glycosaminoglycan concentration does not correlate with severity of condropathy or predict progression of osteoarthritis in a canine cruciate deficiency model. *J Rheumatol* 2000; 27: 753-763.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-60.

Ning L, Ishijima M, Kaneko H, Kurihara H, Arikawa-Hirasawa E, Kubota M, Liu L, Xu Z, Futami I, Yusup A, Miyahara K, Xu S, Kaneko K, Kurosawa H. Correlations between both the expression levels of inflammatory mediators and growth factor in medial perimeniscal synovial tissue and the severity of medial knee osteoarthritis. *Int Orthop* 2010 DOI 10.1007/s00264-010-1045-1

Okada Y. Matrix-degrading metalloproteinases and their roles in joint destruction. *Mod Rheumatol* 2000; 10:121-128

Pelletier JP, Raynauld JP, Caron J, Mineau F, Abram F, Dorais M, Haraoui B, Choquette D, Martel-Pelletier J. Decrease in serum level of matrix metalloproteinases is predictive of the disease-modifying effect of osteoarthritis drugs assessed by quantitative MRI in patients with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2010 dec; 69(12): 2095-101.

Platt, P.N. Examination of synovial fluid. *Clin Rheum Dis* 1993; 9: 51-67.

Shmerling, R.H. Synovial fluid analysis. *Rheum Dis Clin North Am* 1994; 20: 503-512.

Stannus O, Jones G, Cicuttini F, Parameswaran V, Quinn S, Burgess J, Ding C. Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18:1441-1447.

Tiderius CJ, Olsson LE, Nyquist F, Dahlberg L. Cartilage glycosaminoglycan loss in the acute phase after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum* 2005; 52:120-127.

Valdes AM, Arden NK, Tamm A, Kisand K, Doherty S, Pola E, Cooper C, Tamm A, Muir KR, Kerna I, Hart D, O'Neil F, Zhang W, Spector TD, Maciewicz RA, Doherty M. A meta-analysis of interleukin-6 promoter polymorphisms on risk of hip and knee osteoarthritis 2010 May ;18(5): 699-704

Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stüssi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; 10: 408-419.

Verdier S, Seite K, Guntzer J, Pujol, Boume die ne K. Immunohistochemical analysis of transformin growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritis femoral heads. *Rheumatol Int* 2005; 25:118-124.

Yang SF, Hsieh YS, Lue KH, Chu SC, Chang IC, Lu KH. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the expression of urokinase plasminogen activator and inhibitor and gelatinases in the early osteoarthritis knee of humans. *Clin Biochem* 2008; 41: 109-116.

Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 455-451

6. MANUSCRITO 3

Franco RN, Ribeiro DBLF, Battistella M, Medeiros AI, Pimentel ER, Cohen M, Mattiello SM.

A relação da dor e da função do joelho com a atividade proteolítica e inflamatória presentes na degradação da cartilagem após lesão do ligamento cruzado anterior.

**A RELAÇÃO DA DOR E DA FUNÇÃO DO JOELHO COM A ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA E INFLAMATÓRIA PRESENTES NA DEGRADAÇÃO DA
CARTILAGEM APÓS LESÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR.**

R.N. Franco[†], D.B.L.F. Ribeiro^{‡‡}, M. Battistella^I, A.I. Medeiros[‡], E.R. Pimentel^{††}, M. Cohen^{II}, e S.M. Mattiello[†].

[†] Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

[‡] Departamento de Imunologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.

^{††} Departamento de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

^{‡‡} Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.

^I Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia, Limeira, SP, Brasil

^{II} Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil.

Resumo

Objetivo: verificar a relação da dor e da função com a atividade proteolítica e inflamatória na degradação da cartilagem decorrente da lesão crônica do ligamento cruzado anterior.

Material e Método: O estudo incluiu 141 sujeitos (119 do sexo masculino e 22 do sexo feminino) com média de idade de 31.98 ± 9.98 anos. Trinta sujeitos eram saudáveis e 111 apresentaram lesão do ligamento cruzado anterior, associado ou não à lesão meniscal e à lesão condral, com graus variando entre 0 e 4, de acordo com o ICRS. Os sujeitos foram avaliados subjetivamente quanto à dor (EVA) e a função do joelho (IKDC). Foi coletado líquido sinovial e sangue. A concentração de GAGs foi analisada pelo corante azul de dimetilmetileno. A presença de células inflamatórias mononucleares (MNC) e polimorfonucleares (PMN) foi avaliada por microscopia óptica após coloração com May-Grünwald-Giemsa. A atividade das metaloproteases e das citocinas foi verificada pelas técnicas da zimografia e ELISA respectivamente. Foi aplicado o teste não paramétrico de correlação de Spearman entre as variáveis. **Resultados:** a dor e a perda da função parecem estar relacionadas às mesmas citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-8. O número de estruturas lesionadas e a presença de GAGs acelera os prejuízos na cartilagem articular, aumentando a dor e prejudicando a função. A MMP-9 está relacionada positivamente aos sintomas dolorosos e a função é inversamente proporcional à presença de células inflamatórias. **Conclusão:** A dor e a função estão relacionadas a atividades proteolíticas e inflamatórias do ambiente articular, principalmente à atividade da IL-6, IL-8 e a MMP-9 (84 kDa). Dependendo da expressividade destes biomarcadores e da interação entre eles há piora da dor e da função e aumentam os riscos de desenvolver OA.

Palavras chave: lesão condral; metaloproteases; citocinas, inflamação, dor, função.

6.1. Introdução

O joelho é a articulação do membro inferior mais frequentemente acometida pela osteoartrite (OA) pós-traumática. O paciente com OA de joelho relata dor e dificuldade para realizar atividades funcionais (Bennell et al., 2003). A lesão do LCA compromete a estabilidade, levando a microtraumas repetitivos. A articulação fica inflamada e a propriocepção articular comprometida (Castro et al., 2003; Strobel; Stedtfeld, 2000). Isto tem importantes implicações clínicas visto que a reconstrução do LCA restitui a função mecânica do joelho, enquanto que a função proprioceptiva é perdida (Strobel; Stedtfeld, 2000), embora alguns trabalhos mostraram que os receptores do neoligamento podem se regenerar (Fatarelli; Almeida ; Nascimento, 2004).

A lesão do LCA frequentemente está relacionada a alterações e adaptações na ativação e padrão de recrutamento muscular, modificando o desenvolvimento de torque do músculo quadríceps. Os mecanismos que geram essa atividade muscular alterada ainda não foram totalmente esclarecidos. Acredita-se que a falta de informações proprioceptivas provocam inibição reflexa do quadríceps e ativação facilitada dos isquiotibiais como uma resposta adaptativa (Fatarelli; Almeida; Nascimento, 2004; Traete; Pinto; Mattiello-Rosa, 2007).

A instabilidade gerada pela perda do ligamento altera os movimentos entre as superfícies articulares, causando traumas na cartilagem em diferentes áreas da superfície articular. Esses micromovimentos são reconhecidos pelos condrócitos, que alteram seu estado metabólico para responder às tensões mecânicas (Suh et al., 1999; Mobasheri et al., 2002). Se as agressões persistem a cartilagem pode entrar num processo degenerativo, com o aumento do catabolismo e da inflamação articular. Os mediadores inflamatórios são ativados e dá-se início a ação das proteases na quebra da matriz.

As principais citocinas inflamatórias ligadas à degradação da cartilagem são a interleucina (IL) 1 beta (β), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a IL-6 e a IL-8. A ação do fator de transformação do crescimento (TGF) β e da IL-10 na lesão condral não está bem clara na literatura (Stannus et al., 2010; Botha-Scheepers et al., 2010; Goekoop et al., 2010; Valdes et al., 2010; Anitua et al., 2009; Verdier et al., 2005). Entre os fatores catabólicos também se encontram as metalopeptidases (MMPs), principalmente a MMP-9 (Gupta et al., 2007; Milner et al., 2006). A ação proteolítica e inflamatória resulta em maior liberação de fragmentos da cartilagem (glicosaminoglicanos) no líquido sinovial. Estes fragmentos presentes no líquido podem ser potencialmente agravantes do quadro de OA (Franco et al., 2008).

Sabe-se que as ações inflamatórias e proteolíticas são determinantes no avanço da lesão condral, e que a função articular do joelho se altera em contrapartida aos eventos bioquímicos e moleculares que envolvem a cartilagem, a sinóvia e o líquido sinovial. Porém, poucos estudos relacionam as alterações funcionais e os sintomas de dor à presença dos biomarcadores articulares. Os tratamentos atuais são paliativos e visam impedir a progressão da doença e proporcionar alívio dos sintomas. As investigações dos marcadores inflamatórios relacionados à perda da função e à dor podem proporcionar novos estudos e estratégias de tratamento, principalmente farmacológico. Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a relação da dor e da função com a atividade proteolítica e inflamatória na degradação da cartilagem, em indivíduos com lesão crônica do LCA.

6.2. Materiais e método

6.2.1. Sujeitos

O estudo incluiu 141 sujeitos de ambos os sexos, sendo 119 do sexo masculino e 22 do sexo feminino com média de idade de 31.98 ± 9.98 anos. Entre os sujeitos analisados 30 eram saudáveis e 111 apresentaram lesão do ligamento cruzado anterior, associado ou não à lesão meniscal e à lesão condral, com graus variando de 0 a 4, de acordo com o ICRS (*Internacional Cartilage Repair Society, 2000*). As características dos sujeitos são mostradas na tabela 1.

Os sujeitos tiveram indicação cirúrgica via artroscópica para reconstrução ligamentar e para reparo meniscal, quando necessário. Nenhum voluntário relatou ter feito uso de anti-inflamatórios (AINEs) nas 3 semanas anteriores da punção de líquido sinovial.

Para inclusão no estudo, os sujeitos não poderiam ter alterações sistêmicas cardio-respiratórias e/ou reumáticas, presença de amostra de líquido sinovial sanguinolenta, não poderiam ter realizado infiltrações articulares ou ter limitações na amplitude de movimento de 0 a 90 graus.

Os sujeitos foram esclarecidos quanto às razões do estudo, seus objetivos e procedimentos e assinaram um termo de consentimento como requerido pela Resolução 196/96 do *National Health Committee*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos, registrado no Conselho Nacional de Saúde – Protocolo nº 297/2008.

Tabela 1. Características dos grupos com relação ao índice de massa corpórea (IMC), idade e tempo de lesão relatada. Média \pm desvio padrão.

IMC (Kg/m ²)	idade (anos)	Tempo de lesão relatada (anos)
25.95 \pm 4.19	31.98 \pm 9.98	3.06 \pm 4.70

6.2.2. Escala de dor

A intensidade da dor no joelho acometido foi medida por meio de uma escala visual analógica (EVA) com valores entre 0 e 10, sendo 0 “ausência total de dor” e 10 “dor máxima”. A dor referiu-se à sensação dolorosa da última semana e a escala foi aplicada previamente a coleta do líquido sinovial.

6.2.3. Avaliação subjetiva da função do joelho

Para quantificar as condições clínicas e funcionais destes indivíduos foi utilizado o formulário de avaliação subjetiva do Comitê Internacional de Documentação do Joelho (IKDC) (Irgang et al., 2001), sendo o escore obtido para cada indivíduo normatizado, considerando 100% o valor mais próximo do esperado para indivíduos saudáveis.

6.2.4. Número de afecções

Para cada sujeito foi anotado o número de afecções em estruturas articulares do joelho, confirmadas pela artroscopia. Da seguinte forma:

- 1- para lesão isolada do LCA;
- 2- para lesões do LCA+ menisco ou LCA+ condral;
- 3- para lesões do LCA+menisco+condral.

6.2.5. Coleta do Líquido Sinovial

A punção do líquido sinovial do joelho lesado foi realizada sob anestesia, previamente às cirurgias. A agulha foi inserida na região suprapatelar lateral do joelho para coleta do líquido da bolsa subquadrilateral. A coleta do grupo controle foi feita de maneira semelhante, porém não houve intervenção cirúrgica posterior, sendo realizada a limpeza e assepsia da face antero-lateral, seguida de anestesia local com 0.5 ml de xilocaína a 1%, sem vasoconstritor. Todos os fluídos foram quantificados em relação ao seu volume puro e armazenados em ependorfes a -80°C em freezer (Forma Scientific) para posterior processamento e análise.

6.2.6. Avaliação Macroscópica da Cartilagem Articular

Para determinar os níveis de lesão tecidual da cartilagem articular, durante o procedimento cirúrgico artroscópico, foi utilizada uma ficha de avaliação baseada na classificação histológica pertencente ao ICRS (*Internacional Cartilage Repair Society, 2000*), descrita abaixo:

Grau 0: cartilagem normal

Grau 1: fibrilação, irregularidades e fissuras de superfície

Grau 2: irregularidades e fissuras de superfície com profundidade < que 50% da cartilagem

Grau 3: irregularidades e fissuras de superfície com profundidade > que 50% da cartilagem

Grau 4: fissuras profundas até o osso subcondral

A pontuação do grau de destruição tecidual foi definida utilizando o parâmetro “Score máximo”, representado pelo maior grau de lesão da cartilagem (escala de 0 a 4) encontrado em qualquer uma das regiões dos côndilos femoral, tibial, patela e tróclea.

6.2.7. Dosagem de Glicosaminoglicanos Sulfatados

A concentração de GAGs no líquido sinovial, é uma avaliação do *turnover* da cartilagem (Elsaid et al., 2008). A dosagem foi feita por meio de análise de absorvância após coloração das amostras com azul de dimetilmetileno (DMMB), utilizando o método descrito por Farndale et al., (1982). O método espectrofotométrico associado ao reagente dimetilmetileno foi escolhido por ser considerado simples e principalmente específico para dosagem de GAGs sulfatadas presentes em tecidos e fluidos corporais.

As amostras de líquido sinovial foram centrifugadas a 14.000g durante 15 minutos em Centrifuga da marca Eppendorf modelo 5415D. Após este procedimento, 100 μ l do sobrenadante desta amostra foram digeridos em 100 μ l de tampão acetato 0.4M pH 5.8 contendo 10mM de EDTA, sendo adicionado imediatamente antes do uso 20mM de N-AcetilCisteína e Papaína na proporção de 300 μ g por 1ml de líquido sinovial. Após incubação durante 24 horas à temperatura de 60° C em banho maria, foi adicionado ácido iodoacético em uma concentração final de 10mM totalizando um volume de 22.2 μ l, que foram centrifugados durante 4 min a 12.000g. Ao sobrenadante foi adicionado 1 unidade de hialuronidase de estreptomices. Após a incubação por 12 horas à temperatura de 37°C, também em banho Maria, foram retirados 100 μ l. Uma vez que a amostra estava pronta para a dosagem, a solução de reagente DMMB (2,5ml) foi adicionada ao material e a absorvância foi lida em $\lambda=526$ nm em espectrofotômetro, após alguns segundos.

Para determinar as concentrações de GAGs foram usadas soluções de sulfato de condroitina com concentrações conhecidas.

6.2.8. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o kit BCATM Protein Assays (Pierce), segundo instruções do fabricante. Esse método é baseado no ácido bicinconínico (BCA) para detecção colorimétrica e quantificação de proteínas totais. Foi construída uma curva padrão baseada nas concentrações de 25 μ g/ml a 2000 μ g/ml de BSA (soroalbumina bovina). As absorvâncias da curva padrão e das amostras de interesse foram lidas a 562 nm e a concentração protéica foi estimada a partir delas.

6.2.9. Zimografia

As amostras de líquido sinovial dos sujeitos foram diluídas para uma concentração de 2 µg/ml. Iguais quantidades de proteínas totais (30 µg/poço) foram submetidas à eletroforese em triplicatas. A técnica de zimografia, conforme descrito por Cleutjens et al. (1995), consistiu de géis de poliacrilamida a 10% contendo gelatina (1mg/ml). Após aproximadamente 2 horas de eletroforese, os géis foram lavados 2 vezes durante 30 min em solução de 2.5% de Triton X-100 para remoção do SDS e em seguida incubado em tampão de substrato (Tris-HCL 50 mM pH 8.0, CaCl₂ 5 mM e NaN₃ 0.02%) a 37 °C por 24 horas. Após este tempo, os géis foram corados com Cromassie Blue por 30 minutos, e então, descorados com ácido acético:metanol:água (1:4:5) para visualização das bandas de atividade.

As amostras também foram incubadas com EDTA (15 mM), para verificar se as proteases eram metalopeptidases (MMPs), uma vez que o EDTA inibe sua atividade. Para documentação, os géis foram fotografados utilizando uma câmera (Cânon PowerShot G6) e as bandas de atividade foram analisadas quanto a sua densitometria no software Gene Tool versão 3.06 (Syngene).

6.2.10. Detecção de citocinas do líquido sinovial

O líquido sinovial foi centrifugado a 1700 g por 10 minutos, retirado o sobrenadante e também congelado a -80°C.

Após descongelamento, as citocinas foram quantificadas no líquido sinovial de acordo com instruções do fabricante empregando o método de ELISA “sandwich”. As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e o TGF- β (BD Biosciences) foram detectadas empregando anticorpos de captura, citocinas-padrão e anticorpos associados à biotina e amplificados com avidina-peroxidase. Como substrato foi utilizado TMB e a reação foi bloqueada adicionando ácido sulfúrico (1 M de H₂SO₄) aos poços. As absorbâncias das amostras foram avaliadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

6.2.11. Citologia

O líquido sinovial armazenado foi preparado para análise citológica, sendo processado em cito-centrífuga FANEM®, modelo CITOSPIN® - 248 por 5 minutos, sob uma rotação de 1.500g, sendo utilizado 100 µl em cada amostra do recipiente, previamente a cito-centrifugação. Posteriormente o material foi fixado a seco e corado pela coloração especial de May-Grünwald-Giemsa (He et al., 2002; Makowski, Ramsey, 1998; Franco et al., 2008).

Foram identificadas a presença e o número de células polimorfonucleares e mononucleares do líquido sinovial, através de contagem manual via microscopia óptica. As análises das lâminas foram feitas por dois avaliadores. O microscópio utilizado foi o Microscópio de Luz, Axiolab (Zeiss) num aumento de 40X.

O cálculo do número de campos/lâminas para cada sujeito da amostra foi feito a partir do método estatístico distribuição de Bernoulli, no qual foi considerado o número total de campos da lâmina para cada sujeito e o número de células inflamatórias presentes no líquido sinovial normal e inflamado (Nagase, 1997; Franco et al., 2008). Este resultado apresenta uma margem de erro de aproximadamente 3 pontos percentuais para cima ou para baixo, com uma confiança de 95%.

6.2.12. Análises Estatísticas

O programa utilizado para as análises foi *Statistica for Windows* (version 7). Aplicou-se testes de normalidade (Shapiro Wilk's W test) e homogeneidade (Levene) para as variáveis do estudo, sendo indicado testes não paramétricos para análise dos dados. Foi aplicado o teste não paramétrico de correlação de Spearman para se obter a relação entre as variáveis: IMC, idade, grau de lesão condral, número de afecções, tempo de lesão, dor, concentração de GAGs, atividade de metalopeptidases, presença de células inflamatórias, concentração de citocinas inflamatórias e função subjetiva pelos formulário IKDC.

Para todas as análises estatísticas foi utilizado o nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

6.3. Resultados

Dentre os sujeitos do estudo, 30 eram saudáveis, 35 tinham lesão isolada do LCA, 45 apresentavam duas afecções (23 LCA+menisco e 22 LCA+condral) e 31 possuíam três afecções (LCA+condral+menisco).

A quantidade média de líquido sinovial aspirado foi de 3.34 ml \pm 4.85 ml. Das punções realizadas, o líquido sinovial apresentou coloração amarelo cítrino e, em alguns casos, a presença de filetes de sangue, devido à contaminação da amostra pela agulha utilizada na perfuração da pele para coleta do material.

Quanto à presença de células inflamatórias por ml de líquido sinovial houve variações no número de células para cada mililitro, variando de 109.3 a 16906.2 (2185.4 \pm 4221.2) células MNC/ml e de 0 a 203.1 (66.6 \pm 74.3) PMN/ml.

As concentrações de GAGs apresentaram uma variação de concentração entre 0 μ g/ml e 781.8 μ g/ml (150.3 \pm 163.3)

Todas as bandas encontradas nos géis pela zimografia foram inibidas quando incubadas com EDTA, indicando realmente se tratar de MMPs, as quais foram identificadas pelo seu peso molecular. As bandas encontradas foram 72-62 kDa, 92-84 kDa e 130-110 kDa, que correspondem respectivamente a MMP-2, MMP-9 (monomérica) e MMP-9 (heterodimérica). Embora as amostras apresentassem outras bandas das gelatinases, foi enfatizada a banda ativa, conforme proposta de Marquetti e colaboradores (2008). A média e o desvio padrão da atividade das MMPs em unidades arbitrárias foram: a) MMP-2 1400280.6 \pm 809227.4 U.A.; b) MMP-9 (84kDa) 106693.4 \pm 136419.4 U.A.; c) MMP-9 (110 kDa) 46687.3 \pm 88397.4 U.A.

Foram detectadas na amostra as citocinas TGF- β , IL1- β , IL-6, IL-8 e IL-10. O TNF- α não foi detectável. A IL-10 foi detectada somente em 3% da amostra.

As condições clínicas e funcionais dos sujeitos apresentaram um valor médio de 63.90 \pm 26.81, segundo o formulário de avaliação subjetiva do Comitê Internacional de Documentação do Joelho (IKDC).

A média da intensidade da dor no joelho, relatada pelos sujeitos, foi de 2.97 \pm 3.17.

Para fins didáticos, as correlações significativas ($p < 0.05$) foram apresentadas em duas tabelas, a primeira correlacionando as características dos sujeitos com a dor e a função do joelho (tabela 2). A segunda apresentando a correlação entre as variáveis: dor, função, idade, IMC, grau de lesão, número de afecções e tempo de lesão com as variáveis inflamatórias, proteolíticas e de *turnover* da cartilagem (tabela 3).

Tabela 2. Valor de R das correlações entre dor e função com as características dos sujeitos.

	Dor (escala)	Função IKDC (score)	Idade (anos)	IMC (Kg/m ²)	Grau de lesão (ICRS)	Nº de afecções	Tempo de lesão (anos)
Dor	1		0,41**		0,36*	0,48*	
Função IKDC		1	-0,40**	-0,37*	-0,47**	-0,61**	
Idade			1	0,26*	0,46**	0,36*	
IMC				1	0,30*	0,28*	
Grau de lesão					1	0,77**	0,32*
Nº de afecções						1	
Tempo de lesão							1

* p<0.05 e ** p<0.01

IKDC – Comitê internacional de documentação do joelho

ICRS - *Internacional Cartilage Repair Society*

IMC – Índice de massa corpórea

Nas correlações entre a função e a dor com as características dos sujeitos do estudo os resultados apontaram que a dor e a função estão mais relacionadas com o número de afecções do que ao grau de lesão condral.

A idade também está relacionada positivamente à dor e à perda de função e ao aumento do IMC. Um maior IMC está relacionado a uma menor função da articulação do joelho.

O grau de lesão condral é mais afetado pela idade e pelo IMC do que pelo número de estruturas lesadas, porém este último é determinante na evolução da lesão na cartilagem, ou seja, quanto maior o número de afecções, maior a chance de ter lesão condral. O tempo de lesão também está relacionado ao grau de lesão condral, porém em menor intensidade do que o número de afecções.

Tabela 3. Valor de R das correlações entre as características dos sujeitos e as variáveis inflamatórias, proteolíticas e de *turnover*. Estão representados os valores significantes.

	Dor (escala)	Função IKDC (score)	Idade (anos)	IMC (Kg/m ²)	Grau de lesão (ICRS)	Nº de afecções	Tempo de lesão (anos)
MNC		-0.41*					
PMN		-0.58**				0.38*	
GAGs	0.59**	-0.61**				0.49*	-0.54**
MMP-2					-0.80**	-0.71**	-0.38*
MMP-9 84 kDa	0.38*				0.44*	0.71**	
MMP-9 110 kDa			0.43*		0.70**	0.73**	
TGF-β líquido							0.50**
IL-1β líquido			-0.25*				
IL-6 líquido	0.50**	-0.49*	0.33*	0.33*	0.37*	0.31*	
IL-8 líquido	0.36*	-0.42*			0.38*	0.47*	
IL-10 líquido							-0.26*

* p<0.05 e ** p<0.01

IKDC – Comitê internacional de documentação do joelho

ICRS - *Internacional Cartilage Repair Society*

IMC – Índice de massa corpórea

Quando buscamos correlacionar as características dos sujeitos com as variáveis inflamatórias, proteolíticas e de *turnover*, os resultados apontam que:

A) A dor está relacionada à concentração de GAGs livres (R= 0.59, p< 0.01), à atividade da MMP-9 (84 kDa) (R=0.38, p<0.05) e à presença das citocinas inflamatórias IL-6 (R=0.50, p<0.01) e IL-8 (R=0.36, p<0.05), de forma diretamente proporcional.

B) A função da articulação do joelho é alterada de forma negativa pela presença de células MNC (R= -0.41, p<0.05) e PMN (R= -0.58, p<0.01), pela concentração de GAGs livres (R= -0.61, p<0.01) e pela atividade da IL-8 (R= -0.42, p<0.05) e IL-6 (R= -0.49, p<0.05) no líquido sinovial.

C) Com o aumento da idade há uma tendência ao aumento da expressão da MMP-9 de banda 110 kDa (R= 0.43, p<0.05) e uma tendência menor ao aumento da IL-6 (R=

0.33, $p < 0.05$), enquanto que a IL-1 β mostrou uma tendência a queda da sua produção na população estudada ($R = -0.25$, $p < 0.05$).

D) O IMC mostrou uma relação positiva com a IL-6 ($R = 0.33$, $p < 0.05$).

E) O grau de lesão condral mostrou ser influenciado fortemente pela MMP-9 (110 kDa) ($R = 0.70$, $p < 0.01$) e moderadamente pela MMP-9 (84 kDa) ($R = 0.44$, $p < 0.05$). Também mostrou ter uma relação positiva pelas IL-6 ($R = 0.37$, $p < 0.05$) e IL-8 ($R = 0.38$, $p < 0.05$). O grau de lesão do tecido cartilaginoso só mostrou correlação negativa e forte com a MMP-2 ($R = -0.80$, $p < 0.01$).

F) O número de afecções apresentou correlação positiva com as células PMN ($R = 0.38$, $p < 0.05$), com a medida de *turnover* da cartilagem (GAGs) ($R = 0.49$, $p < 0.05$), com ambas as formas da MMP-9 ($R = 0.71$, $p < 0.01$ para a 84 kDa e $R = 0.73$, $p < 0.01$ para a 11- kDa), com as IL-6 ($R = 0.31$, $p < 0.05$) e com a IL-8 ($R = 0.47$, $p < 0.05$). Da mesma forma que o grau de lesão condral, apresentou correlação negativa com a MMP-2 ($R = -0.71$, $p < 0.01$).

G) O tempo de lesão apresentou uma correlação negativa com a concentração de GAGs ($R = -0.54$, $p < 0.01$), com a atividade da MMP-2 ($R = -0.38$, $p < 0.05$) e com a IL-10 ($R = -0.26$, $p < 0.05$), apresentando correlação positiva somente com o TGF- β ($R = 0.50$, $p < 0.01$).

6.4. Discussão

A OA é a forma mais comum de artrite das articulações sinoviais e resulta de eventos biológicos e mecânicos cumulativos que induzem a um desequilíbrio entre síntese e degradação dos tecidos articulares (Adamopoulos et al, 2006; Ishiguro, Kojima, Poole, 2002; Gupta et al, 2007), causando dor, alterações funcionais e levando a uma perda gradual da cartilagem articular de origem multifatorial (Hunter et al., 2006; Barker et al., 2004; Coimbra et al, 2002). Com base nos resultados pudemos analisar o comportamento de alguns fatores inflamatórios e proteolíticos associados à perda da função e aos sintomas dolorosos.

O aumento do IMC além de gerar maior sobrecarga articular, também está relacionado à atividade de IL-6, uma citocina pró-inflamatória apontada como agente de degradação da cartilagem (Valdes et al., 2010). Miller e colaboradores (2008) também verificaram que o ganho de peso está associado ao aumento da atividade da IL-6, porém da sanguínea.

As correlações associadas à dor apontam que ela pode estar relacionada a uma maior efusão articular, com aumento de fragmentos de proteoglicanos, aumento da atividade proteolítica e aumento da liberação das citocinas IL-6 e IL-8 no líquido sinovial. Cuellar e colaboradores (2009) também apontaram para a presença de IL-6 intra-articular como possível geradora da dor após a lesão meniscal.

Quanto à função da articulação do joelho, as correlações vistas anteriormente com a dor se invertem, estando a melhora da função inversamente proporcional à presença local das IL-6, IL-8, GAGs e células PMN e MNC. Constatando que a dor é um fator determinante na piora da função relatada pelos sujeitos do estudo.

Na população estudada a idade mostrou uma relação positiva com a MMP-9 (110 kDa) e com a IL-6 e uma relação inversa com a IL-1 β . Goekoop e colaboradores (2010) verificaram que uma baixa capacidade de produzir estas citocinas foi associada à ausência de OA na velhice. Como os sujeitos deste trabalho são de uma faixa etária mais jovem que aqueles que desenvolvem OA primária, a IL-1 β teve pouca expressão. Estas duas citocinas podem ter ações específicas no processo de envelhecimento, mas serem agravantes na destruição da cartilagem.

O comportamento da MMP-2 com o número de afecções e com o grau de lesão condral, sugere que a MMP-2 não está envolvida nos processos de degeneração da cartilagem, confirmando estudos anteriores (Franco et al., 2011 submetido; Arican et al., 2000; Gepstein et al., 2002). Já a correlação da MMP-9 com o grau de lesão condral, número de afecções, e citocinas inflamatórias do líquido sinovial, aponta que elas podem estar relacionadas com a

degração da cartilagem e manutenção do processo inflamatório articular (Franco et al., 2011 submetido; Gupta et al., 2007; Milner et al., 2006), sendo que a banda 84 kDa está mais relacionada com a dor e a 110 kDa com a idade.

Como na população estudada o tempo de lesão teve uma correlação positiva com o grau de lesão condral, a diminuição da concentração de GAGs com o tempo da lesão pode ser resultado de uma grande perda de tecido cartilaginoso alterando a síntese de glicosaminoglicanas, como já foi apontado por trabalho anterior (Franco et al., 2008). O número elevado de células inflamatórias e a atividade de citocinas pró-inflamatórias sem nenhuma correlação com o tempo de lesão apontam para uma manutenção da inflamação após o período agudo do trauma (Frisbie et al., 2008; Franco et al., 2008).

Como tempo de lesão e número de afecções favorecem o grau de lesão da cartilagem, a correlação negativa encontrada com a MMP-2 e a IL-10, aponta que estas moléculas não estão favorecendo a degradação da cartilagem. A citocina antiinflamatória IL-10 já foi citada como supressora da inflamação (Kim et al., 2000) e este comportamento da MMP-2 corrobora com estudos prévios (Franco et al., 2011 submetido).

O tempo de lesão também teve uma relação com o TGF- β , porém positiva, indicando que com o passar do tempo aumenta a atividade do TGF- β local. A ação dessa citocina, tida como anti-inflamatória é controversa na OA, pois estudos já apontaram um aumento de sua expressão na doença (Ning et al., 2010), enquanto outros não encontram diferença da sua atividade sistêmica quando compararam com grupos controle (Nelson et al., 2009). Davidson, Van der Kraan e Van der Berg (2007) sugerem que o TGF- β é essencial para a integridade da cartilagem, sendo uma poderosa ferramenta na prevenção ou reparo dos danos condrais. No entanto, a suplementação com esta citocina inibe a sua ação local, causando efeitos colaterais como formação de osteófitos e deixando a articulação desprotegida ao avanço da OA. Sendo assim, um aumento do TGF- β pode ser relacionado a tentativas de reparo da cartilagem articular.

Os resultados deste estudo também sugerem que o número de afecções afeta mais a evolução da degradação da cartilagem do que o tempo da lesão em si, pelo fato de um maior número de estruturas articulares lesadas gerarem maior instabilidade e incongruência articular. Além disso, somado às alterações na ativação muscular e na propriocepção do ligamento rompido, a inflamação articular contribui para a dor e impede a chegada de informações aferentes relacionadas ao movimento e ao senso de posição articular. A redução na aferência, além de comprometer a realização das atividades de vida diária, reduz a

coativação neuromuscular e diminui a capacidade de absorção de choques nas superfícies articulares (Lephart, 2000).

Portanto, mais importante do que o tempo de lesão após o rompimento do LCA é o número de afecções. Sendo assim, a recuperação da estabilidade é primordial quando ocorre o comprometimento de outras estruturas, para evitar os micro traumas recorrentes. Além disso, os resultados deste estudo mostram que os marcadores biológicos locais podem estar correlacionados com as alterações funcionais e com a sensação dolorosa decorrentes da lesão crônica do LCA. Estes marcadores influenciam os sintomas e a chance de desenvolver incapacidades funcionais, lesões condrais e OA pós-traumática. Os riscos são maiores com o comprometimento meniscal e condral. A contenção adequada do processo inflamatório e a inibição da atividade da IL-6, IL-8 e MMP-9 (84 kDa) pode levar a um alívio dos sintomas dolorosos e conseqüentemente a uma melhora da percepção da função do joelho.

6.5. Conclusão

A dor e a função estão relacionadas a atividades proteolíticas e inflamatórias do ambiente articular, principalmente à atividade da IL-6, IL-8 e a MMP-9 (84 kDa). Dependendo da expressividade destes biomarcadores e da interação entre eles há piora da dor e da função e aumentam os riscos de desenvolver OA.

Referências

- Adamopoulos IE et al. Stimulation of osteoclast formation by inflammatory synovial fluid. *Virchows Arch* 2006; 449: 69-77.
- Anitua E et al. Relationship between Investigative Biomarkers and Radiographic Grading in Patients with Knee Osteoarthritis. *Int J Rheumatol*. 2009; 2009: 747432, 4.
- Arican M et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 activity in bovine synovial fluids. *J Vet Med A* 2000; 47:449-456.
- Barker K et al. Association between radiographic joint space narrowing, function, pain and muscle power in severe osteoarthritis of the knee. *Clin Rehabil*. 2004; 18:793-800.
- Bennell KL et al. Relation of knee joint proprioception to pain and disability in individuals with knee osteoarthritis. *Orthopedic Res* 2003; 21:792-97.
- Botha-Scheepers et al. Innate production of tumor necrosis factor α and interleukin 10 is associated with radiological progression of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1165-1169.
- Castro JOM et al. Anatomia e biomecânica do ligamento cruzado anterior. *Rev joelho/sbcj* 2003; 3 (1): 9-12..
- Cleutjens JPM et al. Regulation of collagen degradation in rat myocardium after infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1995, 27:1281-1292.
- Coimbra, IB et al. consenso brasileiro para o tratamento da osteoartrose. *Rev Bras Reumatol* 2002; 42:371-74.
- Cuellar et al. Cytokine profiling in acute anterior ligament injury. *J Arthrosc Rel Surg* 2010; 26(10): 1296-1301.
- Davidson BEN et al. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; Jun15(6):597-604.
- Elsaid KA et al. Decreased lubricin concentration and markers of joint inflammation in synovial fluids from patients with anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum* 2008; 58(6): 1707-1715.
- Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 1982; 9: 247 -248.
- Fatarelli IFC et al. Lesão e reconstrução do LCA: Uma revisão biomecânica do controle motor. *Rev Bras Fisioter* 2004; 8(3): 197-206.
- Franco RN et al. Correlation between inflammatory cells and sulfated glycosaminoglycan concentration in synovial fluid of subjects with secondary knee osteoarthritis. *J Rheumatol* 2008; 35:1096-101.

- Frisbie DD et al. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercises and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16(10):1196-204.
- Gepstein A et al. Expression of matrix metalloproteinases in articular cartilage of temporomandibular and knee joints of mice during growth, maturation, and aging. *Arthritis & Rheumatism* 2002; 46, 12: 3240-3250.
- Goekoop RJ et al. Low innate production of interleukin-1 β and interleukin-6 is associated with the absence of osteoarthritis in old age. *Osteoarthritis Cartilage* 2010 Jul; 18(7): 942-7
- Gupta K et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Is Expressed in Osteoarthritis and Forms a Complex With Matrix Metalloproteinase 9. *Arthritis Rheum* 2007; 56(10): 3326-3335.
- He W et al. Synthesis of interleukin 1h, tumor necrosis factor- α and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with anti-inflammatory cytokines. *J Rheumatol* 2002; 29: 546- 53.
- Hunter DJ et al. Cartilage markers and their association with cartilage loss on magnetic resonance imaging in knee osteoarthritis: the Boston Osteoarthritis Knee Study. *Arth Res Ther* 2008; 9 (5): 1-8.
- ICRS Document: Clinical cartilage injury evaluation system. January 2000.
- Ishiguro N, Kojima T, Poole R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci* 2002; 65: 73 -84.
- Isnard N, Robert L, Renard G. Effect of sulfated GAGs on the expression and activation of MMP-2 and MMP-9 in corneal and dermal explant cultures. *Cell Biol Int* 2003; 27: 779-784
- Irgang JJ et al. Development and validation of the International Knee Documentation Committee Subjective Knee Form. *Am J Sports Med* 2001; 29: 600-613.
- Kim WU et al. The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 200; 119:175-81.
- Lephart SM, Fu FH. Proprioception and neuromuscular control in joint stability. Ed Human Kinetics 2000. United States of American.
- Makowski GS, Ramsey M. binding of matrix metalloproteinase 9 to fibrin is mediated by amorphous calcium-phosphate. *Inflammation* 1998; 22 (6):599-617.
- Marquetti RC et al. MMP-2, jumping exercise and nandrolone in skeletal muscle. *Int J Sports Med* 2008; 29: 559-63.
- Milner JM et al. Metalloproteinase and inhibitor expression profiling of resorbing cartilage reveals pro-collagenase activation as a critical step for collagenolysis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R142.

Mobasheri A et al. Integrins and stretch activated ion channels; putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int* 2002;26:1-18.

Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-60.

Nelson AE et al. Failure of serum transforming growth factor-beta (TGF- β) as a biomarker of radiographic osteoarthritis at the knee and hip: a cross-sectional analysis in the Johnston County Osteoarthritis Project. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:772-776.

Ning L et al. Correlations between both the expression levels of inflammatory mediators and growth factor in medial perimeniscal synovial tissue and the severity of medial knee osteoarthritis. *Int Orthop*. 2010 Jun ; DOI 10.1007/s00264-010-1045-1.

Stannus O et al. Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis Cartilage* 2010; 18:1441-1447.

Strobel M, Stedtfeld HW. Joelho procedimentos diagnósticos. Ed 1. revinter , 2000: 10-33.

Suh JK et al. Intermittent sub-ambient interstitial hydrostatic pressure as a potential mechanical stimulator for chondrocyte metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:71-80.

Traete RF et al. Relação entre a lesão condral e o pico de torque após reconstrução do ligamento cruzado anterior do joelho: estudo de caso. *Rev bras fisioter* 2007; 11(3):.239-243.

Valdes AM et al. A meta-analysis of interleukin-6 promoter polymorphisms on risk of hip and knee osteoarthritis 2010 May ;18(5): 699-704

Verdier MP et al. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int*. 2005 Mar;25(2):118-24.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E ENCAMINHAMENTOS FUTUROS

Nas condições experimentais realizadas os resultados apontaram que inflamação articular e sistêmica estão presentes nos portadores de lesão crônica do LCA. Esta inflamação é determinada pela presença de citocinas sistêmicas e locais, pela atividade das MMP-9 e pelo influxo de neutrófilos (PMN) na articulação. Há possibilidade de uma tentativa de reparo, pela IL-10, pela MMP-2 e pelo TGF- β , porém o catabolismo ainda supera o anabolismo e as tentativas de reparo são insuficientes para conter a degradação da cartilagem.

As citocinas envolvidas na degradação da cartilagem dos sujeitos com lesão crônica do LCA foram a IL-12, a IL-6 e a IL-8, sendo que as duas últimas também foram relacionadas à dor e à perda da função nestes indivíduos. As citocinas consideradas peças chave na OA instalada (IL-1 β e TNF- α) foram pouco detectadas na amostra estudada.

Desta forma, os marcadores biológicos (MMPs, citocinas, células inflamatórias e GAGs) podem estar correlacionados com as alterações funcionais e com a sensação dolorosa decorrentes da lesão crônica do LCA, influenciando os sintomas e a chance de desenvolver incapacidades funcionais, lesões condrais e OA pós-traumática.

O risco para o desenvolvimento da OA é maior com o comprometimento meniscal e condral, pois o número de afecções foi fator de risco mais importante do que tempo de lesão. A recuperação da estabilidade é primordial quando ocorre comprometimento meniscal, para evitar micro traumas recorrentes, porém, a reconstrução ligamentar não exclui a possibilidade de desenvolver OA. Portanto, algumas questões ainda carecem de investigações para serem respondidas, como por exemplo, a expressão dos biomarcadores inflamatórios, sistêmicos e locais, nos sujeitos com LCA reconstruído cirurgicamente. E ainda, a ação de fármacos na atividade inflamatória e proteolítica destes indivíduos.

Quanto ao potencial dos biomarcadores avaliados e a classificação BIPED, encontramos que:

- a) Queda na concentração de TGF- β sistêmica pode ser sugestiva de lesão condral leve, compatível com marcador de diagnóstico de lesão condral.
- b) Queda nos níveis de IL-12 sistêmica podem sugerir lesão de LCA ou condral, compatível com marcador investigativo, pois não diferencia os tecidos lesados.
- c) Aumento da IL-8 no soro sugere lesão condral, devido a sua correlação com a IL-8 local, porém também pode ser considerada um marcador investigativo, pela baixa especificidade.

- d) Aumento na concentração de IL-6 ou IL-8 no líquido sinovial é sugestivo de lesão aguda do LCA ou, no caso de lesão crônica, a manutenção dos níveis de IL-6 e IL-8 é sugestivo de lesão condral (moderada a severa). Desta forma, há possibilidade de ambas citocinas serem consideradas marcadores de diagnóstico do rompimento do LCA após entorse agudo ou marcadores de gravidade da doença, indicando graus mais avançados de lesão condral em sujeitos com lesão crônica do LCA.
- e) Aumento da IL-12 no líquido sinovial aponta para presença de lesão condral, independente da gravidade, indicando a possibilidade da marcação diagnóstica para comprometimento da cartilagem.
- f) Aumento de GAGs livres sugere quebra da rede de colágeno, sendo um marcador investigativo que pode auxiliar no entendimento de outros marcadores.
- g) Aumento de MMP-9 pode indicar degradação da MEC da cartilagem, porém sem diferenciação de graus de comprometimento, sugerindo um marcador diagnóstico.

Ressaltamos que mais estudos devem ser feitos para confirmação destes potenciais biomarcadores.

Enfim, a função articular do joelho se altera em contrapartida aos eventos bioquímicos e biomoleculares que envolvem a cartilagem, a sinóvia e o líquido sinovial. Concluímos que, o controle da inflamação e da produção das citocinas envolvidas na lesão condral devem ser feitos imediatamente após a lesão do LCA e devem persistir por muito tempo após o trauma, na tentativa de evitar ou controlar o desenvolvimento da OA pós-traumática. Novas estratégias farmacológicas e terapêuticas devem ser estudadas, pois a cascata de degradação da cartilagem tem início após o rompimento do LCA e não é interrompida durante o período crônico da lesão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMAPOULOS I.E. et al. Stimulation of osteoclast formation by inflammatory synovial fluid. **Virchows Arch**, v.449, p. 69-77, 2006.

AMIN A.R.; ABRAMSON S.B. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v.10, p. 263–268, 1998.

BAUER D.C. et al. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. **Osteoarthritis Cartilage**, v.14, p. 723-727, 2006.

BENITO M J. et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 64, p. 1263-1267, 2005.

BRENNER S.S. et al. Osteoarthritis of the knee – clinical assessments and inflammatory markers **OsteoArthritis and Cartilage**, v.12, p.469–475, 2003.

CATTERALL J.B. et al. Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254). **Arthritis Res Ther**, v. 12, p. R229, 2010.

DALHBERG L. et al. Cartilage metabolism in the injured and uninjured knee of the same patient. **Annals of the Rheumatic Diseases** , v.53, p. 823-827, 1994.

ELSAID K.A. et al. Decreased lubricin concentration and markers of joint inflammation in synovial fluids from patients with anterior cruciate ligament injury. **Arthritis Rheum**, v.58, n.6, p. 1707-1715, 2008.

FELICE, J.C., et al. Elementos Básicos de diagnóstico da Osteoartrose. **Temas de Reumatologia clínica**, v.3, n.3, p.68-79, 2002.

FELSON D.T.; ZHANG Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. **Arthritis Rheum**, v. 41, p. 1343-55, 1998.

FIORITO S. et al. Inflammatory status and cartilage regenerative potential of synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and chondropathy. **Rheumatology**, v. 44, p. 164-171, 2005.

FRANCO, R.N. et al. Correlation between inflammatory cells and sulfated glycosaminoglycan concentration in the synovial fluid of subjects with secondary knee osteoarthritis. **J Rheumatol**, v.35, p.1096-101, 2008.

FRANSEN M.; CROSBIE J.; EDMONDS J. Physical Therapy is effective for patients with Osteoarthritis of knee: a Randomized Controlled Clinical Trial. **J Rheumatol**, v.28, p.156-64, 2003.

FRENCH H.P. et al. Exercise and manual physiotherapy arthritis research Trial (EMPART): a multicentre randomised controlled Trial. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.10, n. 9, 2009.

FRISBIE D.D. et al. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercises and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis Cartilage**, v.16, n.10, p.1196-204, 2008.

GOEKOOP R.J. et al. Low innate production of interleukin-1 β and interleukin-6 is associated with the absence of osteoarthritis in old age. **Osteoarthritis Cartilage**, v.18, n.7, p. 942-7, 2010.

GOLDRING M.B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. **Arthritis Reum**, v. 43, n.9, p. 1916-1926, Sept 2000.

JORDAN K.M. et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT) **Ann Rheum Dis**, v.62, p.1145-55, 2003.

LOHMANDER, L.S. et al. Temporal Patterns of Stromelysin-1, Tissue Inhibitor and Proteoglycan Fragments in Human Knee Joint Fluid After Injury to the Cruciate Ligament or Meniscus. **Journal of Orthopaedic Research**, v.12, p.21-28, 1994.

MAKOWSKI G.S.; RAMSEY M. binding of matrix metalloproteinase 9 to fibrin is mediated by amorphous calcium-phosphate. **Inflammation**, v. 22, n.6, p. 599-617, 1998.

MARINI S. et al. A Correlation between knee cartilage degradation observed by arthroscopy and synovial proteinases activities. **Clin Biochem**, v.36, p. 295-304, 2003

MARQUETTI R.C. et al. Matrix metalloproteinase 2 activity in tendon regions: effects of mechanical loading exercise associated to anabolic-androgenic steroids. **Eur J Appl Physiol**, v.104, p.1087-93, 2008.

MOORE A.R.; CHANDER C.L.; HANANOE T.H.P. The chemotatic properties of the cartilage glycosaminoglicans for polymorphonuclear neutrophils. **Int F Tiss Reac**, v. 11, p.301-307, 1989.

MOORE A.R. et al. Cartilage degradation by polymorphonuclear leucocytes. In vitro assessment of the pathogenic mechanisms. **Ann Rheum Dis**, v. 52, p. 27-31, 1993.

MORELAND L.W. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. **Arthritis Res Ther**, v. 5, p.54-67, 2003 (DOI 0.1186/ar623)

OKADA Y. Matrix-degrading metalloproteinases and their roles in joint destruction. **Mod Rheumatol**, v. 10, p.121-128, 2000.

PAGURA S.M.C. et al. Circulating and sinovial levels of IGF-I, cytokines, physical function and anthropometry differ in women awaiting total knee arthroplasty when compared to men. **J Orthop Res**, v. 23, p. 397-405, 2005.

RORVIK, A.M.; GRONDAL,A.G. Markers of Osteoarthritis: A Review of the Literature. **Vet Surg**, v. 24, p.255-62, 1995.

STANNUS O. et al. Circulating levels of IL-6 and TNF- α are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. **Osteoarthritis Cartilage**, v.18, p.1441-1447, 2010.

TIDERIUS, C. J et al. Cartilage glycosaminoglycan loss in the acute phase after anterior cruciate ligament injury. **Arthritis Rheum**.v.52, p.120-127, 2005.

VALDES A.M. et al. A meta-analysis of interleukin-6 promoter polymorphisms on risk of hip and knee osteoarthritis . **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n.5, p.699-704, 2010.

VANWANSEELE B.; LUCCHINETTI E.; STÜSSI E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 10, p. 408-419, 2002.

YOSHIHARA Y. et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 59, p. 455-451, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Artigo apresentado para qualificação de doutorado

Franco RN, Cintra Neto PFA, Pimentel ER, Cohen M, Lima GEG, Mattiello-Rosa SMG.

Correlação entre a presença de células inflamatórias e a concentração de glicosaminoglicanos sulfatados no líquido sinovial de indivíduos com osteoartrite secundária de joelho. J Rheumatol 35:1096–101, 2008.

Correlation Between Inflammatory Cells and Sulfated Glycosaminoglycan Concentration in Synovial Fluid of Subjects with Secondary Knee Osteoarthritis

RENATA N. FRANCO, PAULO F.A. CINTRA NETO, EDSON R. PIMENTEL, MOISÉS COHEN, GEOVANE E.G. LIMA, and STELA M.G. MATTIELLO-ROSA

ABSTRACT. Objective. To analyze the presence of inflammatory cells in the synovial fluid (SF) of subjects with osteoarthritis (OA) and correlate them with the concentration of sulfated glycosaminoglycan (GAG). **Methods.** The degree of chondral injury from 20 subjects (17 men, 3 women, mean age 48.06 ± 14.35 yrs) was evaluated macroscopically by means of arthroscopy and graded according to the International Cartilage Repair Society classification. All subjects presented anterior cruciate ligament (ACL) injuries, associated or not to menisci injuries. SF was aspirated and centrifuged. Sulfated GAG concentration was quantified by dimethylene blue staining. Manual morphometry was used to determine the inflammatory cell count (mononuclear and polymorphonuclear) by optical microscopy, after staining with May-Grünwald-Giemsa. The time of injury and degree of chondral injury were considered, and correlations among the variables were obtained by Spearman nonparametric correlation test.

Results. There was no significant correlation between the amount of mononuclear cells and the GAG concentration. There was a significant positive correlation between the polymorphonuclear cells and the GAG concentration, and a significant negative correlation between the degree of chondral injury and the GAG concentration.

Conclusion. Polymorphonuclear cells may be either a cause or an effect in the metabolic and biochemical processes occurring in chondral injuries. The correlations support the hypothesis that inflammatory cells have a significant role in the progression and chronicity of chondral injury in secondary OA. (First Release April 15 2008; J Rheumatol 2008;35:1096–101)

Key Indexing Terms:

OSTEOARTHRITIS INFLAMMATION SULFATED GLYCOSAMINOGLYCANS
MONONUCLEAR AND POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

Osteoarthritis (OA), the most common form of synovial joint arthritis, is the cumulative result of biological and mechanical events that generate an unbalanced situation between synthesis and degradation in joint tissues^{1,2}. The disease, which frequently affects knee joints, may be secondary to meniscus and ligament injuries, and, in this case, can affect young, adult, and elderly subjects.

OA is a complex process including multiple changes in joint components, such as cell and extracellular matrix¹, and

is defined as a progressive degenerative disease rather than an inflammatory disease. However, the existence and relevance of inflammatory changes in the synovial membrane have been described by many investigators²⁻⁶. It is supposed that synovitis in arthritic joints has a role in pain, joint inflammation, and cartilage degeneration^{2,7,8}, thus being a determinant of OA pathophysiology^{3,6}. As degradation of cartilage begins, synovial and inflammatory cells act as phagocytes, engulfing tissue breakdown products released into the synovial fluid (SF), and secrete proinflammatory cytokines such as interleukin 1 (IL-1), IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), the latter being principally involved in the onset of OA^{1,5}. These cytokines are responsible for increased levels of nitric oxide and prostaglandins, described as mediators for inflammation and cartilage destruction^{2,9-11}. The presence of these components in joint fluid stimulates the proteolytic action of the inflammatory cells, resulting in release of larger fragments into the SF, closing a cycle that can perpetuate the OA process and progression of the disease^{12,13}.

Chondrocytes are able to synthesize a variety of proteolytic enzymes, such as matrix metalloprotease (MMP). The

From the Department of Physiotherapy, Federal University of Sao Carlos; Department of Cell Biology, State University of Campinas; and Department of Orthopedics and Department of Orthopedics and Traumatology, Federal University of Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil.

R.N. Franco, MS; P.F.A. Cintra Neto, MS, Department of Physiotherapy, Federal University of Sao Carlos (UFSCar); E.R. Pimentel, PhD, Professor, Department of Cell Biology, State University of Campinas; M. Cohen, PhD, Professor, Department of Orthopedics and Traumatology, Federal University of Sao Paulo; G.E.G. Lima, PT; S.M.G. Mattiello-Rosa, PhD, Professor, Department of Physiotherapy, UFSCar.

Address reprint requests to Dr. S.M.G. Mattiello-Rosa, Departamento de Fisioterapia, UFSCar, Rodovia Washington Luis, km 235, São Carlos, São Paulo, CEP 13565-905, Brazil.

Accepted for publication January 3, 2008.

Personal non-commercial use only. The Journal of Rheumatology Copyright © 2008. All rights reserved.

proteolytic cascade responsible for degradation involves collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2:A, MMP-9:B), and stromelysins 1 (MMP-3), 2 (MMP-10) and 3 (MMP-11)¹⁴⁻¹⁶. The rise in proteolytic activity is considered to be the primary cause of pathological cartilage destruction in OA, especially that caused by members of the metalloprotease family, which are directly involved in extracellular matrix breakdown¹⁷. They also have an important role in inflammatory processes to fight injury and maintain tissue turnover¹⁸. Polymorphonuclear (PMN) cells are sources of powerful oxidants and proteolytic enzymes, including elastase and active metalloprotease, that are capable of degrading intact cartilage¹⁹.

Moore, *et al*²⁰ reported the relationship between PMN cells and extracellular matrix glycosaminoglycans (GAG), when they identified the presence of a neutrophilic infiltrate after intradermal injection of GAG in rats. Thus the products of the breakdown of the cartilaginous matrix by PMN cell enzymes are liberated into the SF and may be chemotactic to the PMN leukocytes themselves, thus perpetuating joint tissue injuries²⁰. As well, the mononuclear cells (MNC) have an injurious effect in joint cartilage. Immunohistochemical studies have confirmed that synovial tissue from patients with early OA is characterized by MNC infiltration and production of proinflammatory cytokines and mediators of joint damage³. In addition, blood vessel formation and expression of proinflammatory mediators and nuclear transcription factors are overexpressed in early OA³.

Variations in the cellular and humoral composition of the SF reflect changes in the synovial tissues²¹. During the destructive process in the extracellular matrix, there is an increase in its concentration due to the presence of macromolecules resulting from the breakdown of the cartilage, such as proteins, proteoglycan fragments, GAG, collagen, inflammatory cells, and free chondrocytes or their cellular components²²⁻²⁵.

The concentration of sulfated GAG in synovial liquid has been investigated in various joint diseases, being considered as joint markers that can reflect the metabolism of the joint tissue under both normal and pathological conditions, in which its concentration is modified²⁶. However, few studies have related the presence of leukocytes in the SF with cartilaginous matrix products, particularly in OA. In synovitis, PMN cells are found in both the SF and the synovial membrane, and may adhere to the joint surface and thus attack the cartilage directly²⁷. Nevertheless, the presence of inflammatory cells in ligamentous knee injuries should be restricted to the post-trauma acute period. Therefore, because of the injurious and amplifying role of inflammation, there are many reasons to study the behavior of PMN and MNC associated with products of cartilaginous matrix breakdown such as GAG.

Our aim was to analyze the existence of inflammation in SF from the presence of inflammatory cells (MNC and

PMN), and correlate this with a biological marker of cartilaginous metabolism, in this case the concentration of sulfated GAG, taking into account the time of injury and the degree of chondral injury of knees in secondary OA caused by ACL injury.

MATERIALS AND METHODS

Subjects. Forty-four subjects of both sexes took part in this study. Twenty-four were excluded as follows: they presented with systemic, cardiorespiratory, or rheumatic conditions; absence of SF during collection; the presence of osteomyoarthral disease in the healthy lower limb as reported by the subject; had undergone joint infiltration; had a limited range of motion between 0° and 90°; or had a time from injury < 4 weeks or > 14 months.

According to the criteria, 20 subjects were selected (17 men, 3 women, average age 48.06 ± 14.35 yrs). The subjects presented 2, 3, and 4 degrees of chondral injury, according to the International Cartilage Repair Society (ICRS) classification²⁸.

All the subjects presented chondral injuries, secondary OA, due to trauma involving the ACL, associated or not with the menisci, with an average time from injury of 118.23 ± 109.37 days. The subjects underwent clinical and imaging evaluation and surgery was ordered by the physician responsible for the arthroscopic repair of the injured structure.

The subjects had used nonsteroidal antiinflammatory drugs, but discontinued them for 2 to 3 weeks prior to their SF puncture, and no subject reported recurrent trauma during the previous month.

Evaluation record forms were filled in for all the subjects prior to data collection to assure that the inclusion and exclusion criteria were met. The aims and procedures of the study were explained to the subjects and they gave signed informed consent as required by the 196/96 resolution of the National Health Committee. The study was approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings of the Federal University of São Carlos (National Health Committee protocol no. 143/04).

Synovial fluid aspiration. SF was collected from the injured knee by means of punctures prior to surgery. The anterolateral face of the injured knee was first shaved and anesthetized. A needle was inserted into the lateral suprapatellar knee region in order to collect fluid from the subquadriceps bursa.

All fluids were quantified for volume and divided into 3 samples for storage at -70°C until analysis.

Macroscopic evaluation of joint cartilage. After puncture for SF, the same surgeon described the macroscopic aspects of the joint surface, trochlea, patella, tibial and femoral condyles, medial and lateral menisci, and the ACL during the arthroscopic procedure.

To determine the degrees of tissue injury of the joint cartilage, an evaluation record was used, based on the ICRS histological classification²⁸.

Scoring of the degree of tissue destruction was defined using the "maximum score" pattern, represented by the greatest degree of cartilage injury (0 to 4 scale) found in any one of the femoral or tibial condyles, patella, or trochlear regions.

To analyze the results of the macroscopic evaluation of the joint cartilage, the highest score found for each subject was used, not taking into account the area size or number of foci.

Evaluation of sulfated GAG. The sulfated GAG concentration in SF was evaluated by means of absorbance analysis after staining with dimethylmethylene blue (DMMB), using the method described by Farndale, *et al*²⁹. The spectrophotometric method associated with the dimethylmethylene reagent was chosen for simplicity and specificity for measurement of sulfated GAG in tissues and body fluids.

SF samples were centrifuged at 14,000 g for 15 min in a model 5415D Eppendorf centrifuge; 100 µl aliquots of the sample supernatants were then digested in 100 µl 0.4 M acetate buffer, pH 5.8, containing 10 mM EDTA, 20 mM of N-acetylcysteine, and papain added immediately before use in the proportion of 300 µg per 1 ml SF. After incubation in a double-boiler at 60°C for 24 h, iodoacetic acid was added to a final concentration of 10 mM,

for a total of 22.2 μ l, then centrifuged 4 min at 12,000 g. One unit of streptomycin hyaluronidase was then added to the supernatant. After incubation in a double-boiler at 37°C for 12 h, 100 μ l were removed. When the sample was ready for measurement, DMMB reagent solution (2.5 ml) was added to the material and the absorbance was read at $\lambda = 526$ nm in a spectrophotometer after a few seconds.

Chondroitin sulfate solutions of known concentrations were used to determine the concentrations of sulfated GAG.

Cytology. Stored SF was prepared for cytologic analysis after thawing at room temperature. The material (100 μ l sample from each subject) was processed in a Fanem® Cytospin-248® cytocentrifuge for 5 min at 1500 rpm. The material was then dry-fixed and stained by the special May-Grünwald-Giemsa procedure^{27,30}.

The numbers of PMN and MNC in SF samples were determined by manual counting via optical microscopy. Two evaluators carried out the slide analysis using magnification $\times 40$ with an Axiolab light microscope (Zeiss).

Calculation of the number of fields/slide for each sample was based on the Bernoulli distribution statistical method, in which the total number of slide fields for each subject and the number of inflammatory cells present in normal and inflamed SF were taken into account. It was decided that at least 30 fields be sampled for each subject for subsequent reading under the light microscope. Thirty-two fields/subject were analyzed, for a total of 1216 fields evaluated. This result presented a margin of error of ± 3 percentage points, with 95% of confidence.

Statistical analysis. Analysis was by use of Statistica for Windows (version 6.0). The tests for normality (Shapiro Wilk's W test) and homogeneity (Levene) were applied to the variables, and nonparametric tests were indicated for data analysis. To evaluate correlation between results obtained by the 2 observers, the nonparametric Spearman test with $R = 0.8$ and $p = 0.05$ was applied. This same test was applied to determine the relationships among GAG concentrations, quantity of inflammatory cells, degree of OA, and time after injury.

For all statistical analyses, a significance level of 5% was considered ($p = 0.05$).

RESULTS

All the subjects presented degrees of chondral injury between grade 2 and 4. Seventeen of them had meniscal tears and 11 had ACL injury associated with the cartilage injury. The average amount of SF aspirated was 5.9 ± 5.4 ml.

The SF samples presented a citric yellow coloration. In some cases there were streaks of blood present due to sample contamination by the needle. There was considerable variation of number of inflammatory cells per ml SF, from 117.2 to 25,359.4 MNC cells/ml and from 0 to 421.9 PMN cells/ml.

Sulfated GAG concentrations varied between 25.2 μ g/ml and 314.8 μ g/ml. Table 1 shows values for the variables studied.

As shown in Table 2, PMN and MNC cells had a positive moderate correlation ($r = 0.82$, $p = 0.0001$). There was no

significant correlation between the MNC cells and GAG concentrations. However, a significant positive correlation between PMN cells and GAG concentrations was found ($r = 0.60$, $p = 0.01$; Figure 1). A significant negative correlation ($r = -0.62$, $p = 0.003$) was identified between the GAG concentration and the degree of chondral injury (Figure 2).

No correlation was found between the degree of chondral injury or time from injury and the measures of MNC or PMN cells.

DISCUSSION

Normal SF contains only about 10 to 20 inflammatory cells/ml, with a predominance of MNC cells, only 10% of the total being PMN cells³¹. In the SF samples from joints showing chondral injury evaluated in our study it can be considered that the concentrations of cells, 117.2 to 25,359.4 MNC/ml and 0 to 421.9 PMN/ml, are characteristic of an inflammatory joint process.

According to Yanni, *et al*³² there is a correlation between the number of synovial membrane macrophages and the degree of cartilage erosion. The macrophages would be responsible for amplifying the chronic inflammation through the release of cytokines by the inflammatory cells^{32,33}. The release of cytokines such as IL-1, IL-8, and TNF- α by macrophages during the inflammatory process stimulates leukocytes to pass through the endothelial wall and participate actively in angiogenesis. The release of IL-1, IL-6, and TNF- α by synovial macrophages also stimulates the release of collagenase and elastase, which have an important role in joint tissue destruction³⁴. Benito, *et al*³ found an increase in the amount of MNC infiltrate in the early stages of OA, a phase in which other investigators have described a greater GAG concentration³⁵⁻³⁷. However, in our samples, there was no significant correlation between MNC and the GAG concentration, although the latter did show a significant correlation with PMN, and PMN presented a strong correlation with MNC.

Moore, *et al*²⁰ described one possible mechanism for the influx of inflammatory cells; their studies showed that GAG may be chemotactic to neutrophils. Once these fragments are in contact with joint cartilage, the PMN would stimulate greater matrix breakdown through the release of neutrophilic enzymes and stimulation of metalloprotease activity, which leads to greater tearing of cartilage components. These degraded components would be released into the SF and then engulfed by inflammatory cells acting as phago-

Table 1. Mean (\pm SD) for study variables.

Age, yrs	Time from Injury, days	GAG, μ g/ml	MNC, no. of cells/ml	PMN, no. of cells/ml
48.06 \pm 14.35	118.23 \pm 109.37	124.96 \pm 75.82	5255.9 \pm 8374.9	152.34 \pm 122.74

GAG: glycosaminoglycans, MNC: mononuclear cells, PMN: polymorphonuclear cells.

Table 2. Correlations among the study variables (r value).

	MNC	PMN	GAG	Time from Injury	Degree of Chondral Injury
MNC	1.000	0.826**	0.335	-0.146	-0.188
PMN	0.826**	1.000	0.602*	-0.192	-0.255
GAG	0.335	0.602*	1.000	-0.167	-0.626**
Time from injury	-0.146	-0.192	-0.167	1.000	0.456
Degree of chondral injury	-0.188	-0.255	-0.626**	0.456	1.000

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$. For definitions see Table 1.

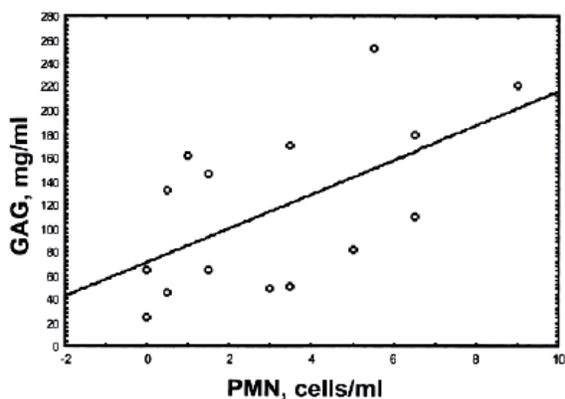


Figure 1. Number of polymorphonuclear cells (PMN) in relation to sulfated glycosaminoglycan (GAG) concentration ($r = 0.60$, $p = 0.01$).

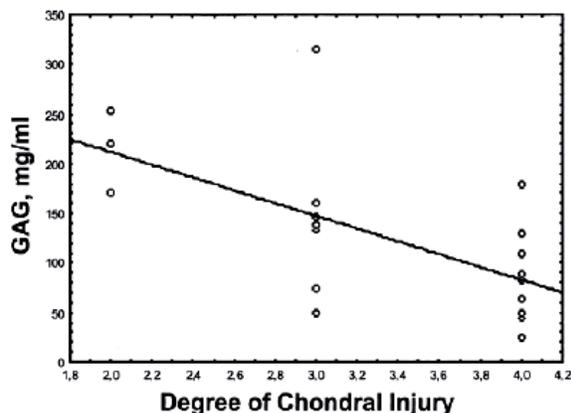


Figure 2. Sulfated glycosaminoglycan (GAG) concentration in relation to the degree of chondral injury in subjects with cartilage injury classified as International Cartilage Repair Society (ICRS) grade 2 to 4 ($r = -0.62$, $p = 0.003$).

cytes, which would thus secrete more cytokines and inflammatory mediators, perpetuating the OA process^{19,20,38-40}.

Our data also showed a negative correlation between the

degree of chondral injury and the concentration of sulfated GAG, which means that with lower degrees of cartilage injury, the GAG concentration was higher. Other authors have also found an inverse relationship between the degree of chondral injury and the average GAG concentration in SF, stating that greater degrees of cartilaginous degeneration tended to present a decrease in the proteoglycan concentration. This relationship probably results from the reduction in the amount of cartilaginous tissue in the joint^{35,37,41-43}.

Stefanie, *et al*² evaluated changes in the macroscopic aspects of OA, such as radiographic alterations and clinical signs, comparing the action of inflammatory mediators, and found no correlations between them². Our results showed a correlation between the molecular indicators of cartilage injury (proteoglycan fragments, GAG) and the inflammatory cells present in SF. However, as noted by Stefanie, *et al*², morphological alterations such as a decrease in joint space and the presence of osteophytes had already occurred, but in our study these alterations had not yet occurred. Perhaps methods of early diagnosis should be improved and focused on the joint microenvironment, as suggested by Lohmander, *et al*^{35,36}.

It is known that the presence of PMN cells contributes to degradation of GAG¹⁹, although chemotaxis of the PMN in the joint environment in individuals with chronic ligament injury and who are not in the trauma period is undetermined. In this type of population it was expected that the inflammatory process must exist only after trauma, which was not the case, because the presence of PMN and MNC was observed in the individuals without symptoms who were studied. A possible mechanism for the perpetuation of inflammatory cells is the positive correlation between the GAG and PMN. The instability generated by ligament loss alters the movements between joint surfaces, causing trauma in the cartilage in different areas of the joint surface.

These micro-movements are acknowledged by the chondrocytes, and when these cells sense perturbation in the tissue they alter their metabolic state in order to respond to the mechanical stress^{44,45}. This alteration is identified in the SF since it reflects the entire cartilage environment. The presence of proteoglycan fragments and GAG in the joint envi-

ronment results in activation of mechanisms for the absorption/removal of these fragments. Considering that micro-traumas are frequent, an unbalanced situation between GAG synthesis and reabsorption in the joint environment would increase the concentration of GAG, and therefore the mechanism of chemotaxis between the GAG and PMN would be activated and maintain the presence of the inflammatory cells. Moore, *et al*²⁰ also described this mechanism.

Consequently, if aggression processes in the tissue are maintained, the cartilage starts its degenerative process and therefore its thickness will gradually be lost, leading to OA. Thus in cases of severe chondral injury, such as OA, the decrease in GAG would be directly related to the absence of chondrocytes, which are responsible for synthesis of the extracellular matrix.

Our results verify that inflammation of the SF is of great relevance in the metabolic and biochemical processes occurring in the joint after mechanical trauma. Consequently, primary care in cartilage maintenance, such as the control of joint inflammation, would appear to be instrumental in avoiding perpetuation of the degenerative process¹². Thus in patients with focal chondral injury resulting from trauma who are symptom-free, the presence of GAG would be an indication of cartilage metabolic activity, and this would enable therapeutic intervention. As a result, on a longterm basis, perpetuation of the presence of GAG in the SF would lead to an amplifying effect of the injury through leukocyte chemotaxis. Therefore, control of micro-traumas and recurrent traumas such as joint sprains would seem to be fundamental to the health of the joint cartilage.

Knowledge of the interactions between inflammation, biomechanics, and the behavior of cartilage biomarkers may lead to understanding of the etiopathogenesis and progression of OA, providing new therapies for this disease.

Our results showed a positive correlation between the increase in concentration of sulfated GAG and the presence of inflammatory cells, mainly PMN, in the joint environment of individuals with chondral injury due to trauma involving the ACL, sometimes associated with the menisci, and who were not in the post-trauma acute stage; our findings suggest that the presence of PMN cells in the joint environment is perpetuated by the chemotactic action of the GAG concentration. The progressive degeneration of the cartilage is amplified by an inflamed environment and by the loss of GAG due to recurrent micro-traumas, which can favor perpetuation of the cycle of inflammation, leading to premature development of secondary OA.

REFERENCES

- Ishiguro N, Kojima T, Poole R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci* 2002;65:73-84.
- Brenner SS, Klotz U, Alscher DM. Osteoarthritis of the knee — clinical assessments and inflammatory markers. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:469-75.
- Benito MJ, Veale DJ, Fitzgerald O, Van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1263-7.
- Fiorito S, Magrini L, Adrey J, Mailhe D, Brouty-Boyé D. Inflammatory status and cartilage regenerative potential of synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and chondropathy. *Rheumatology Oxford* 2005;44:164-71.
- Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1916-26.
- Haynes MK, Hume EL, Smith JB. Phenotypic characterization of inflammatory cells from osteoarthritic synovium and synovial fluids. *Clin Immunol* 2002;105:315-25.
- Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:45-53.
- Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997;24:365-71.
- Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001;15:831-45.
- Abramson SB, Attur M, Amin AR, Clancy R. Nitric oxide and inflammatory mediators in the perpetuation of osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 2001;3:535-41.
- Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1998;10:263-8.
- Webb GR, Westcott CI, Elson CJ. Osteoarthritic synovial fluid and synovium supernatants up-regulate tumor necrosis factor receptors on human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:167-76.
- Huziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress: A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:432-63.
- Cohen NP, Foster RJ, Mow VC. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998;28:203-15.
- Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64:460-6.
- Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stüssi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:408-19.
- Marini S, Fasciglione GF, Monteleone G, Maiotti M, Tarantino U, Coletta M. A correlation between knee cartilage degradation observed by arthroscopy and synovial proteinases activities. *Clin Biochem* 2003;36:295-304.
- Okada Y. Matrix-degrading metalloproteinases and their roles in joint destruction. *Mod Rheumatol* 2000;10:121-8.
- Moore AR, Iwamura H, Larbre JP, Scott DL, Willoughby DA. Cartilage degradation by polymorphonuclear leucocytes. In vitro assessment of the pathogenic mechanisms. *Ann Rheum Dis* 1993;52:27-31.
- Moore AR, Chander CL, Hanahoe TH, et al. The chemotactic properties of cartilage glycosaminoglycans for polymorphonuclear neutrophils. *Int J Tissue React* 1989;11:301-7.
- Adamopoulos IE, Danks L, Itonaga I, et al. Stimulation of osteoclast formation by inflammatory synovial fluid. *Virchows Arch* 2006;449:69-77.
- Fawthrop F, Hornby J, Swan A, Hutton C, Doherty M, Dieppe P. A comparison of normal and pathological synovial fluid. *Br J Rheumatol* 1985;24:61-9.
- Lewis S, Crossman M, Flannelly J, et al. Chondroitin sulphation patterns in synovial fluid in osteoarthritis subsets. *Ann Rheum Dis* 1999;58:441-5.
- Platt PN. Examination of synovial fluid. *Clin Rheum Dis*

- 1993;9:51-67.
25. Rorvik AM, Grondal AG. Markers of osteoarthritis: a review of the literature. *Vet Surg* 1995;24:255-62.
 26. Nakayama Y, Narita T, Mori A, Uesaka S, Miyazaki K, Ito H. The effects of age and sex on chondroitin sulfates in normal synovial fluid. *Arthritis Rheum* 2002;46:2105-8.
 27. Jones ST, Denton J, Holt PJ, Freemont AJ. Possible clearance of effete polymorphonuclear leucocytes from synovial fluid by cytophagocytic mononuclear cells: implications for pathogenesis and chronicity in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 1993;52:121-6.
 28. International Cartilage Repair Society. ICRS cartilage injury evaluation package. January 2000.
 29. Fardale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 1982;9:247-8.
 30. Freemont AJ, Denton J. The cytology of synovial fluid. In: Gray W, editor. *Diagnostic cytology*. New York: Churchill Livingstone; 1995:887-8.
 31. Shmerling RH. Synovial fluid analysis. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20:503-12.
 32. Yanni G, Whelan A, Feiher YC, Bresnihan B. Synovial tissue macrophages and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994;53:39-44.
 33. Ziff M. Pathways of mononuclear cell infiltration in rheumatoid synovitis. *Rheumatol Int* 1989;9:97-103.
 34. Brennan FM, Field M, Chu CQ, Feldmann M, Maini RM. Cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1991;30:76-80.
 35. Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:181-9.
 36. Lohmander LS. Articular cartilage and osteoarthrosis. The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. *J Anat* 1994;184:477-92.
 37. Uesaka S, Nakayama Y, Shirai Y, Yoshihara K. Serum and synovial fluid levels of chondroitin sulfate in patients with osteoarthritis of the knee joint. *J Nippon Med School* 2001;68:165-70.
 38. Carson JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injection of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* 1996;39:1535-44.
 39. Makowski GS, Ramsby ML. Zymographic analysis of latent and activated forms of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid: correlation to polymorphonuclear leukocyte infiltration and in response to infection. *Clin Chim Acta* 2003;329:77-81.
 40. Okada Y. Matrix-degrading metalloproteinases and their roles in joint destruction. *Mod Rheumatol* 2000;10:121-8.
 41. Dalhberg L, Roos H, Saxne T, et al. Cartilage metabolism in the injured and uninjured knee of the same patient. *Ann Rheum Dis* 1994;53:823-7.
 42. Myers SL, Brandt KD, Albrecht ME. Synovial fluid glycosaminoglycan concentration does not correlate with severity of chondropathy or predict progression of osteoarthritis in a canine cruciate deficiency model. *J Rheumatol* 2000;27:753-63.
 43. Tiderius CJ, Olsson LE, Nyquist F, Dahlberg L. Cartilage glycosaminoglycan loss in the acute phase after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum* 2005;52:120-7.
 44. Suh JK, Baek GH, Aroen A, et al. Intermittent sub-ambient interstitial hydrostatic pressure as a potential mechanical stimulator for chondrocyte metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:71-80.
 45. Mobasheri A, Carter SD, Martin-Vasallo P, Shakibaei M. Integrins and stretch activated ion channels: putative components of functional cell surface mechanoreceptors in articular chondrocytes. *Cell Biol Int* 2002;26:1-18.

APÊNDICE B – Termo de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA
 Laboratório de Análise da Função Articular
 Prof^a. Dr.^a Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa
 Via Washington Luiz, Km 235 - C.P.676 - 13565-905 -
 São Carlos/SP - Brasil
 TEL: (16) 3351-8039-FAX: (16)3361-2081

Nome do projeto: EXPRESSÃO DE CITOCINAS E CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO SANGUE E NO LÍQUIDO SINOVIAL DE INDIVÍDUOS COM OSTEOARTRITE SECUNDÁRIA E SUA RELAÇÃO COM AS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E COM A PRESENÇA DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO DA CARTILAGEM

Responsáveis:

Prof^a.Dr^a.Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa – Orientadora e Coordenadora do Projeto

Ms. Renata Nogueron Franco– Fisioterapeuta - Aluna de Doutorado

Eu, _____, RG n.º _____, residente à _____ n.º _____, bairro _____, na cidade de _____, estado _____, declaro que fui convidado a participar da pesquisa acima citada e estou consciente das condições sob as quais me submeterei detalhadas a seguir:

Objetivo: O objetivo desse estudo será avaliar se existe ligação entre às alterações na cartilagem articular do meu joelho identificadas pelo exame de ressonância magnética e/ou artroscopia e os marcadores inflamatórios do sangue e líquido sinovial do meu joelho para que seja possível melhorar o diagnóstico e tratamento precoce da osteoartrite (artrose).

Justificativa: Sei que a coleta de sangue e de líquido sinovial fornecerão maiores informações sobre a articulação do joelho comprometido e o grau de comprometimento da minha cartilagem. Assim como, essas novas informações auxiliarão novos estudos, o entendimento da osteoartrite e o tratamento de futuros pacientes com lesões de cartilagem iguais ou de maior intensidade que as minhas. Portanto, sei do objetivo desse estudo em investigar uma ação preventiva para impedir a progressão da osteoartrite em futuros tratamentos.

a) Estou ciente de que o líquido do meu joelho e uma amostra de 4ml de sangue serão estudados em laboratório. Para isso, serei submetido a uma punção articular, ou seja, o líquido do meu joelho será aspirado através de uma seringa e agulha por médico cirurgião ortopedista. E o sangue do meu braço será coletado por enfermeira treinada com material descartável e estéril.

b) Minha identidade será preservada em todas as situações que envolvam discussão, apresentação ou publicação dos resultados da pesquisa, a menos que haja uma manifestação da minha parte por escrito, autorizando tal procedimento.

c) Não receberei qualquer forma de remuneração pela minha participação no experimento, e os resultados obtidos a partir dele serão propriedades exclusivas dos pesquisadores, podendo ser divulgados de qualquer forma, a critério dos mesmos.

d) Durante a aspiração do líquido do meu joelho, estou ciente de que posso experimentar a sensação de uma picada de inseto e leve ardência, que corresponde à injeção de anestesia, e um incômodo ou pressão, pela punção do líquido. Sei que posso sentir o local dolorido após a punção e devo evitar atividade física e esforços. Durante a coleta de sangue, estou ciente que experimentarei a sensação de picada da agulha, assim como em exames de sangue convencionais.

e) Fui informado dos passos, riscos e objetivos do procedimento.

f) A minha recusa em participar do procedimento não me trará qualquer prejuízo, estando livre para abandonar o experimento a qualquer momento.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: cephumanos@power.ufscar.br

_____, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Voluntário

Responsáveis:

Prof^ª.Dr.^ªStela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa
Orientadora e Coordenadora do Projeto

Ms.Ft Renata Nogueiron Franco
Aluna de Doutorado

Telefone para contato: Prof^ª.Dr.^ª.Stela → (16) 3351-8039 ou Ft. Ms.Renata → (19) 3442-3200/
(19) 8194-6098

APÊNDICE C – Informações do voluntário



INFORMAÇÕES DO VOLUNTÁRIO

Data: ___/___/___ Sigla: _____ Código: _____

Nome: _____ Idade: _____

Data de nascimento: ___/___/___ Peso: _____ Altura: _____

Sexo: () Fem () Masc. Afecção: _____

Origem: _____

Lado acometido: () E () D OBS: _____

Data da lesão: ___/___/___ tempo de lesão: _____

Presença de afecção sistêmica, cardio-respiratória ou reumática: () Sim () Não

Uso de antiinflamatórios: () Sim () Não. Qual: _____

Tempo de utilização: _____ Dosagem: _____

Número de entorses recorrentes: _____ Data do último: _____

Realizou fisioterapia pré-operatória: () Sim () Não

Exames complementares no joelho: () Radiografia () RM () Cintilografia () TC

() Avaliação Isocinética . OBS: _____

Grau de lesão condral pela RM: _____

Grau de lesão condral pela artroscopia: _____

Lado acometido:

Coloração: _____ Volume total: _____

Ependorf 1 – citologia: _____ Volume: _____

Ependorfe 2 – Interleucinas: _____ Volume: _____

Ependorfe 3 – GAGs: _____ Volume: _____

Ependorfe 4 – Metalos: _____ Volume: _____

Ependorfe extra: _____ Volume: _____

Sangue coletado: () Sim () Não. _____

Lysholm _____ OBS: _____

IKDC: _____

OBS: _____

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676

Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110

Fax: (016) 3361.3176

CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil

propq@power.ufscar.br - <http://www.propq.ufscar.br>

CAAE 0071.0.135.000-08

Título do Projeto: EXPRESSÃO DE CITOCINAS E CÉLULAS INFLAMATÓRIAS NO SANGUE E NO LÍQUIDO SINOVIAL DE INDIVÍDUOS COM OSTEOARTRITE SECUNDÁRIA E SUA RELAÇÃO COM ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E COM A PRESENÇA DE BIOMARCADORES DO METABOLISMO DA CARTILAGEM.

Classificação: Grupo III

Pesquisadores (as): Renata Nogueira Franco, Profª Drª Stela Márcia Mattiello G. Rosa (Orientadora)

Dr. Moisés Cohen (Co-orientador)

Dr. Mário Ferreti (colaborador)

Parecer Nº. 297/2008

1. Normas a serem seguidas

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em ___/___/___ e ao término do estudo.

2. Avaliação do projeto

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos (CEP/UFSCar) analisou o projeto de pesquisa acima identificado e considerando os pareceres do relator e do revisor DELIBEROU:

A proposta de estudo apresentada atende às exigências éticas e científicas fundamentais previstas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

3. Conclusão:

Projeto aprovado

São Carlos, 16 de julho de 2008.

Profª. Dra. Justina Paiva de Sousa
Coordenadora do CEP/UFSCar

ANEXO B – Formulário de avaliação subjetiva do joelho

FORMULÁRIO DE AVALIAÇÃO SUBJETIVA DO JOELHO

COMITÊ INTERNACIONAL DE DOCUMENTAÇÃO DO JOELHO (IKDC, 2000)

Nome: _____ Sexo: F ___ M ___

Data: _____ Data de Nascimento: _____

Lesão: _____

Data da Lesão: _____

As respostas devem ser graduadas no mais alto nível de atividade que você acha que pode executar sem sintomas significativos, mesmo que você não esteja realizando-as regularmente.

SINTOMAS

1. Qual é o mais alto nível de atividade física que você pode realizar sem sentir dor significativa no joelho?

- Atividade muito vigorosa (como saltar ou girar o tronco como no basquete ou futebol)
- Atividade vigorosa (como realizar exercícios físicos intensos como surfe, jogar vôlei ou tênis)
- Atividade moderada (como realizar exercícios físicos moderados na academia, correr ou trotar)
- Atividade leve (como andar, realizar trabalhos domésticos ou jardinagem)
- Incapaz de realizar qualquer uma das atividades acima em virtude da dor no joelho

2. Desde sua lesão ou durante as últimas quatro semanas, com que frequência você tem sentido dor?

Nunca

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 Constantemente

3. Se você tiver dor, qual a intensidade?

Sem dor

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

 Pior dor imaginável

4. Desde a sua lesão ou durante as quatro últimas semanas quão rígido ou inchado esteve seu joelho?

- Nem um pouco
- Pouco
- Moderado
- Muito
- Extremamente

5. Qual é o mais alto nível de atividade física que você pode realizar sem que cause inchaço significativo no joelho?

- Atividade muito vigorosa (como saltar ou girar o tronco como no basquete ou futebol)
- Atividade vigorosa (como realizar exercícios físicos intensos como surfe, jogar vôlei ou tênis)
- Atividade moderada (como realizar exercícios físicos moderados na academia, correr ou trotar)
- Atividade leve (como andar, realizar trabalhos domésticos ou jardinagem)
- Incapaz de realizar qualquer uma das atividades acima em virtude do inchaço no joelho

6. Desde a sua lesão ou durante as últimas quatro semanas seu joelho já travou?

- Sim Não

7. Qual é o mais alto nível de atividade física que você pode realizar sem falseio significativo no joelho?

- Atividade muito vigorosa (como saltar ou girar o tronco como no basquete ou futebol)
- Atividade vigorosa (como realizar exercícios físicos intensos como surfe, jogar vôlei ou tênis)
- Atividade moderada (como realizar exercícios físicos moderados na academia, correr ou trotar)
- Atividade leve (como andar, realizar trabalhos domésticos ou jardinagem)
- Incapaz de realizar qualquer uma das atividades acima em virtude do falseio no joelho

ATIVIDADES ESPORTIVAS

8. Qual é o mais alto nível de atividade física que você pode participar de forma regular?

- Atividade muito vigorosa (como saltar ou girar o tronco como no basquete ou futebol)
- Atividade vigorosa (como realizar exercícios físicos intensos como surfe, jogar vôlei ou tênis)
- Atividade moderada (como realizar exercícios físicos moderados na academia, correr ou trotar)
- Atividade leve (como andar, realizar trabalhos domésticos ou jardinagem)
- Incapaz de realizar qualquer uma das atividades acima em virtude do joelho

9. Quanto o seu joelho afeta a sua habilidade de:

		Sem Dificuldade	Fácil	Moderado	Difícil	Incapaz
a	Subir escadas					
b	Descer escadas					
c	Ajoelhar de frente					
d	Agachar					
e	Sentar com os joelhos dobrados					
f	Levantar-se de uma cadeira					
g	Correr para frente					
h	Saltar e aterrissar com a perna lesionada					
i	Frear e acelerar rapidamente					

FUNÇÃO

10. Em uma escala de 0 a 10 (sendo 10 normal e 0 incapaz de realizar suas atividades diárias), como você avaliaria o seu joelho?

Funcionalidade anterior a lesão no joelho:

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Não consegue executar nenhuma atividade da vida diária	<input type="checkbox"/>	Sem limitações nas atividades da vida diária										

Funcionalidade atual do joelho:

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Não consegue executar nenhuma atividade da vida diária	<input type="checkbox"/>	Sem limitações nas atividades da vida diária										

ANEXO C – Escala Visual Analógica

ESCALA VISUAL ANALÓGICA – EVA



Questionar o paciente quanto ao seu grau de dor sendo que **0** significa **ausência total de dor** e **10** o nível de **dor máxima** suportável pelo paciente.