

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**



**“INFLUÊNCIA DA LESÃO CONDRAI NA CONCENTRAÇÃO DE  
GLICOSAMINOGLICANAS SULFATADAS NO LÍQUIDO SINOVIAL”**

**PAULO FELIX DE ARAUJO CINTRA NETO**

**Dissertação de Mestrado**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

**INFLUÊNCIA DA LESÃO CONDRAL NA CONCENTRAÇÃO DE  
GLICOSAMINOGLICANAS SULFATADAS NO LÍQUIDO SINOVIAL**

**Paulo Felix de Araújo Cintra Neto**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Fisioterapia da  
Universidade Federal de São Carlos PPG-  
FT/UFSCar como parte dos requisitos  
para obtenção do Título de Mestre em  
Fisioterapia – Área de Concentração  
Processos de Avaliação e Intervenção em  
Fisioterapia.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa**  
ORIENTADORA

**São Carlos**

**2006**

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

C575il

Cintra Neto, Paulo Felix de Araujo.

Influência da lesão condral na concentração de glicosaminoglicanas sulfatadas no líquido sinovial / Paulo Felix de Araújo Cintra Neto. -- São Carlos : UFSCar, 2006. 72 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Articulações (Ligamentos e juntas). 2. Articulação do joelho. 3. Lesão condral. 4. Ligamento cruzado anterior. 5. Glicosaminoglicanas. I. Título.

CDD: 611.72 (20<sup>a</sup>)

Dedico este trabalho...

...ao meu padrasto Ricardo, incentivador e companheiro de todas as horas;

...aos meus pais, Claudia e Paulo, por proporcionar-me uma vida repleta de dedicação e amor incondicional;

...às minhas irmãs; Renata, pela paciência nos momentos difíceis, Manuela e Janaina pela confiança concedida;

...aos meus avós Wilma e Edu pelo incentivo e aplausos antecipados de todos os meus atos;

...á minha madrinha Kátia pelo incentivo e apoio em todos os momentos;

...e a minha namorada Thais pelo apoio carinhoso.

Agradecimento especial à minha amiga e orientadora Dra. Stela Márcia Mattiello Gonçalves Rosa por ter se dedicado intensamente à pesquisa, orientando, ensinando e disponibilizando seu tempo.

Aos meus amigos pelos momentos compartilhados.

## **Agradecimentos**

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Stella Peccin e Dr. Ricardo Giusti pela colaboração no trabalho e incentivo incondicional.

Ao Prof. Dr. Moises Cohen que além de colaborador deste trabalho, esteve sempre disposto a ajudar.

Ao Prof. Dr. Edson Pimentel pela grande colaboração e pelo empréstimo do Laboratório de Biologia Celular da UNICAMP.

Ao Dr Joicemar pela ajuda valiosa durante as coletas.

Aos colegas do laboratório de Plasticidade Músculo Esquelético e amigos do cafezinho.

Ao Geovane e a Renata pelo apoio fundamental para realização deste trabalho.

A todos os sujeitos que aceitaram participar deste trabalho, principalmente os residentes de fisioterapia do Instituto Cohen.

À Tereza (UFSCar) e Francisco (UNICAMP) pelo valioso ensinamento nas técnicas de laboratório.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia pelos ensinamentos ao longo das disciplinas cursadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos para realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

Agradecimentos.....	iii
Sumário.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	4
2.1 Anatomia e Biomecânica do Joelho.....	4
2.2 A Lesão Ligamentar.....	10
2.3 A Lesão Meniscal.....	11
2.4 A Cartilagem Articular.....	12
2.5 Líquido Sinovial.....	14
2.6 Osteoartrite.....	15
3. Referências Bibliográficas.....	17
Artigo encaminhado para revista Osteoarthritis and Cartilage versão português.....	24
Artigo encaminhado para revista Osteoarthritis and Cartilage versão final.....	49

## **Lista de Abreviaturas**

**GAGs.....Glicosaminoglicanas Sulfatadas**

**OA.....Osteoartrite**

**LCA.....Ligamento Cruzado Anterior**



## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a influência da lesão condral na concentração de glicosaminoglicanas sulfatadas no líquido sinovial de indivíduos portadores de lesões condrais isoladas ou associadas com lesões do ligamento cruzado anterior e dos meniscos, bem como uma associação com o tempo da lesão e o grau de osteoartrite. **Desenho do estudo:** Foram avaliados 29 indivíduos adultos de ambos os sexos. Os sujeitos foram divididos em cinco grupos: grupo controle; grupo com lesão condral; grupo com lesão condral associada à lesão meniscal; grupo com lesão condral associada à lesão do ligamento cruzado anterior e grupo com lesão condral associado às lesões meniscal e do ligamento cruzado anterior. **Métodos:** As amostras foram quantificadas em relação à concentração de glicosaminoglicanas pelo método espectrofotométrico, utilizando o corante azul de dimetilmetileno. O grau de osteoartrite foi avaliado macroscopicamente, por artroscopia e graduado segundo classificação da *Internacional Cartilage Repair Society*, 2000, variando entre grau 0 e 4. **Resultados:** Encontramos diferenças significativas quando comparamos a concentração de glicosaminoglicanas do grupo controle em relação aos outros grupos ( $P < 0,05$ ), houve também correlação entre concentração de glicosaminoglicanas sulfatadas e o tempo pós lesão no grupo com lesão condral, ( $r = -1$ ). Não houve diferenças significativas entre os grupos estudados quanto ao grau de osteoartrite e tempo após a lesão. **Conclusão:** A lesão condral isolada apresenta maior concentração de glicosaminoglicanas, entretanto a presença de lesão do ligamento cruzado anterior e meniscos influenciam uma tendência à queda desta concentração no líquido sinovial e sem apresentar relação com o tempo de lesão e o grau de osteoartrite entre os grupos estudados.

**Palavras-Chave:** cartilagem articular, osteoartrite, proteoglicanas, glicosaminoglicanas, líquido sinovial.

## ABSTRACT

**Objective.** To evaluate the influence of sulfated glycosaminoglycan (GAG) concentration in synovial fluid from individuals with chondral injuries, either isolated or associated with anterior cruciate ligament injury or meniscal injury, and check for an association between time since injury and the degree of chondral injury. **Material and Method.** Twenty-nine adult subjects (25 men and 4 women, mean age  $38.3 \pm 10.9$  years) were selected. Samples obtained from all subjects were quantified to determine the GAG concentration using dimethylmethylene blue dye. The degree of chondral damage was macroscopically evaluated by arthroscopy and rated according to the *International Cartilage Repair Society* (ICRS) classification. **Results.** Significant differences were found concerning the GAG concentration in the control group compared with the other groups ( $p < 0.05$ ). No significant differences were found between the studied groups concerning time since injury and degree of chondral damage according to the ICRS. A strong correlation was found between GAG concentration and time since injury in the chondral injury group ( $r = -1$ ). **Conclusion.** Damage to articular structures seems to be the determining factor in the change of synovial fluid GAG concentration, being higher in isolated chondral injury. When associated with anterior cruciate ligament rupture and/or meniscal injury, it will promote a tendency to fall, and is not related to sex, age, time since injury and degree of chondral injury in all groups studied.

**Key words:** Glycosaminoglycans, Osteoarthritis, Synovial fluid, Chondral injury, Anterior Cruciate Ligament, Meniscus

## 1. INTRODUÇÃO

A articulação do joelho é a mais constantemente lesada em todo o corpo, em especial em indivíduos que participam de atividades atléticas. A incidência de instabilidade permanente e progressivamente residual é mais alta do que qualquer outra lesão articular traumática sofrida em atividades esportivas. O joelho parece ser uma articulação simples, porém a biomecânica e o tratamento de suas lesões vêm sendo, há muito tempo, tema de discussão na literatura e nos círculos profissionais. O advento da artroscopia deu origem a maior compreensão desses tópicos (ANDREWS, 2000).

O joelho é a maior articulação humana em área de cartilagem e de membrana sinovial, é também a mais complexa em termos de componentes internos (SMILLIE, 1981). Conforme descrito por Hunter\* em 1743, a lesão na cartilagem articular é um grande problema, porque uma vez lesada, ela não regenera (citado por ALFORD, COLE, 2005). A cartilagem articular não apresenta vasos sanguíneo, linfáticos nem suprimento nervoso. A falta de suprimento neurovascular é que impede o reparo da cartilagem lesada e colabora com o progresso da osteoartrite (IRGANG, 1998; ORTIZ, 2001).

As afecções articulares degenerativas como a osteoartrite (OA) levam a uma degradação da cartilagem articular, caracterizada pela liberação de macromoléculas do tecido e subsequente perda da integridade e das propriedades mecânicas do tecido. No entanto a verdadeira etiologia desta afecção continua desconhecida (TIDERIUS et al., 2005).

Sendo assim podemos assumir que em adição ao distúrbio biomecânico temos fatores bioquímicos com importante papel no desenvolvimento da OA pós traumática (TIDERIUS et al., 2005).

Embora as mudanças na composição do líquido sinovial tenham sido discutidas como se fossem principalmente da cartilagem articular, a contribuição no derrame articular de tecidos extrarticulares como meniscos, ligamento cruzado e sinóvia, não tem sido especulado adequadamente. Esses tecidos também apresentam proteoglicanas em sua matriz extracelular e seu metabolismo não é bem conhecido (LEWIS et al., 1999).

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 sobrecarga na articulação e posteriormente microlesões na cartilagem articular, que levam ao aparecimento da OA. Entretanto, o mecanismo responsável pela degeneração da cartilagem articular após a ruptura do LCA ainda é pouco entendido. A instabilidade mecânica não parece ser o único fator responsável, distúrbios bioquímicos também contribuem no desenvolvimento da OA pós traumática (TIDERIUS et al., 2005).

Com o passar do tempo, a destruição tecidual resulta em mudanças macroscópicas no interior da articulação, visíveis devido à diminuição do espaço articular entre tibia e fêmur. Essas mudanças são observadas durante as fases avançadas de degradação cartilaginosa por meio de alterações radiológicas, tanto no joelho comprometido somente pela lesão do LCA quanto naquele que tem associada uma ruptura meniscal ou meniscectomia (MALETIUS, MESSNER, 1999). O aparecimento da OA em joelhos humanos decorrentes de trauma parece diferir na sua ocorrência com relação ao tipo de tecido articular lesado. Estima-se que a incidência de OA pós-traumática em pacientes com lesão meniscal pode ocorrer em 40 a 60% dos casos, enquanto que nas lesões do LCA em 60 a 90% dos casos (HAZELL et al., 1995).

Nas doenças articulares, o que pode também ocorrer é um aumento da concentração do líquido em função da presença de macromoléculas derivadas do processo destrutivo da matriz da cartilagem, incluindo proteínas, fragmentos de proteoglicanas e glicosaminoglicanas (MATTIELO-ROSA, 1999).

Especificamente na OA do joelho humano, o líquido passa a conter maior número de células inflamatórias do que no líquido normal e a apresentar fragmentos da cartilagem na sua composição (FAWTHROP et al., 1985).

Recentes avanços na bioquímica e imunologia das proteoglicanas têm levado ao desenvolvimento de um método de avaliação muito sensível e específico para os componentes da cartilagem e produtos degradados nos fluidos corporais. Dentre estes, fragmentos de proteoglicanas no líquido sinovial têm sido considerados como possíveis marcadores do metabolismo cartilaginoso (TASKIRAN et al., 1998).

Portanto, o líquido sinovial tem papel chave nas articulações, lubrificando as superfícies cartilaginosas e suprindo nutrientes para suas células. As concentrações dos produtos metabólicos dos tecidos articulares, presentes no líquido sinovial refletem os mecanismos de síntese e degradação dos componentes dos tecidos articulares, inclusive da cartilagem articular (HAAPALA, et al., 2001).

Isto sugere que as moléculas da matriz extracelular presentes no líquido sinovial pode ser usadas como marcadores para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento das mudanças no metabolismo cartilaginoso na presença de alguma afecção (LOHMANDER, 1994).

## 2.0 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Anatomia e biomecânica do joelho

A articulação do joelho é aquela que se faz entre a superfície articular inferior do fêmur e superior da tíbia e entre a superfície articular anterior do fêmur e a patela (AMATUZZI, 2004).

Segundo Kapandji (1990), o joelho é uma articulação localizada entre dois braços de alavanca: o fêmur e a tíbia. Sua complexidade se dá devido seus aspectos anatômicos, biomecânicos e fisiológicos.

Possui três ossos (fêmur, tíbia e patela) e três superfícies que se articulam: tibiofemoral medial, tibiofemoral lateral e patelofemoral, as quais se encontram dentro de uma cápsula articular comum (LEHMKUHL et al., 1997).

Esta estrutura tem como funções resistir a grandes forças, fornecer estabilidade e proporcionar grande amplitude de movimento. A mobilidade é promovida principalmente pela estrutura óssea, e a estabilidade por contenções passivas (especialmente os ligamentos, cápsula e meniscos) e dinâmicas (estruturas neuromusculares) (BENN et al., 1998; PEREIRA et al., 1998).

A articulação do joelho é do tipo sinovial, sendo também chamada de diartrose (*diarthrosis* significa “articulação móvel”). Permite grande mobilidade na flexão, necessária para a corrida e marcha, para orientar o pé em relação às alterações do solo e para as atividades que encurtam ou aumentam o membro inferior. Atua também como amortecedor de choque e com o pé fixo, permite movimentos de torção do corpo através da sua mobilidade rotacional (TACANI, 1996).

Os côndilos são proeminências distais do fêmur, podendo ser palpados em ambos os lados da patela e acompanhados proximalmente até os epicôndilos.

Inferiormente aos côndilos, encontra-se a linha articular tibiofemoral e entre os mesmos, há a fossa intercondiliana. Na tibia anteriormente está a tuberosidade tibial, na qual se insere a porção distal do tendão patelar do músculo quadríceps da coxa (LEHMKUHL et al., 1997). As superfícies articulares dos côndilos da tibia (platô tibial), são separadas pela eminência intercondiliana que consiste em duas espinhas (medial e lateral) (ANDRADE et al., 1997).

Os côndilos femorais são convexos tanto longitudinal quanto transversalmente. Estes articulam-se com os dois côndilos tibiais, menores, que possuem apenas uma ligeira concavidade (o côndilo tibial lateral é convexo anterior e posteriormente) (LEHMKUHL et al., 1997). A superfície articular longitudinal dos côndilos femorais possui aproximadamente o dobro do comprimento da superfície dos côndilos tibiais e com isso, os movimentos de flexão e extensão do joelho não podem ser considerados puros de rolamento ou dobradiça. Em lugar disso, os côndilos executam ao mesmo tempo movimentos de rolamento e deslizamento, com a proporção de cada um variando na amplitude de movimento. O rolamento ocorre predominantemente no início da flexão e o deslizamento mais no término da mesma (KAPANDJI, 1990).

Os meniscos lateral e medial são fibrocartilagens intra-articulares que apresentam as seguintes funções: aumentar a congruência das articulações tibiofemorais, distribuir a pressão, lubrificação, estabilizar da articulação do joelho em todos os planos (principalmente conferindo estabilidade rotacional), prevenir o colapso da membrana sinovial durante a flexo-extensão, sustentar de 40 a 60 % da carga total sobre o joelho em extensão e até 85 % na flexão, absorver impacto fêmoro-tibial em até 20% e função proprioceptiva articular através de receptores específicos (CAMPBELL, 1997; COHEN et al., 1998). As áreas de sustentação de peso do joelho são quase iguais nas superfícies tibiofemorais (medial e lateral), com área máxima ocorrendo quando o

joelho está em hiperextensão. Com a flexão do joelho, a área de sustentação se move posteriormente sobre os côndilos tibiais e se torna menor (DRECOLL, ROHEN, 1998).

As únicas inserções ósseas dos meniscos na tíbia são através dos seus cornos nas fossas intercondilianas anterior e posterior e através dos ligamentos coronários, que fazem parte da cápsula e se fixam nos bordos periféricos dos meniscos na margem da tíbia. Estas cartilagens não são fixadas nas superfícies articulares da tíbia, sendo portanto móveis. Eles possuem outras inserções, como o ligamento transverso que conecta os cornos anteriores dos dois meniscos, as faixas fibrosas que conectam os cornos anteriores de ambos os meniscos com o retináculo de tendão patelar, o ligamento colateral medial que é fixado no menisco medial, o tendão do músculo semimembranoso que envia fibras ao bordo posterior do menisco medial, o músculo poplíteo que envia fibras ao bordo posterior do menisco lateral e o ligamento meniscofemoral que se estende desde o menisco lateral (posteriormente) até o lado interno do côndilo medial, próximo do ligamento cruzado posterior (LEHMKUHL et al., 1997).

Os meniscos semilunares fibrocartilagosos do joelho estão interpostos entre a tíbia e o fêmur. Cada menisco cobre aproximadamente dois terços da superfície articular da tíbia. O menisco lateral não está aderido tão firmemente quanto o menisco medial, o que lhe proporciona maior liberdade de movimento. Os 10 a 30 % periféricos do menisco possuem um suprimento vascular proveniente do plexo capilar perimeniscal. O restante do menisco, 70% ou mais, recebe nutrição por difusão passiva e bombeamento mecânico (ANDREWS, 2000).

Os meniscos são movidos e controlados sobre a tíbia por forças passivas e ativas. Passivamente eles são empurrados anteriormente pelo fêmur à medida que o joelho se estende e o contato dos côndilos femorais ocorre mais anterior sobre os



côndilos tibiais. Em contraposição, os meniscos movem-se posteriormente com a flexão do joelho (KAPANDJI, 1990; LEHMKUHL et al., 1997).

A borda externa dos meniscos é convexa, espessa e fixa, enquanto sua borda interna é côncava e fina, não tendo pontos de fixação. Sua superfície inferior é plana e a superior côncava, em correspondência com anatomia dos planaltos tibiais e côndilos femorais. Os meniscos cobrem cerca de metade a dois terços da superfície articular do platô tibial subjacente (CAMPBELL, 1997).

Os cornos anterior e posterior dos meniscos medial e lateral são as regiões de maior vascularização, havendo diminuição desta com o avanço da idade (COHEN et al., 1998).

O ligamento colateral medial (tibial) abrange a articulação tibiofemoral medialmente. Este percorre desde o epicôndilo medial do fêmur até o côndilo medial e diáfise da tibia. Na linha articular, anteriormente a esse ligamento, se encontra o menisco medial que pode se tornar proeminente com a rotação interna passiva da tibia. Na porção lateral se encontra o ligamento colateral lateral (fibular), que é menor e se insere no epicôndilo lateral do fêmur e cabeça da fibula (DRECOLL, ROHEN, 1998; LEHMKUHL et al., 1997). Tais ligamentos impedem movimento passivo do joelho no plano frontal, assegurando a estabilidade lateral (lado interno e externo) na extensão e permanecem tensionados nesta posição, mas frouxos quando o joelho é flexionado (KAPANDJI, 1990). O ligamento colateral medial evita abdução da tibia sobre o fêmur (*genu valgum*), e o ligamento colateral lateral impede a adução da tibia (*genu varum*) (LEHMKUHL et al., 1997).

Os ligamentos cruzados anterior e posterior conferem controle e estabilidade ao joelho durante os movimentos inteiros de flexão e de extensão. Estes ligamentos ficam no centro da articulação dentro da fossa intercondiliana femoral e recebem este nome

porque formam uma cruz quando vistos de frente ou de lado, mas se vistos de cima, permanecem paralelos (DRECOLL, ROHEN, 1998; LEHMKUHL et al., 1997).

O LCA fixa-se na fossa intercondiliana anterior da tíbia (espinha medial da eminência) e corre lateral e superiormente para fixar-se no lado interno do côndilo lateral do fêmur. Este ligamento atua como restritor primário da translação anterior da tíbia, além de contribuir para a cinemática normal do joelho. Seu seccionamento permite a luxação anterior da tíbia sobre o fêmur (sinal de gaveta) (ANDRADE et al., 1997; LEHMKUHL et al., 1997; KRAUSE et al., 1998).

O ligamento cruzado posterior fixa-se na fossa intercondiliana posterior da tíbia e corre medialmente para fixar-se no lado interno do côndilo femoral medial. Tal ligamento proporciona estabilidade do joelho contra a translação posterior da tíbia em relação ao fêmur. Em contraposição, no movimento de cadeia fechada, o ligamento cruzado posterior ajuda a impedir o desvio anterior dos côndilos femorais sobre os côndilos tibiais (LEHMKUHL et al., 1997; SOUZA et al., 1998).

A patela é um osso sesamóide, grosseiramente triangular e que se articula com as superfícies anterior e distal em forma de sela dos côndilos femorais (superfícies trocleares). O mecanismo extensor ou do quadríceps, estabiliza a patela e guia o movimento entre a patela e o fêmur. Distalmente, a patela está ancorada na tuberosidade da tíbia pelo tendão patelar, sendo que retináculos fibrosos e músculos a ancoram de cada lado. Lateralmente, tal estrutura é estabilizada por retináculos profundos e superficiais: o músculo vasto lateral e o trato íliotibial, respectivamente. Superiormente, o reto da coxa e o vasto intermédio fixam-se na base da patela. Assim, ela é afetada tanto por forças estáticas (fáscias) quanto dinâmicas (músculos). Tem como principal função, potencializar a ação do grupo muscular extensor, através do aumento da ação de

alavanca do músculo quadríceps femoral mudando sua vantagem mecânica dentro de toda amplitude de extensão do joelho (MODA, 1999).

Os tendões do quadríceps e o ligamento patelar formam um ângulo com o centro da patela (traçando-se uma linha imaginária desde a espinha ilíaca antero-superior até o centro da patela, e desta até a tuberosidade anterior da tíbia), chamado de “ângulo Q”. Os valores normais em homens é de 11,2°, e 15,8° em mulheres. Ângulos maiores que 20° têm uma incidência mais alta de anormalidades da articulação patelofemoral, especialmente no mecanismo extensor do joelho. Tal articulação é naturalmente predisposta a instabilidades devido à localização lateral da tuberosidade tibial em relação ao eixo do fêmur, fazendo com que a patela fique sujeita a forças de direção lateral (LEHMKUHL et al., 1997).

O grupo de músculos do quadríceps proporciona a extensão do joelho e consiste nos músculos: vasto lateral, vasto medial (dividido em vasto medial longo e vasto medial oblíquo), vasto intermédio e reto da coxa, sendo este último bi-articular, efetuando também a flexão do quadril. Esses músculos se fundem próximo de suas inserções, formando uma única fixação distal no pólo superior da patela, cápsula do joelho e superfície proximal anterior da tíbia (LEHMKUHL et al., 1997).

Os músculos flexores de joelho estão contidos na loja posterior da coxa, incluindo o bíceps da coxa, o semitendinoso e o semimembranoso (coletivamente chamados de posteriores da coxa ou ísquios tibiais); o gastrocnêmio; o poplíteo; o grácil; e o sartório. Estes músculos são bi-articulares (exceto a porção curta do bíceps e o poplíteo que são monoarticulares), realizando também a extensão do quadril. Com base neste contexto, afirma-se que a ação sobre o joelho é influenciada pela posição da pelve. (KAPANDJI, 1990; LEHMKUHL et al., 1997).

O joelho é considerado uma articulação do tipo gínglimo e que possui dois graus de liberdade de movimento principal (realiza flexo-extensão e movimentos rotacionais com o joelho flexionado) (KAPANDJI, 1990). A flexão é de 120 a 150° dependendo do tamanho da massa muscular do tríceps sural em contato com a coxa posterior. Quando o quadril está em extensão, a amplitude de movimento diminui devido a limitação ocasionada pelo músculo biarticular reto femoral, que tem sua inserção proximal na espinha ântero-inferior do ílio. A hiperextensão é mínima e normalmente não excede 15° (LEHMKUHL et al., 1997).

A sensação final do movimento passivo normal de flexão do joelho é macia pelo contato entre tecidos moles, e a da extensão é firme pela tensão das estruturas ligamentares e capsulares com forte estabilização da articulação. Se o quadril for flexionado a 90°, a extensão do joelho pode ser livre ou limitada pelo comprimento dos músculos posteriores da coxa (KAPANDJI, 1990; LEHMKUHL et al., 1997).

## **2.2. A lesão ligamentar**

A ruptura do LCA é uma lesão comum e relacionada aos esportes, cuja incidência da lesão é de 1/3000 habitantes, ocorrendo em 70% na prática esportiva, sendo que no Brasil, o futebol é citado como a atividade que mais a determina (HEBERT et al., 2003). Segundo Tiderius 2005, sua incidência anual é de 2-3 para cada 10000.

O LCA tem sido estudado na medicina e reabilitação esportiva por ser uma estrutura anatômica de grande importância funcional e mecânica para o movimento humano. Além disso, o ligamento também exerce função sensorial, uma vez que é sede de corpúsculos mecanorreceptores que desencadeiam um reflexo de contração da

musculatura ao redor do joelho, criando um campo de proteção e estabilização dessa articulação (SAMPAIO et al., 1993).

O mecanismo de lesão mais comum na ruptura do LCA é o trauma torcional do joelho. Neste, o corpo gira para o lado oposto ao pé de apoio, determinando uma rotação externa do membro inferior, acompanhada de discreto valgismo do joelho. Esse movimento forçado sob carga do peso do corpo determina a lesão (COHEN, 2003).

Uma vez que o ligamento íntegro exerce papel fundamental na estabilização e percepção articular, as lesões do LCA trazem conseqüências de diversas ordens. Como a alteração mecânica da articulação, perdas proprioceptivas e perdas de força dos músculos envolvidos nos movimentos do joelho, o que resulta em micro lesões cartilaginosas que podem a longo prazo, promover alterações crônicas da cartilagem, como a OA (ODDIS, 1996; STRAUSS, 1998).

Pacientes que apresentam lesão do LCA, associada ou não a lesão meniscal apresentam um alto risco de desenvolver OA pós traumática (TIDERIUS et al., 2005).

### **2.3. A lesão meniscal**

O menisco tem inúmeras funções importantes que incluem: aumento da estabilidade e congruência da articulação do joelho, distribuição e transmissão de cargas, absorção dos choques, propriocepção articular e participação na lubrificação e nutrição articular (ANDREWS, 2000).

Assim como o LCA, as lesões meniscais também comprometem a articulação do joelho promovendo o aparecimento de OA (ABDALLA et al., 2003).

Os meniscos apresentam um papel importante na absorção do impacto articular, o menisco medial é maior que o menisco lateral, apresentando em sua estrutura glicosaminoglicanas sulfatadas, ácido hialurônico e condrócitos. O provável efeito de

uma meniscectomia total na articulação do joelho é uma degeneração articular progressiva. Tem sido confirmado que a extensão e gravidade da lesão condral esta diretamente relacionada com a área retirada do menisco e os dados de estudos clínicos a longo prazo também demonstraram que a degeneração da cartilagem articular não pode ser evitada, mesmo que seja realizada artroscopicamente uma meniscectomia parcial (SONODA et al., 1997).

#### **2.4. A cartilagem articular**

A cartilagem articular é um tecido conectivo especializado com grande quantidade de matriz extracelular. Essa matriz é composta por uma densa rede de fibras colágenas, proteoglicanas agregadas e não agregadas, água, sais inorgânicos e pequenas quantidades de outras proteínas, glicoproteínas e lipídios. A principal macromolécula encontrada na matriz é o colágeno (60%), principalmente tipo II. Este colágeno fica embebido em um firme gel hidratado de proteoglicanas. A proteoglicana é formada por um núcleo protéico central e possui glicosaminoglicanas sulfatadas (GAGs) ligadas a esse núcleo. Essas proteoglicanas podem ser encontradas como monômeros e também na forma agregada. O agregado de proteoglicanas é composto de uma cadeia de ácido hialurônico central (GAG não sulfatada) com múltiplos monômeros de proteoglicana ligados a ele. Componentes importantes das proteoglicanas são as GAGs, formadas por polissacarídeos sulfato de condroitina e queratan sulfato (VANWANSEELE et al., 2002).

De uma forma geral, as funções principais da cartilagem articular são absorver o choque, distribuir a carga ao longo da superfície articular durante a descarga de peso e permitir o deslizamento livre e suave dos movimentos. O que permite que isso ocorra é a composição, a organização, o sistema de expansão e o contrabalanço existente em sua

matriz extracelular e sua superfície lisa deslizante com baixo coeficiente de fricção (FELICE et al., 2002; ANGEL et al., 2003).

A cartilagem articular não apresenta vasos sanguíneos, linfáticos nem suprimento nervoso. A falta de suprimento neurovascular é que impede o reparo da cartilagem lesada e colabora com o progresso da OA (IRGANG, 1998; ORTIZ, 2001; HUZIKER, 2002; FELICE et al., 2002).

A degeneração da cartilagem articular e alterações em outros tecidos articulares podem causar dor e diminuição na amplitude de movimento. O desenvolvimento de estratégias para a prevenção e tratamento de doenças articulares prescinde de um maior entendimento das relações uso/desuso e degeneração. Situações como o estresse de cisalhamento, carga estática prolongada ou ausência de carga, estimulam destruição e ossificação da cartilagem. Existe uma inter-relação entre a composição, a ultra-estrutura e a função da cartilagem articular. Portanto, qualquer doença, trauma ou alteração de sustentação de carga que afete a composição ou a ultra-estrutura desse tecido pode interferir na sua capacidade funcional de sustentar, distribuir cargas e minimizar os estresses de contato (COHEN et al, 1998; VANWANSEELE et al 2002).

O processo da lesão cartilaginosa pode ocorrer devido a um trauma mecânico que pode ser iniciado pela perda das proteoglicanas da matriz extracelular e uma ruptura na rede fibrilar colagenosa, seguido de migração dos condrócitos através dessa matriz. Os condrócitos ficam expostos a estímulos que alteram o seu comportamento metabólico. Essas células, sem a proteção da matriz, multiplicam-se no local da lesão e aumentam seu mecanismo de síntese, tentando uma regeneração. Essa tentativa é transitória, pois logo predomina a ação das proteases que iniciam, de modo progressivo, a degradação da cartilagem e morte celular. Com a degradação, fragmentos de proteoglicanas (PTG) e de colágeno caem no líquido sinovial, indo alcançar a sinóvia. Esses fragmentos passam a agir

como neo-antígenos a partir da exposição de determinadas seqüências de peptídeos. Eles geram efeito irritativo estimulando sinoviócitos que passam a sintetizar citocinas catabólicas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ ). Essas vão interagir com condrócitos, estimulando ainda mais a produção de proteases. Há um aumento da degradação e cresce, proporcionalmente, a quantidade de fragmentos, que voltam a estimular as células sinoviais, fechando um ciclo que pode perpetuar o processo artrósico (FELICE et al., 2002; HUZIKER, 2002)

O aspecto liso e rígido e a coloração branco-azulada-perolada pouco translúcida, comum à cartilagem sadia (MATTIELLO-ROSA, 1999) sofre alterações após lesão do LCA, resultando em perda de proteoglicanas e de condrócitos, o que modifica o aspecto da cartilagem, que se torna macia, amarelada e fibrilada (GUERINO, 2001).

As macromoléculas da matriz da cartilagem articular e proteases envolvidas no metabolismo da matriz cartilaginosa são continuamente liberadas no líquido sinovial (LOHMANDER et al., 1994).

## **2.5. Líquido Sinovial**

O líquido sinovial normal é essencialmente um transudato do plasma sanguíneo de vasos sinoviais, com adição de proteínas e um mucopolissacarídeo – o ácido hialurônico. Em condições normais, o líquido é claro de cor amarelo-pálido e viscoso. O dialisado plasmático é produzido por um extenso plexo capilar situado na superfície interna da membrana sinovial. Os constituintes macromoleculares são capazes de deixar a cavidade sinovial através dos capilares linfáticos na membrana sinovial. Qualquer partícula que entre no líquido é fagocitada por macrófagos (PLATT, 1983; NAIB, 1996). Ele apresenta poucas células inflamatórias dispersas, não mais que 10 a 20 células em cada mililitro, sendo principalmente células mononucleares (MNC), como



macrófagos mononucleares (65%) e linfócitos, e apenas 10% de células PMN, principalmente neutrófilos, além de poucas células sinoviais (SHMERLING, 1994).

O líquido sinovial tem papel chave nas articulações, lubrificando as superfícies cartilagenosas e suprindo nutrientes para suas células. As concentrações dos produtos metabólicos dos tecidos articulares, presentes no líquido sinovial refletem os mecanismos de síntese e degradação dos componentes dos tecidos articulares, inclusive da cartilagem articular (SHMERLING, 1994).

O aumento da concentração do líquido sinovial em função da presença das macromoléculas derivadas do processo destrutivo da matriz extracelular da cartilagem, inclui colágeno, proteoglicanas e proteínas da matriz não colagenosas (LEWIS et al., 1999; MATTIELLO-ROSA, 1999).

## **2.6. Osteoartrite**

A osteoartrite é, essencialmente, uma condição degenerativa da cartilagem articular com formação subsequente de osteófitos marginais, alterações no osso subcondral e medula óssea, reação inflamatória da membrana sinovial e danos na estrutura intra-articular (GOULD, 1993).

Em recente pesquisa sobre os resultados a longo prazo de tratamento conservador de lesão de LCA, Segawa et al. (2001) avaliaram radiologicamente 70 pacientes após 5 a 27 anos de lesão isolada ou associada à meniscectomia. Setenta e quatro por cento dos pacientes apresentaram alterações degenerativas da cartilagem articular, sendo que 37% tinham o espaço articular diminuído. Dentre os sujeitos que apresentavam lesão de LCA isolada, 40% apresentavam algum comprometimento artrítico do joelho. Ainda, a degeneração osteoartrítica depois da meniscectomia tem sido descrita histologicamente por fibrilação, amolecimento, fissuras, proliferação

celular e eventualmente, necrose. Incluem-se também alterações bioquímicas como perda de proteoglicanas e desarranjo dessas, e em alguns casos, aumento da síntese.

Osteoartrite é associada à perda do equilíbrio entre a síntese e degradação de macromoléculas que proporciona a cartilagem articular com suas propriedades funcionais e biomecânicas (LOHMANDER, 1994).

As lesões parciais da cartilagem articular não cicatrizam, mas raramente estão associadas com problemas clínicos significantes. As lesões condrais que envolvem o osso subcondral podem ser preenchidas por uma fibrocartilagem, que apresenta características mecânicas e bioquímicas inferiores à cartilagem hialina. As lesões completas da cartilagem articular com áreas pequenas, podem ser preenchidas por fibrocartilagem e tornar o paciente assintomático, mas grandes lesões osteocondrais são menos prováveis de ter benefícios pela resposta cicatricial com a formação de fibrocartilagem e mais frequentemente resultam em dor e disfunção (ALFORD, COLE, 2005).

As terapias atuais da OA são amplamente sintomáticas, e focadas na diminuição da dor e melhora da função com analgésicos, antiinflamatórios não hormonais ou artroplastia. No entanto, novas intervenções estão sendo propostas para o tratamento desta afecção, que podem diminuir a taxa de degeneração articular. A sensibilidade e reprodutibilidade para monitorar a progressão da afecção, assim como o resultado para o paciente e para a articulação, nos ensaios de intervenção são críticos no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para OA (LOHMANDER, 1994).

O diagnóstico da OA só é realizado quando o paciente apresenta dor, disfunção, efusão e diminuição do espaço articular na radiografia, porém quando isto ocorre à lesão condral já esta evoluída. Para facilitar o diagnóstico precoce, monitorar a progressão da lesão e avaliar os tratamentos cirúrgicos e farmacológicos precisamos aprimorar as ferramentas utilizadas para os diagnósticos (LOHMANDER 1991, 1994).

### 3.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABDALLA , R.J.; COHEN, M.; SILVA, P.R.G.; FERRETI,M. Joelho: Diagnóstico e Tratamento. **In: Lesões nos Esportes**. 1.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

ALFORD, J.W; COLE, B.J. Carilage restoration, part 1. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 33, n. 2, p.295-306, 2005.

AMATUZZI, M.M. **Joelho: Articulação central dos Membros Inferiores**. 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2004.

ANDRADE, M. A. P.; BRANDÃO, L. S.; LEMOS, W. G. Fratura da eminência intercondiliana da tibia. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.32, n.6, p. 485-488, 1997.

ANDREWS et al. **Reabilitação Física das lesões desportivas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koojan, 2000.

BENN, C.; FORMAN, K.; MATHEWSON, D; TAPPLY, M.; TISKUS, S.; WHANG, K. et al. The effects of Serial Stretch Loading on Stretch Work and Stretch-Shorten Cycle Performance in the Knee Musculature. **The Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, Baltimore, v. 27, n. 6, p.412-422, 1998.

CAMPBELL, W. C. **Cirurgia ortopédica de Campbell**. 8ª ed. São Paulo: Manole, 1997, 2 v.

CARSONS, S.E & WOLF, J. Interaction between synoviocytes and extracelular matrix in vitro. **Ann Rheum Dis**. V.54, p. 413-416, 1995.

COHEN, M.; JÚNIOR, G. S. M. G.; EJNISMAN, B.; SEIXAS, M. T.; VICENZE, V. Estudo da vascularização do menisco humano. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.33, n.4, p.264-270, 1998.

DRECOLL, E. L.; ROHEN, J. W. **Atlas de Anatomia**. São Paulo: Manole, 1998. 152 p.

FAWTHROP, F. et al. A comparison of pathological and normal synovial fluids. **Br J Rheumatol**. v. 24, p. 61-69, 1985.

FELICE, J.C. et al. Elementos básicos de diagnóstico da Osteoartrite. **Temas de Reumatologia Clínica**. v. 3, p. 68-81, 2002.

FREEMONT, A.J. & DENTON, J. The cytology of synovial fluid. *In*: **Diagnostic Cytology**. New York: Churchill Livingstone Press, 1995. p. 887-898.

GOULD, J.A. **Fisioterapia na Ortopedia e na Medicina do Esporte**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1993.

GUERINO, M.R. **Efeitos da Fotoestimulação com laser no processo inflamatório crônico da cartilagem articular**. 2001. Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, Campinas.

HAAPALA, J. et al. Decline after immobilisation and recovery after remobilisation of synovial fluid IL1, TIMP, and chondroitin sulphate levels in young beagle dogs. **Ann Rheum.** v. 60, p.55-60, 2001.

HAZELL, K.P. et al. Changes in glycosaminoglycan epitope levels in knee joint fluid following injury. **Arthritis and Rheumatism.** v. 38, n. 7, p.953-959, 1995.

HEBERT, S.; XAVIER, R. **Ortopedia e traumatologia: Princípios e Prática.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

HOWARD, S.A. **Manual do residente em Ortopedia:** Uma sinopse para preparação aos exames de especialidade. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1995.

HUNTER, W. On the structure and diseases of articulating cartilage. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** v. 9, p.267, 1743.

HUZYKER, E.B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. **Osteoarthritis and Cart.** v. 10, p.432- 463, 2002.

IRRGANG, J.J; PEZZULLO, D. Rehabilitation following surgical procedures to address articular cartilage lesions in the knee. **JOSPT.** v. 28, p.232-240, 1998.

KAPANDJI, I. A. **Fisiologia articular – joelho.** 5ª ed. São Paulo: Manole, 1990, 2 v.

KRAUSE, R.; CAMANHO, G.; KRAUSE, M. Reconstrução do LCA: pré-tensionamento “in situ” do semitendíneo triplo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 33, n.5, p.363-367, 1998.

LEHMKUHL, L. D.; SMITH, L. K.; WEISS, E. L. **Cinesiologia Clínica de Brunnstrom**. 4ª ed. São Paulo: Manole, 1997, 538 p.

LEWIS, S. et al. Chondroitin sulphation patterns in synovial fluid in osteoarthritis subsets. **Ann Rheum Dis**. v. 58, p.441-445, 1999.

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.

LOHMANDER, L.S. Markers of cartilage metabolism in arthrosis. **Acta Orthop. Scand**. v. 62, n. 6, p. 623-632, 1991.

MALETIUS, M.D.; MESSNER,K. Eighteen to twenty-four-year follow-up after complete rupture of the anterior cruciate ligament. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 27, n. 6, p.711-17, 1999.

MATTIELLO-ROSA, S.M.G. **Influência do exercício na esteira na citologia do líquido sinovial e histologia da cartilagem articular em joelhos de coelhos**. 1999. Tese de Doutorado em Ciências- Patologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MATTIELLO-SVERZUT, A.C. 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.** v. 20, n. 1, p. 19-24, 2003.

MODA, A. S. **O uso de dinamômetro isocinético em judocas de nível competitivo com desarranjo articular interno nos joelhos.** São Paulo, 1999. 28 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Fisioterapia, Universidade Cidade de São Paulo.

MYERS, S.L.; BRANDT K.D.; ALBRECHT, M.E. **Synovial fluid glycosaminoglycan concentration does not correlate with severity of condropathy or predict progression of osteoarthritis in a canine cruciate deficiency model.** The Journal of Rheumatology, v. 27, n. 3, p.753-763, jul. 2000.

ODDIS, C.V. New Perspectives on Osteoarthritis. **The American Journal of Medicine**, v. 100, n. 2A, 1996.

ONI, O.O.A.; CROWDER, E. A comparison of isokinetics and muscle strength ratios following intra-articular and extra-articular reconstructions of the anterior cruciate ligament. **Injury.** v. 27, n. 3, p. 195-197, 1996.

ORTIZ, M.C.S. **Efeito do laser de baixa potência sobre o processo inflamatório articular de coelhos.** 2001. Tese de Mestrado em Fisioterapia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

PINTO, KNZ. **Avaliação da função muscular, cartilagem articular e citologia do líquido sinovial na ruptura completa do ligamento cruzado anterior**. 2004. Tese de Mestrado em Fisioterapia - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

PLATT, P.N. Examination of synovial fluid. **Clin Rheum Dis**. v. 9, p. 51-67, 1983.

ROOS, H. et al. Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. **Osteoarthritis Cartilage** v. 3, p.261-267, 1995.

RORVIK, A.M. & GRONDAHL, A.M. Markers of Osteoarthritis: A Review of the Literature. **Veterinary Surgery**. v. 24, p. 255-262, 1995.

SAMPAIO, T.C.F.V.S.; SOUZA, J.M.G.; FONSECA, E.A. Reabilitação do joelho pós sutura meniscal. **Rev Bras Ortop**. v. 28, n. 5, p. 295-298, 1993.

SHMERLING, R.H. Synovial fluid analysis. **Rheum Dis Clin North Am**. v. 20, p. 503-512, 1994.

SMILLIE, I.S. **Injuries of the Knee Joint**. 5. ed. London and Edinburg, London and New York: Churchill Livingstone, 1981.

SONODA, M. et al. The effects of Hyaluronan on the meniscus and on the articular cartilage after partial meniscectomy. **The American Journal of Sports Medicine**. v. 25, n. 6, p. 755-62, 1997.



SOUZA, J. M. G.; CALDAS, M. T. L.; LOPES, A. A. PINA, E. R. M.; MURTA, J. B. F. Lesão do ligamento cruzado posterior, associada a fratura do rebordo posterior da tíbia, simulando fratura-avulsão do LCP. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v.33, n.4, p.275-278, 1998.

STRAUSS, G.R. et al. Knee extensor strength 12 and 18 weeks post anterior cruciate ligament reconstruction. **Isokinetics and Exercise Science**. v. 7, p. 19-26, 1998.

TACANI, M. P. **Avaliação isocinética do equilíbrio muscular da articulação do joelho em bailarinos profissionais**. São Paulo, 1996. 57 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Fisioterapia, Universidade Cidade de São Paulo.

TASKIRAN, E; TASKIRAN, D; DURAN, T; LOK, V. Articular cartilage homeostasis alter anterior cruciate ligament reconstruction. **Knee**.v.6,p. 93-98, 1998.

**The Cartilage standart evaluation form/knee**. ICRS newsletter, spring 1998.

TIDERIUS, C. J; OLSSON, L .E; FREDRIK, L; DAHLBERG, L. Cartilage glycosaminoglycan loss in the acute phase after anterior cruciate ligament injury. **Arthritis Rheum**.v.52, p.120-127, 2005.

VANWANSEELE B, LUCCHINETTI E, STUSSI E. The effects of immobilization on characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions.

**Osteoarthritis and Cart**.v.10, p.408-419, 2002.

**Avaliação da concentração de glicosaminoglicanas sulfatadas no líquido sinovial em indivíduos com lesão condral.**

**P.F.A. Cintra Neto<sup>†</sup>, E.R. Pimentel<sup>‡</sup>, M. Cohen<sup>†\*</sup>, M.S. Peccin<sup>¶</sup>, R.N. Franco<sup>†</sup>, G.E.G. Lima<sup>†</sup> e S.M.G. Mattiello-Rosa<sup>†</sup>.**

**<sup>†</sup> Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.**

**<sup>‡</sup> Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.**

**<sup>†\*</sup> Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São Paulo, SP, Brasil.**

**<sup>¶</sup> Departamento de Fisioterapia, Instituto Cohen, São Paulo, SP, Brasil.**

**Palavras Chave:** Glicosaminoglicanas, osteoartrite, líquido sinovial, lesão condral, ligamento cruzado anterior e menisco.

S.M.G. Mattiello-Rosa

Departamento de Fisioterapia

UFSCar

13565-905 São Carlos, SP,

Brasil

Fax: + 55-16- 3361-2081

E-mail: stela@power.ufscar.br

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar a influência da concentração de glicosaminoglicanas sulfatadas (GAGs) no líquido sinovial de indivíduos portadores de lesões condrais isoladas ou associadas com lesões do ligamento cruzado anterior e dos meniscos, bem como uma associação com o tempo após a lesão e o grau de lesão condral.

**Desenho do estudo:** Foram selecionados 29 indivíduos adultos, com média de idade de  $38,3 \pm 10,9$  anos, sendo que destes 4 eram mulheres. Os sujeitos foram divididos em cinco grupos: grupo controle; grupo com lesão condral; grupo com lesão condral associada à lesão meniscal; grupo com lesão condral associada à lesão do ligamento cruzado anterior e grupo com lesão condral associado às lesões meniscal e do ligamento cruzado anterior.

**Métodos:** As amostras foram quantificadas em relação à concentração GAGs utilizando o corante azul de dimetilmetileno. O grau da lesão condral foi avaliado macroscopicamente, por artroscopia e graduado segundo classificação da *Internacional Cartilage Repair Society (ICRS)*.

**Resultados:** Foram encontradas diferenças significantes quando comparada à concentração de GAGs do grupo controle em relação aos outros grupos ( $P < 0,05$ ). Não houve diferenças significantes entre os grupos estudados quanto ao tempo após a lesão e o grau de lesão condral pelo ICRS. Foi encontrada forte correlação entre concentração de GAGs e o tempo pós lesão no grupo com lesão condral ( $r = -1$ ).

**Conclusão:** A lesão de estruturas articulares parece ser o fator determinante na alteração da concentração de GAGs presentes no líquido sinovial, sendo maior na lesão condral isolada. Esta quando associada à ruptura do ligamento cruzado anterior e ou a lesão meniscal, influencia uma tendência à queda, não apresentando ainda relação com o gênero, idade, tempo de lesão e o grau de lesão condral entre os grupos estudados.

## Introdução

A exata incidência das lesões condrais sintomáticas é pobremente definida na literatura e tem sido relatado que entre 5 a 10 % de pacientes jovens com hemoartrose do joelho, que sofreram um evento traumático específico, terão uma lesão condral focal<sup>1</sup>.

A osteoartrite (OA) é considerada como o resultado acumulativo de eventos mecânicos e biológicos que induzem um desequilíbrio entre a síntese e degradação das macromoléculas que fornecem a cartilagem articular suas propriedades biomecânicas e funcionais<sup>2</sup>.

A função e estrutura complexa da cartilagem articular normal podem ser alteradas, mesmo pelos menores traumas<sup>1</sup>.

A integridade do tecido cartilaginoso é dependente da complexa rede de colágeno tipo II, proteoglicanas e proteínas acessórias. As mudanças moleculares que estas moléculas sofrem são conseqüências de eventos de síntese e degradação, regulados por muitos fatores a nível celular e extracelular<sup>3</sup>. A rede de colágeno apresenta uma atividade metabólica relativamente inerte, visto que outros constituintes, como o complexo de aggrecan, submetem-se a um distinto processo de *turn over*, no qual a quebra metabólica e a remoção de moléculas da matriz extracelular estão equilibradas com a síntese e deposição de novas moléculas. Entretanto, no início e decorrer de afecções articulares degenerativas, como a OA, este equilíbrio metabólico é interrompido, com o aumento do catabolismo e da síntese de componentes da matriz pelos condrócitos<sup>4</sup>.

A perda da matriz extracelular na cartilagem está associada com o aumento da quebra ao longo do aggrecan, degradando pequenas proteoglicanas. A molécula de aggrecan é a principal componente proteoglicana por massa, composta por uma proteína

central ligada a muitas cadeias de glicosaminoglicanas sulfatadas (GAGs) de sulfato de condroitina e de sulfato de queratana. O aggrecan é estabilizado ao ácido hialurônico por uma proteína de ligação, formando o complexo de aggrecan. Perda de aggrecan através da degradação proteolítica, mediada pelas metaloproteinases e aggrecanases ativadas, causam perdas significantes nas propriedades mecânicas da cartilagem articular<sup>2</sup>.

A concentração de GAGs presente no líquido sinovial tem sido investigada em vários tipos de afecções articulares, sendo consideradas como marcadores articulares e podendo refletir o metabolismo do tecido articular em condições normais e patológicas<sup>5</sup>. As GAGs presentes no líquido sinovial são o ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de queratana. Estas GAGs apresentam um importante papel na lubrificação articular e nutrição cartilaginosa<sup>6</sup>.

Estudos experimentais utilizando modelos de OA têm demonstrado que imediatamente após o trauma se encontram mudanças nas características metabólicas, químicas e propriedades mecânicas da matriz antes do aparecimento de mudanças macroscópicas ou radiológicas<sup>7</sup>.

Alguns trabalhos têm mostrado que após a lesão de ligamentos e meniscos no joelho, ocorre um aumento da concentração do líquido sinovial em função da presença de macromoléculas e fragmentos de macromoléculas derivadas do processo destrutivo da matriz cartilaginosa. As mudanças macromoleculares no conteúdo do líquido sinovial podem ser observadas, já que as mesmas em condições normais estão praticamente ausentes<sup>8, 9, 10</sup>. A presença de GAGs, predominantemente sulfato de condroitina, parece refletir amplamente a degradação do aggrecan na cartilagem articular<sup>2</sup>.

Segundo Struglics et al (2005) somente um número limitado de estudos tem utilizado o líquido sinovial e a cartilagem articular humana, para caracterizar os fragmentos do aggrecan gerados na OA<sup>11</sup>.

Quando se busca correlacionar a concentração de GAGs com o tipo de lesão, como lesões condrais, meniscais ou ligamentares, a literatura é muito escassa. A maior parte dos estudos identificou uma grande dificuldade em isolar as lesões, meniscais, ligamentares ou condrais<sup>12, 13, 14, 15, 16</sup>. Os trabalhos normalmente são realizados com lesões associadas, principalmente às lesões meniscais<sup>12, 13, 14, 15</sup>.

Desconhecemos a presença de estudos que investiguem criteriosamente a participação das lesões condrais isoladas na concentração das GAGs presente no líquido sinovial. O isolamento das lesões condrais forneceria informações importantes, uma vez que se desconhece qual seria a contribuição que cada tecido e ou estrutura articular exerce na concentração de GAGs no líquido sinovial. O conhecimento da relação entre a presença de GAGs e tecidos lesados contribuiria também, com os estudos de doenças articulares, assim como o aparecimento e evolução da osteoartrite, especialmente a secundária<sup>15</sup>.

Desta forma, sabendo que as moléculas de GAGs são conhecidas como biomarcadores do metabolismo da cartilagem articular, podendo ser quantificadas e utilizadas como indicadoras das mudanças na homeostase da matriz cartilaginosa e, assim serem usadas como marcadores na progressão das doenças articulares<sup>13, 17, 15</sup>, o objetivo deste estudo foi analisar a influência da concentração de GAGs no líquido sinovial de indivíduos portadores de lesões condrais isoladas ou associadas com lesões do ligamento cruzado anterior e dos meniscos, bem como uma associação com o tempo após a lesão e o grau de lesão condral graduado segundo classificação da *Internacional Cartilage Repair Society (ICRS/2000)*<sup>18</sup>.

## Material e Métodos

O estudo incluiu 29 sujeitos de ambos os sexos e foram divididos em 5 grupos:

Grupo Controle (n=5): Composto por 4 sujeitos do sexo masculino, 1 sujeito do sexo feminino, com média de idade de  $24,4 \pm 0,5$  e que não apresentaram nenhum tipo de afecção no joelho;

Grupo Condral (n=4): Composto por 1 sujeito do sexo masculino, 3 sujeitos do sexo feminino, com média de idade de  $35,3 \pm 7,1$  e que apresentaram apenas lesão condral;

Grupo Condral+Menisco (n=8): Composto por 8 sujeitos do sexo masculino, média de idade de  $46,6 \pm 11,3$  e que apresentaram lesão condral associada à lesão meniscal, seja lateral, medial, ou lateral+medial;

Grupo Condral+LCA (n=4): Composto por 4 sujeitos do sexo masculino, média de idade de  $38,0 \pm 2,4$  e que apresentaram lesão condral associada à ruptura completa do ligamento cruzado anterior;

Grupo Condral+LCA+Menisco (n=8): Composto por 7 sujeitos do sexo masculino, 1 sujeito do sexo feminino, com média de idade de  $40,3 \pm 10,0$  Sujeitos que apresentaram lesão condral associada à ruptura completa do ligamento cruzado anterior e à lesão de meniscal, seja lateral, medial, ou lateral+medial.

Exceto o grupo controle, todos os sujeitos apresentaram lesão traumática do joelho envolvendo os tecidos de interesse neste estudo, com o tempo da lesão variando de 7 a 440 dias, em apenas um joelho. Todos os sujeitos com lesão no joelho realizaram exames clínicos e de imagem e tiveram indicação cirúrgica via artroscópica.

O grupo controle foi constituído por sujeitos que não apresentaram histórico de qualquer tipo de lesão osteomioarticular, confirmada por meio da avaliação clínica médica.

Foram excluídos os sujeitos que apresentaram: idade superior a 60 anos, alterações sistêmicas cardio-respiratórias e reumáticas; ausência de líquido sinovial durante a coleta; presença de lesão pregressa à atual, presença de qualquer doença osteomioarticular do membro inferior sadio relatadas pelos sujeitos, além de realização de infiltrações articulares e limitação na amplitude de movimento de 0 a 90 graus.

Para todos os pacientes foram preenchidas fichas de avaliação física previamente à coleta dos dados para assegurar os critérios de inclusão e exclusão. 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.

### **Aspiração do Líquido Sinovial**

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

Para o grupo controle foi realizado a tricotomia da face ântero-lateral do joelho esquerdo e após anestesia local, a punção foi realizada por um cirurgião ortopédico com a agulha inserida na região supra patelar lateral do joelho, e então, colhido o líquido da bolsa subquadripectal.

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



Posteriormente a cada coleta sinovial, o material foi congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  em freezer (Forma Scientific) até seu processamento e análise.

### **Avaliação Macroscópica da Cartilagem Articular**

Após a punção do líquido sinovial, durante o procedimento cirúrgico, via artroscopia, o aspecto macroscópico da superfície articular, da tróclea, da patela, dos côndilos femoral e tibial, dos meniscos medial e lateral e do LCA foram descritos pelo cirurgião.

Para determinar os níveis de lesão tecidual da cartilagem articular foi utilizada uma ficha de avaliação baseada na classificação histológica pertencente ao ICRS (*Internacional Cartilage Repair Society, 2000*)<sup>18</sup> 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 osteoartrite (escala de 0 a 4) encontrado em qualquer uma das regiões dos côndilos femoral, tibial, patela e tróclea. Para analisar o resultado da avaliação macroscópica da cartilagem articular foi utilizado o maior valor encontrado em cada sujeito, não levando em consideração, o tamanho da área e o número de focos.

### **Dosagem de Glicosaminoglicanas Sulfatadas**

A concentração de GAGs sulfatadas no líquido sinovial foi avaliada por meio de análise de absorvância após coloração das amostras com azul de dimetilmetileno (DMMB), utilizando o método descrito por Farndale et al, (1982)<sup>19</sup>. 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. Após, 100  $\mu$ l do sobrenadante da amostra foram digeridas em 100  $\mu$ 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 $\mu$ g por 1ml de líquido sinovial. Após incubação durante 24 horas à temperatura de 60° C, foi adicionado ácido iodoacético em uma concentração final de 10mM totalizando um volume de 22,2  $\mu$ l, que foram centrifugados durante 4 min a 12.000g. Ao sobrenadante e adicionamos 1 unidade de hialuronidase de estreptomicina. Após a incubação por 12 horas à temperatura de 37°C foram retirados 100  $\mu$ 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.

### **Análise Estatística**

Para análise dos dados foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e em seguida o teste Post-Hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ), entre grupos. Para determinar a correlação entre as variáveis de cada grupo, utilizamos o teste de correlação de Spearman.

## Resultados

A quantidade média de líquido sinovial aspirado foi de 5,9 ml  $\pm$  5,4 ml (variação 0.5-20 ml) (Tabela 1). Das punções realizadas, o líquido sinovial apresentou coloração amarelo cítrico e em alguns casos com presença de filetes de sangue devido à contaminação da amostra pela agulha utilizada na perfuração da pele para coleta do material.

**Tabela 1: Características dos grupos com relação as variáveis estudadas**

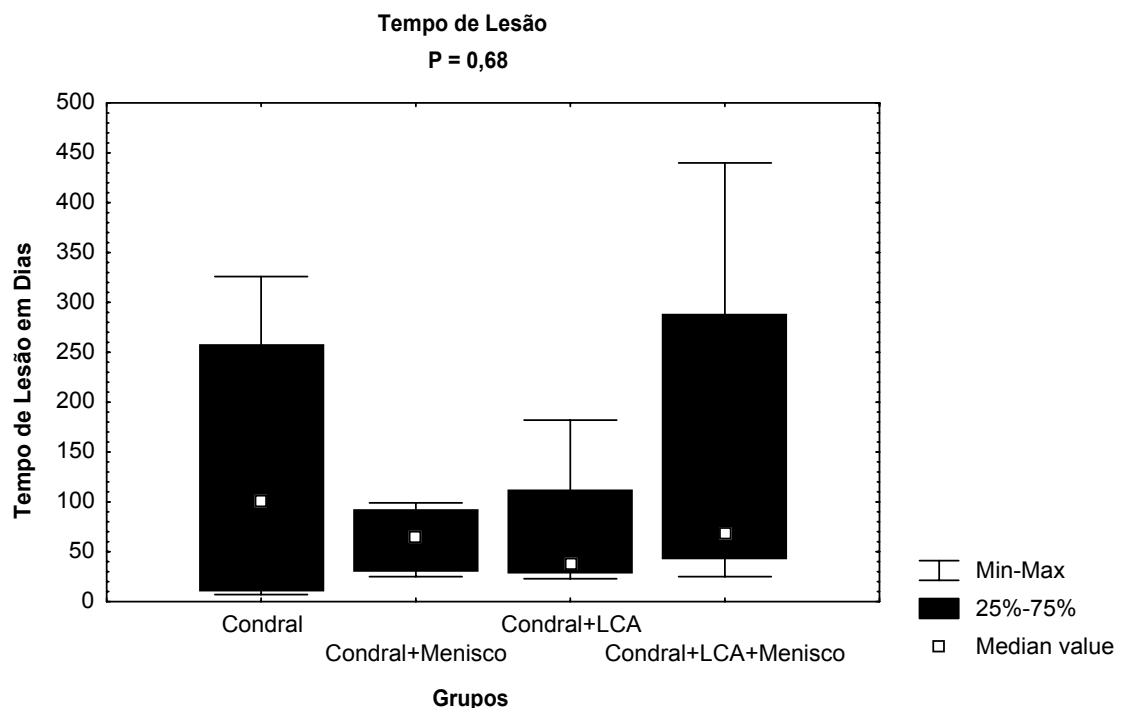
GRUPOS	SUJEITO /IDADE /SEXO	GRAU ICRS	VOLUME DE LS MI	[ ] GAGs $\mu$ g/ml	TEMPO DE LESÃO DIAS
CONTROLE	1 / 24 / H	-	0,5	17,8	0
	2 / 25 / H	-	0,4	11,2	0
	3 / 24 / H	-	4	64,8	0
	4 / 25 / M	-	4	49,7	0
	5 / 24 / H	-	3	65,4	0
CONDRAL	6 / 45 / H	4	6	184,3	326
	7 / 35 / M	2	3	209,6	189
	8 / 33 / M	4	20	316,3	13
	9 / 28 / M	3	6	398,8	7
CONDRAL + MENISCO	10 / 54 / H	4	12	109,04	29
	11 / 51 / H	3	3	132,9	25
	12 / 50 / H	3	1,5	346,1	99
	13 / 22 / H	2	5	220	39
	14 / 38 / H	3	4	194	93
	15 / 53 / H	3	0,5	314,8	91
	16 / 49 / H	4	0,5	129,3	90
CONDRAL + LCA	17 / 56 / H	3	10	220,1	32
	18 / 36 / H	2	2	170,9	182
	19 / 36 / H	3	4	145,8	23
	20 / 41 / H	3	20	178,1	34
CONDRAL + MENISCO + LCA	21 / 39 / H	3	10	138,8	42
	22 / 43 / H	2	15	48,9	25
	23 / 26 / H	3	3	170,9	327
	24 / 45 / H	4	6	179,2	249
	25 / 38 / H	2	11	252,7	58
	26 / 39 / H	3	3	161	74
	27 / 29 / M	3	7	180,7	27
	28 / 44 / H	4	3	82,6	62
29 / 58 / H	4	3,5	64,7	440	

H: homem; M: mulher.

A variação na concentração de GAGs encontrada no líquido sinovial entre cada grupo foi menor para o grupo controle como mostra a Tabela 1.

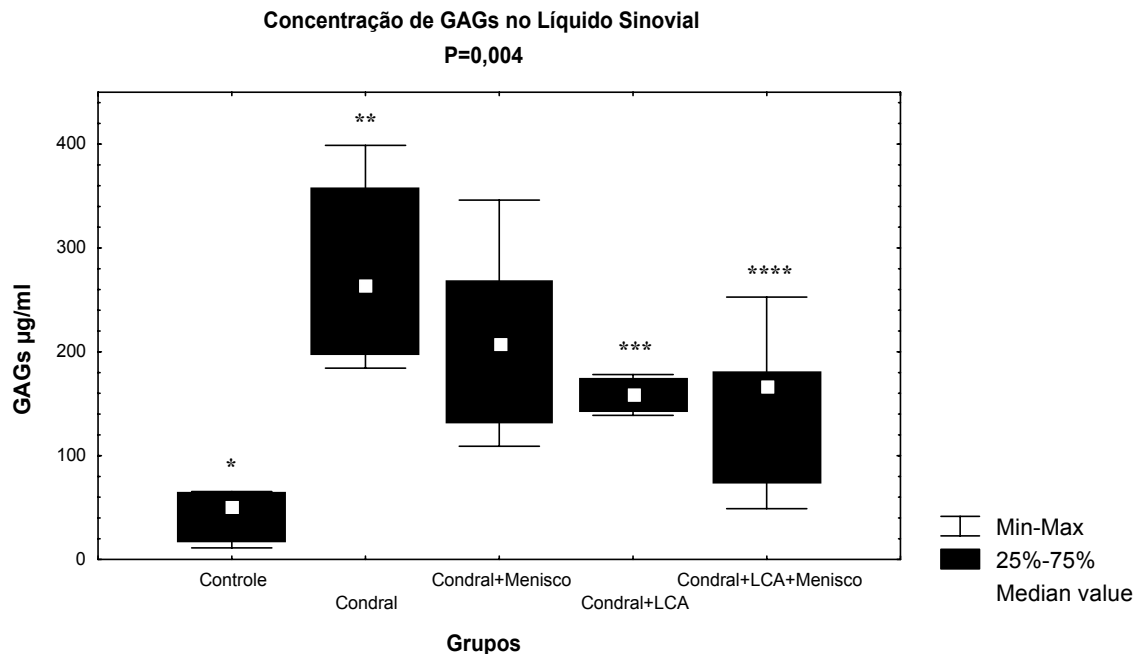
Não foram encontradas diferenças significantes ( $P>0,05$ ) entre as variáveis, idade, grau de lesão condral (ICRS) e o tempo de lesão entre grupos (Figura 1).

**Figura 1: Tempo de lesão em dias nos diferentes grupos estudados**



A concentração de GAGs encontrada no líquido sinovial do grupo controle em relação aos outros grupos estudados foi significativamente menor e como observada na Figura 2. Nas articulações lesadas, foi encontrada a menor concentração de GAGs no grupo Condral + LCA + Menisco, aproximando-se dos valores de GAGs do grupo controle, entretanto permaneceram significativamente elevadas ( $P<0,05$ ) em relação a este grupo. As maiores médias de concentrações foram observadas em articulações com menor número de estruturas articulares lesadas.

**Figura 2: Concentração de glicosaminoglicanas sulfatadas (GAGs) no líquido sinovial nos diferentes grupos estudados.**



\* Grupo Controle apresentou diferença estatística significativa para todos os grupos  $P < 0,05$ .

\*\* Grupo Condral apresentou diferença estatística significativa para os grupos: Controle, Condral + LCA e Condral + LCA + Menisco  $P < 0,05$ .

\*\*\* Grupo Condral + LCA apresentou diferença estatística significativa para os grupos: Controle e Condral  $P < 0,05$ .

\*\*\*\* Grupo Condral + LCA + Menisco apresentou diferença estatística significativa para os grupos: Controle e Condral  $P < 0,05$ .

A tabela 3 mostra as correlações encontradas entre as variáveis deste estudo. Foram observadas correlação significativa entre concentração GAGs e Tempo de Lesão para o grupo Condral, moderada correlação entre concentração GAGs e Tempo de Lesão no grupo Condral + Menisco e moderada correlação entre Grau de Lesão Condral e Tempo de Lesão no grupo Condral + LCA + Menisco

**Tabela 3: Resultados das correlações de Spearman intragrupos.**

<b>GRUPOS</b>	<b>CORRELAÇÃO</b>	<b>VALOR</b>
<b>Condral</b>	[ ] GAGs x Tempo de Lesão	r = -1 p = 0,00
<b>Condral + Menisco</b>	[ ] GAGs X Tempo Lesão	r = 0,67 p = 0,094
<b>Condral + LCA+ Menisco</b>	Grau de Lesão Condral X Tempo Lesão	r = 0,66 p = 0,106

[ ] : concentração

## Discussão

O presente estudo mostrou que existe variação nas concentrações de GAGs presentes líquido sinovial de acordo com o tipo e a quantidade de tecidos lesados em joelhos com lesão condral, ligamentar e ou meniscal.

É geralmente aceito que a liberação, principalmente de moléculas derivadas da matriz cartilaginosa, ou fragmentos (biomarcadores), para o líquido sinovial reflete o processo metabólico na cartilagem articular<sup>13</sup>. No entanto, a influência de uma série de fatores deve ser considerada para podermos avaliar a contribuição deles na concentração de moléculas presentes no líquido sinovial.

Nakayama et al (2002) relataram que a concentração de GAGs presente no líquido sinovial de sujeitos sem lesão, sofre uma queda com o avanço da idade, sendo menor em mulheres quando comparado com homens da mesma faixa etária<sup>5</sup>.

No presente estudo participaram vinte e nove indivíduos adultos, com média de idade de  $38,3 \pm 10,9$  anos e não foi encontrada diferença estatística significativa quanto à idade entre os grupos. A idade pareceu não ter influenciado a concentração de GAGs no líquido sinovial, uma vez que algumas amostras não confirmaram a influência da mesma. Os indivíduos com idade igual ou superior a cinquenta anos (sujeitos 10, 11, 12, 17 e 29, Tabela 1) apresentaram uma tendência de aumento na concentração de GAGs.

Com relação à influência do gênero na concentração de GAGs presente no líquido sinovial, encontramos neste estudo as maiores concentrações de GAGs no grupo condral, o qual apresentou o maior número de mulheres (Tabela 1).

Lohmander et al (1993) estudando a concentração de fragmentos de proteoglicanas presentes no líquido sinovial em sujeitos de ambos os gêneros, com OA no joelho e idade variando entre vinte e oito a sessenta e oito anos, não encontraram influência da idade e do sexo na concentração dos fragmentos de proteoglicanas presentes no líquido sinovial<sup>7</sup>. A



literatura mostra que a idade é um forte fator de risco para desenvolver OA, mas o mecanismo responsável ainda não está claro. A taxa de progressão da OA varia de paciente para paciente, até mesmo em grupos com a mesma idade e o mesmo tipo de lesão<sup>20</sup>.

Em nosso estudo os sujeitos apresentavam diferentes tempos de lesão, variando de 7 a 440 dias. Quando se buscou correlacionar a concentração de GAGs presente no líquido sinovial com os períodos agudo e crônico, não encontramos um consenso na literatura dos valores encontrados nas diferentes fases, entretanto existe uma tendência de se encontrar valores mais altos na fase aguda<sup>7, 20</sup>. Vários autores detectaram um aumento na quantidade dos anticorpos marcadores de sulfato de condroitina e na concentração total de GAGs em pacientes com lesão crônica do joelho, tendo estes valores permanecido aumentados por muitos anos após o trauma<sup>12, 21, 22</sup>. Um estudo analisando sujeitos apenas com lesão aguda do ligamento cruzado anterior, não encontraram correlação entre o tempo de lesão e o conteúdo de GAGs estimada na cartilagem articular<sup>13</sup>.

Em nosso trabalho não foi encontrada diferença estatística significativa do tempo de lesão entre os diferentes grupos estudados (Figura 1), porém houve uma forte correlação entre o tempo de lesão e a concentração de GAGs no grupo com lesão condral, com maior concentração nos estágios iniciais após o trauma. Entretanto, no grupo condral + menisco encontramos uma correlação moderada e inversa em relação a estas duas variáveis, com uma menor concentração nos estágios iniciais após o trauma.

Assim, os achados do presente estudo em relação ao gênero, idade e do tempo de lesão em indivíduos portadores de lesão condral nos indicam que a lesão em si possa ser o fator determinante na concentração de GAGs presentes no líquido sinovial, uma vez que não encontramos influência destas variáveis nos nossos resultados.

Dahlberg et al (1994) encontraram em seu estudo aumento do número de marcadores do metabolismo cartilaginoso no membro contralateral de sujeitos com afecções unilaterais, quando comparado com um grupo controle de sujeitos saudáveis, o que sugere que o membro contralateral não pode ser usado como controle<sup>23</sup>. Entretanto, existe uma grande dificuldade de investigar as concentrações de GAGs no líquido sinovial de joelhos não acometidos, principalmente pela dificuldade de puncionar o líquido sinovial nessas articulações. O mecanismo responsável pelas alterações, principalmente da concentração de GAGs no joelho contralateral ainda não foi elucidado, mas é possível que citocinas e produtos degradados da matriz sejam liberados da articulação acometida e possam ser transportados para outras articulações sadias através da circulação. Desta forma, estariam envolvidos no início precoce do processo patológico nas articulações sadias<sup>23</sup>. Além disso, há indícios de que a lesão unilateral do joelho pode alterar a biomecânica da marcha, promovendo cargas anormais no joelho contralateral, as quais induziriam alterações na cartilagem articular, alterando a concentração de GAGs no líquido sinovial<sup>12</sup>.

Considerando as influências sistêmicas, o presente estudo avaliou joelhos saudáveis como grupo controle. Os valores da concentração de GAGs deste grupo variaram entre 11,2 a 65,4 µg/ml, o que correspondeu aos achados de Belcher et al (1997) que encontraram valores de aproximadamente 50 a 150µg/ml<sup>24</sup>. Já Taskiran et al (1998), realizando a análise de GAGs no líquido sinovial de joelhos controles de voluntários sem lesão ligamentar, obtiveram um valor de normalidade de  $13,1 \pm 12,7\mu\text{g/ml}^{22}$ , porém a diferença nos valores de referência pode ser explicada pelas diferentes técnicas de quantificação de fragmentos de proteoglicanas no líquido sinovial. Portanto, podemos dizer que a concentração de GAGs encontradas em nosso grupo controle está de acordo com os valores encontrados na literatura, visto que os estudos que utilizaram a concentração de

GAGs presentes no líquido sinovial de sujeitos saudáveis como grupo controle, apresentaram valores menores em relação aos grupos de sujeitos com lesão.

Lohmander (1994) em uma revisão sobre cartilagem articular, descreveu que a concentração de fragmentos de proteoglicanas no líquido sinovial tem relação com o grau de OA, sendo maiores nos estágios iniciais em comparação aos estágios finais e maiores na fase aguda em relação à crônica<sup>20</sup>. No presente estudo foi avaliado o grau de lesão condral (ICRS) e não o grau de OA. Não encontramos diferença estatística significativa entre o grau de lesão condral (ICRS) nos diferentes grupos, o que nos leva novamente a acreditar que as diferenças encontradas na concentração de GAGs presente no líquido sinovial entre os grupos, se deva principalmente ao fato de outras estruturas lesadas como o menisco e o ligamento cruzado anterior.

Uesaka et al (2001) mediram a concentração de sulfato de condroitina, um tipo de GAGs, e encontraram um aumento nos valores de sulfato de condroitina nos estágios iniciais de OA e que tenderam a diminuir com o seu avanço, indicando uma possível relação inversa entre a concentração desse marcador e o grau de degeneração articular<sup>15</sup>.

Outros estudos também encontraram uma relação inversa entre o grau de OA e a concentração média de GAGs no líquido sinovial, sendo que o maior grau de degeneração cartilaginosa tendeu novamente a apresentar uma diminuição na concentração de proteoglicanas. Esta relação é provavelmente resultante da diminuição da quantidade de tecido cartilaginoso presente na articulação<sup>7, 13, 17, 15, 25</sup>. Entretanto, neste estudo foi observada diferença estatística entre e intra grupos quando se correlacionou grau de lesão condral (ICRS) e concentração de GAGs presente no líquido sinovial. Este resultado pode ser explicado pelo fato de termos trabalhado com grupos que apresentaram grau de lesão condral (ICRS) similares.

Embora as mudanças na composição do líquido sinovial tenham sido discutidas como se fossem principalmente da cartilagem articular, a contribuição de tecidos extrarticulares como meniscos, ligamento cruzado e sinóvia, não tem sido especulado adequadamente, uma vez que esses tecidos também apresentam proteoglicanas em sua matriz extracelular e seu metabolismo não está bem documentado<sup>26</sup>.

O processo da lesão cartilaginosa pode ocorrer devido a um trauma mecânico, iniciando a perda das proteoglicanas da matriz extracelular e uma ruptura na rede fibrilar colagenosa, seguido de migração dos condrócitos através dessa matriz. Os condrócitos ficam expostos a estímulos que alteram o seu comportamento metabólico. Essas células, sem a proteção da matriz, multiplicam-se no local da lesão e aumentam seu mecanismo de síntese, tentando uma regeneração. Essa tentativa é transitória, pois logo predomina a ação das proteases que iniciam, de modo progressivo, a degradação da cartilagem e morte celular. Com a degradação, fragmentos de proteoglicanas e de colágeno caem no líquido sinovial, indo alcançar a sinóvia. Esses fragmentos passam a agir como neo-antígenos a partir da exposição de determinadas seqüências de peptídeos. Eles geram efeito irritativo, estimulando sinoviócitos que passam a sintetizar citocinas catabólicas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ ). Essas vão interagir com condrócitos, estimulando ainda mais a produção de proteases. Há um aumento da degradação e cresce, proporcionalmente, a quantidade de fragmentos, que voltam a estimular as células sinoviais, fechando um ciclo que pode perpetuar o processo artrósico<sup>27, 28</sup>. Este mecanismo explica o aumento da concentração de GAGs no grupo condral, entretanto o mecanismo da manutenção de fragmentos no líquido ainda permanece obscuro. Os tecidos como ligamentos e meniscos quando lesados poderiam trazer informações moleculares diferentes uma vez que estes tecidos possuem aferências neuromusculares diferente do tecido cartilaginoso, contribuindo também no ciclo da osteoartrite.

Nakayama et al (2002) relatam que as dificuldades em interpretar fragmentos de proteoglicanas presentes no líquido sinovial se devem não somente ao fato das origens moleculares assim como dos diferentes tecidos presentes na articulação, mas também que o estágio clínico da afecção articular certamente tem um diferente efeito em cada tecido. Mais investigações são necessárias para se identificar à origem dos fragmentos de proteoglicanas presentes no líquido sinovial<sup>5</sup>. Acreditamos que com diferentes tipos de marcadores biológicos as afecções no tecido cartilaginoso possam ser acompanhadas e tratadas adequadamente.

**Conclusão**

Concluimos que a lesão de estruturas articulares parece ser o fator determinante na alteração da concentração de glicosaminoglicanas presentes no líquido sinovial, sendo maior na lesão condral isolada. Esta quando associada à ruptura do ligamento cruzado anterior e ou a lesão meniscal, influencia uma tendência à queda, não apresentando ainda relação com a o gênero, idade, tempo de lesão e o grau de lesão condral entre os grupos estudados.

## Referências

- 1- Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. *The American Journal of Sports Medicine* 2005; 33: 295-306.
- 2- Ishiguro N, Kojima T, Poole R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci* 2002; 65: 73 -84.
- 3- Bayliss MT, Osborne D, Woodhouse S, Davidson C. Sulfatation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. *J Biol Chemistry* 1999; 374: 15892 -15900.
- 4- Plaas AHK, West LA, Palms SW, Nelson FRT. Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis. *J Biol Chemistry* 1998; 273: 12642 -12649.
- 5- 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 and Rheumism* 2002; 46: 2105 -2108.
- 6- Nakayama Y, Shirai y, Mori A, Yoshiara K, Uesaka S. Evaluation of glycosaminoglycans levels in normal joint fluid of the knee. *J Nippon Med Sch* 2000; 67: 92 -95.
- 7- Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1993; 36: 181-189.
- 8- Martel-Pelletier J. Pathosiology of Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 1998; 6: 374-376.
- 9- Freemont AJ, Denton J. The cytology of synovial fluid. In: *Diagnostic Cytology*, Gray W, Ed. New York: Churchill Livingstone Press 1995: 887-898.
- 10- Rorvik AM, Grondahl AM. Markers of osteoarthritis: a review of the literature. *Veterinary Surgery* 1995; 24: 255-262.

- 11- Struglics A, Larsson S, Pratta MA, Kumar S, Lark MW, Lohmander LS. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006; 14: 101 -113.
- 12- Hazell PK, Dent C, Fairclough JA, Bayliss MT, Hardingham TE. Changes in glycosaminoglycan epitope levels in knee joint fluid following injury. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 953 -959.
- 13- Tiderius CJ, Olsson LE, Nyquist F, Dahlberg L. Cartilage glycosaminoglycan loss in the acute phase after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis and Rheumatism* 2005; 52:120-127.
- 14- Brenner SS, Klotz U, Alscher DM, Mais A, Lauer G, Schweer HN, et al. Osteoarthritis of the knee: clinical assessments and inflammatory markers. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004; 12: 469-475.
- 15- Uesaka S, Nakayama Y, Shirai Y, Yoshihara K. Serum and Synovial fluid levels of chondroitin sulfate in patients with osteoarthritis of the knee joint. *Journal Nippon Medical School* 2001; 68:165-170.
- 16- Bautre JC, Clayton MK, Chu Q, Johnson KA. Synovial fluid chondroitin sulphate epitopes 3B3 and 7D4, and glycosaminoglycan in human knee osteoarthritis after exercise. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:887-891.
- 17- 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. *The Journal of Rheumatology* 2000; 27: 753-763.
- 18- ICRS Document: Clinical cartilage injury evaluation system. January 2000.



- 19- Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 1982; 9: 247 -248.
- 20- Lohmander LS. Articular cartilage and osteoarthritis. The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. *J Anat* 1994; 184: 477-492.
- 21- Lohmander LS. Articular cartilage and osteoarthritis. The release of aggrecan fragments into synovial fluid after joint injury and in osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology* 1995; 22: 75-77.
- 22- Taskiran E, Taskiran D, Duran T, Lok V. Articular cartilage homeostasis after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surgery* 1998; 6: 93-98.
- 23- Dalhberg 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. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1994; 53: 823-827.
- 24- Belcher C, Yaqub R, Fawthrop F, Bayliss M, Doherty M. Synovial fluid chondroitin and keratin sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1997; 56: 299-307.
- 25- Dahlberg L, Ryd L, Heinegard D, Lohmander LS. Proteoglycan fragments in joint fluid: influence of arthrosis and inflammation. *Acta Orthop Scand* 1992; 63: 417-423.
- 26- Lewis S, Crossman M, Flannelly J, Belcher C, Doherty M, Bayliss MT. et al. Chondroitin sulphation patterns in synovial fluid in osteoarthritis subsets. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 441-445.
- 27- Felice JC, Costa LFC, Duarte DG, Chahade WH. Elementos básicos de diagnóstico da Osteoartrose. *Temas de Reumatologia Clínica* 2002; 3: 68-81.

28-Huziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress: A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; 10: 432-463.

**Evaluation of synovial fluid sulfated glycosaminoglycans concentration in subjects with chondral injury**

P.F.A. Cintra Neto<sup>1</sup>, E.R. Pimentel<sup>2</sup>, M. Cohen<sup>3</sup>, M.S. Peccin<sup>4</sup>, R.N. Franco<sup>5</sup>, G.E.G. Lima<sup>6</sup> and S.M.G. Mattiello-Rosa<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Physiotherapist, Department of Physiotherapy, Federal University of Sao Carlos, Sao Carlos (UFSCar) SP, Brazil

<sup>2</sup> Biologist, Department of Cell Biology, State University of Campinas, SP, Brazil.

<sup>3</sup> Physician, Department of Orthopedics and Traumatology, Federal University of Sao Paulo, SP, Brazil.

<sup>4</sup> Physiotherapist, Department of Physiotherapy, Cohen Institute, Sao Paulo, SP, Brazil.

<sup>5</sup> Physiotherapist, Department of Physiotherapy, UFSCar, SP, Brazil

<sup>6</sup> Physiotherapist, Department of Physiotherapy, UFSCar, SP, Brazil

<sup>7</sup> Physiotherapist, Department of Physiotherapy, UFSCar, SP, Brazil

**mail address**

S.M.G. Mattiello-Rosa  
Departamento de Fisioterapia  
UFSCar  
Sao Carlos, SP 13565-905  
Brazil  
Fax: +55 16 3361-2081

E-mail: stela@power.ufscar.br

**Abstract**

**Objective.** To evaluate the influence of sulfated glycosaminoglycan (GAG) concentration in synovial fluid from individuals with chondral injuries, either isolated or associated with anterior cruciate ligament injury or meniscal injury, and check for an association between time since injury and the degree of chondral injury. **Material and Method.** Twenty-nine adult subjects (25 men and 4 women, mean age  $38.3 \pm 10.9$  years) were selected. Samples obtained from all subjects were quantified to determine the GAG concentration using dimethylmethylene blue dye. The degree of chondral damage was macroscopically evaluated by arthroscopy and rated according to the *International Cartilage Repair Society* (ICRS) classification. **Results.** Significant differences were found concerning the GAG concentration in the control group compared with the other groups ( $p < 0.05$ ). No significant differences were found between the studied groups concerning time since injury and degree of chondral damage according to the ICRS. A strong correlation was found between GAG concentration and time since injury in the chondral injury group ( $r = -1$ ). **Conclusion.** Damage to articular structures seems to be the determining factor in the change of synovial fluid GAG concentration, being higher in isolated chondral injury. When associated with anterior cruciate ligament rupture and/or meniscal injury, it will promote a tendency to fall, and is not related to sex, age, time since injury and degree of chondral injury in all groups studied.

**Key words:** Glycosaminoglycans, Osteoarthritis, Synovial fluid, Chondral injury, Anterior Cruciate Ligament, Meniscus

**Running title:** Glycosaminoglycans in chondral injury

## **Introduction**

The precise incidence of symptomatic chondral injuries is poorly defined in literature and it has been reported that between 5 and 10 % of young patients with knee hemarthrosis who experienced a specific traumatic event will have a focal chondral injury <sup>1</sup>.

Osteoarthritis (OA) is considered the cumulative result of mechanical and biological events that induce unbalance between synthesis and degradation of macromolecules that provide the articular cartilage with its biomechanical and functional properties <sup>2</sup>.

Both the function and the complex structure of the normal articular cartilage can be altered even by minor traumas <sup>1</sup>.

Cartilage tissue integrity depends on the complex network of Type II collagen, proteoglycans and accessory proteins. The changes experienced at molecular level by these molecules are the consequence of synthesis and degradation events regulated by many factors both at the cellular and extracellular levels <sup>3</sup>. The collagen network has a relatively inert metabolic activity, since other components such as the aggrecan (large aggregating chondroitin sulfate proteoglycan) complex are subjected to a different turnover process where the metabolic breakdown and removal of molecules from the extracellular matrix are in equilibrium with the synthesis and deposition of new molecules. However, in the beginning and during degenerative articular affections such as OA, this metabolic balance is interrupted, with an increase in catabolism and synthesis of matrix components by chondrocytes <sup>4</sup>.

The loss of extracellular matrix in the cartilage is associated with the increase of breakdown along the aggrecan, when small proteoglycans are degraded. The aggrecan molecule is the major proteoglycan component in terms of mass, consisting of a central

protein linked to several chains of sulfated glycosaminoglycans chondroitin sulfate and keratin sulfate. Aggrecan binds to hyaluronic acid by means of a binding protein to form the aggrecan complex. The loss of aggrecan by proteolytic degradation mediated by metalloproteinases and activated aggrecanases significantly impair the mechanical properties of the articular cartilage <sup>2</sup>.

Synovial fluid GAG concentration has been investigated in different kinds of articular affections; they are considered articular markers and can reflect the metabolism of the articular tissue under normal and pathological conditions <sup>5</sup>. The GAGs present in the synovial fluid include hyaluronic acid, chondroitin sulfate and keratin sulfate. These GAGs play an important role in the articular lubrication and cartilage nutrition <sup>6</sup>.

Experimental studies using OA models have shown that immediately after the trauma changes are noticed in the metabolic, chemical and mechanical characteristics of the matrix, prior to the onset of macroscopic or radiological changes <sup>7</sup>.

Several studies have shown that after knee ligament and meniscal injuries there is an increase in the concentration of synovial fluid as a function of the presence of macromolecules and fragments of macromolecules derived from the destructive process of the cartilage matrix. Macromolecular changes in the contents of synovial fluid can be observed, since they are virtually absent under normal conditions <sup>8,9,10</sup>. The presence of GAGs, predominantly chondroitin sulfate, seems to widely reflect the degradation of aggrecan in the articular cartilage <sup>2</sup>.

According to Struglics *et al* (2005) only a limited number of studies have used synovial fluid and human articular cartilage to characterize the fragments of aggrecan generated in OA <sup>11</sup>.

When one searches for a correlation between GAG concentration and the type of injury such as chondral, meniscal or ligament injuries, medical literature is rather scarce

and most studies identified great difficulty to isolate meniscal, ligament or chondral injuries <sup>12,13,14,15,16</sup>. Usually, trials are performed on injuries that associated mainly to meniscal injuries <sup>12,13,14,15</sup>.

The existence of studies judiciously investigating the relationship between chondral injuries and synovial fluid GAG concentration is unknown to us. Isolation of chondral injuries would provide important information, because the contribution from each articular tissue and/or structure to synovial fluid GAG concentration is not known. Also, the knowledge of the relationship between the presence of GAGs and damaged tissues would be useful to study articular diseases, as well as the onset and evolution of osteoarthritis, particularly secondary OA <sup>15</sup>.

Thus, since GAG molecules are well know biomarkers for the metabolism of the articular cartilage and can be quantified and used as indicators for changes in the homeostasis of the cartilage matrix and, therefore, be used as markers in the progression of articular diseases <sup>13,17,15</sup>, the objective of this study was to analyze the impact of synovial fluid GAG concentration in subjects with chondral injuries, either isolated or associated with ACL injuries and meniscal injuries, as well as a possible association with the time since injury and the grade of chondral injury scored according to the *International Cartilage Repair Society (ICRS/2000)* classification <sup>18</sup>.

## Material and Methods

This study admitted 29 subjects of both sexes distributed into 5 groups, as follows.

The Control group (n=5) included 4 male and 1 female subjects (mean age  $24.4 \pm 0.5$  years) with no knee affections of any kind.

The Chondral group (n=4) included 1 male and 3 female subjects (mean age  $35.3 \pm 7.1$  years) with chondral injury only.

The Chondral + Meniscal group (n=8) included 8 male subjects (mean age  $46.6 \pm 11.3$  years) with chondral injury associated with either lateral, medial or lateral+medial injury.

The Chondral + ACL group (n=4) included 4 male subjects (mean age  $38.0 \pm 2.4$  years) with chondral injury associated with full rupture of the anterior cruciate ligament.

The Chondral + ACL + Meniscal group (n=8) included 7 male and 1 female subjects (mean age  $40.3 \pm 10.0$  years) with chondral injury associated with full rupture of the anterior cruciate ligament and with either lateral, medial or lateral+medial meniscal injury.

Except for the control group, all subjects presented with traumatic knee injury involving the tissues of interest in this study, with the time since injury ranging from 7 to 440 days, in one knee only. All subjects with knee injuries underwent clinical and imaging evaluations and had surgical indication by arthroscopy.

The control group included subjects whose histories showed no osteomyoarticular injuries of any kind confirmed through clinical evaluation.

Subjects over 60 years of age, presenting cardiorespiratory and rheumatic systemic alterations; absence of synovial fluid at the time of collection, presence of injury previous to the current injury, presence of any osteomyoarticular disease of the



healthy lower limb as reported by the subjects, besides articular infiltrations and restriction in the 0-90 degree ROM were excluded from the study.

All patients had individual physical evaluation records filled out before data collection in order to ensure that inclusion and exclusion criteria were met. The volunteers signed individual informed consent forms as required by Resolution 196/96 issued by the *National Health Committee*. The Ethics Committee of the Federal University of Sao Carlos approved the study design.

### **Synovial Fluid Aspiration**

The synovial fluid was collected from the injured knee by puncture performed prior to surgery. This procedure included trichotomy of the anterior-lateral face of the injured knee and, after anesthetizing the subject, the surgeon performed the puncture with the needle inserted into the lateral suprapatellar region of the knee, after which the fluid from the subquadriceps bursa was collected.

The control group underwent trichotomy of the left knee anterior-lateral face and, after local anesthetics, an orthopedic surgeon performed the puncture with the needle inserted into the suprapatellar region of the knee, after which the fluid from the subquadriceps bursa was collected.

All fluids were quantified for their net volume and divided into three samples for storage.

After each collection of synovial fluid the material was frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  and kept in the freezer (Forma Scientific) until processed and analyzed.

### **Macroscopic Evaluation of the Articular Cartilage**

During the surgical arthroscopic procedure, once the synovial fluid was punctured, the surgeon described the macroscopic aspects of the articular surface, trochlea, patella, femoral and tibial condyli, medial and lateral menisci, and ACL.

To determine the levels of tissue damage to the articular cartilage we used an evaluation record based on the ICRS (*International Cartilage Repair Society, 2000*) histological classification<sup>18</sup> as described below.

Grade 0: normal cartilage

Grade 1: fibrillation, surface irregularities and crevices

Grade 2: surface irregularities and crevices with depths below 50% of the cartilage

Grade 3: surface irregularities and crevices with depths above 50% of the cartilage

Grade 4: deep crevices reaching the subchondral bone

The grade of tissue damage was defined using the "maximum score" parameter represented by the highest grade of osteoarthritis (on a 0 to 4 scale) found in any one of the femoral condyli, tibial, patellar and trochlear regions. To analyze the result of the macroscopic evaluation of the articular cartilage we used the highest value found in each subject without taking into consideration the dimensions of the area and the number of foci.

### **Quantification of Sulfated Glycosaminoglycans**

Synovial fluid sulfated GAG concentration was evaluated by measuring the absorbance of samples that were previously stained with dimethylmethylene blue (DMMB) using the method described by Farndale *et al* (1982)<sup>19</sup>. We chose to use the spectrophotometric method combined with reagent DMMB because it is simple and particularly specific for quantification of sulfated GAGs present in body tissues and fluids.

Samples of synovial fluid were centrifuged at 14,000 g for 15 minutes. Then 100  $\mu$ l of the sample supernatant were digested in 100  $\mu$ l of 0.4 M acetate buffer (pH 5.8) containing 10 mmol of EDTA; immediately before use, 20 mmol of N-acetylcysteine and papain were added in the proportion of 300  $\mu$ g per ml of synovial fluid. Following a 24-hour incubation at 60°C, iodoacetic acid was added with final concentration of 10 mmol, totaling a 22.2  $\mu$ l volume that was centrifuged for 4 minutes at 12,000 g. To the supernatant we added 1 unit of *Streptomyces* hyaluronidase. After a 12-hour incubation at 37°C, a volume of 100  $\mu$ l was withdrawn. Once the sample was ready to be quantified, 2.5 ml of DMMB reagent solution were added and, after a few seconds, the absorbance was measured at  $\lambda=526$  nm using a spectrophotometer.

To determine the GAG concentration we used chondroitin sulfate solutions of known concentrations.

**Statistical Analysis**

For the data analysis we used Kruskal-Wallis' non-parametric method followed by Newman-Keuls' post-hoc test ( $p < 0.05$ ) between groups. To determine the correlation between the variables of each group we used Spearman's correlation test.

## Results

The average volume of aspirated synovial fluid was 5.9 ml  $\pm$  5.4 ml (between 0.5 and 20 ml) (Table 1). The synovial fluid punctured was citrine yellow in color, showing in a few cases blood filaments due to contamination of sample by the needle used to puncture the skin to collect material.

**Table 1: Characteristics of groups concerning the variables studied**

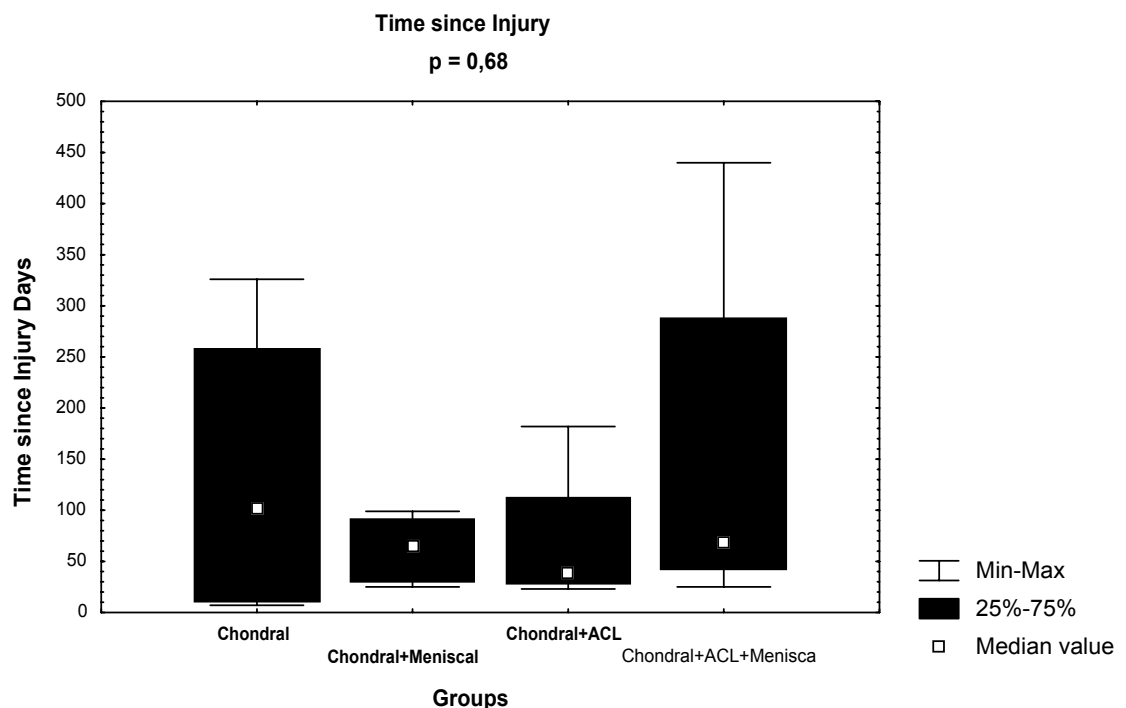
Group	Subject / Age / Sex	ICRS grade	Volume of synovial fluid (ml)	GAG conc. ( $\mu$ g/ml)	Time since injury (days)
CONTROL	1 / 24 / M	-	0.5	17.8	0
	2 / 25 / M	-	0.4	11.2	0
	3 / 24 / M	-	4	64.8	0
	4 / 25 / F	-	4	49.7	0
	5 / 24 / M	-	3	65.4	0
CHONDRAL	6 / 45 / M	4	6	184.3	326
	7 / 35 / F	2	3	209.6	189
	8 / 33 / F	4	20	316.3	13
	9 / 28 / F	3	6	398.8	7
CHONDRAL + MENISCAL	10 / 54 / M	4	12	109.04	29
	11 / 51 / M	3	3	132.9	25
	12 / 50 / M	3	1.5	346.1	99
	13 / 22 / M	2	5	220	39
	14 / 38 / M	3	4	194	93
	15 / 53 / M	3	0.5	314.8	91
	16 / 49 / M	4	0.5	129.3	90
	17 / 56 / M	3	10	220.1	32
CHONDRAL + ACL	18 / 36 / M	2	2	170.9	182
	19 / 36 / M	3	4	145.8	23
	20 / 41 / M	3	20	178.1	34
	21 / 39 / M	3	10	138.8	42
CHONDRAL + MENISCAL + ACL	22 / 43 / M	2	15	48.9	25
	23 / 26 / M	3	3	170.9	327
	24 / 45 / M	4	6	179.2	249
	25 / 38 / M	2	11	252.7	58
	26 / 39 / M	3	3	161	74
	27 / 29 / F	3	7	180.7	27
	28 / 44 / M	4	3	82.6	62
	29 / 58 / M	4	3.5	64.7	440

M: male; F: female

The smallest variation in GAG concentration found in the synovial fluid when comparing all groups was found in the control group, as shown in Table 1.

No significant differences were found ( $p>0.05$ ) among the variables age, chondral injury score (ICRS) and time since injury between groups (Figure 1).

**Figure 1. Time Since Injury (days) for the Different Groups**



The GAG concentration found in the synovial fluid was significantly lower in the control group compared to the other groups, as shown in Figure 2. The injured joints showed the lowest GAG concentration in the Chondral + ACL + Meniscal group, with values close to those of the GAG concentrations in the control group, although they remained significantly elevated ( $p<0.05$ ) compared to the control group. The highest mean values of GAG concentration were observed in joints with smaller numbers of injured articular structures.

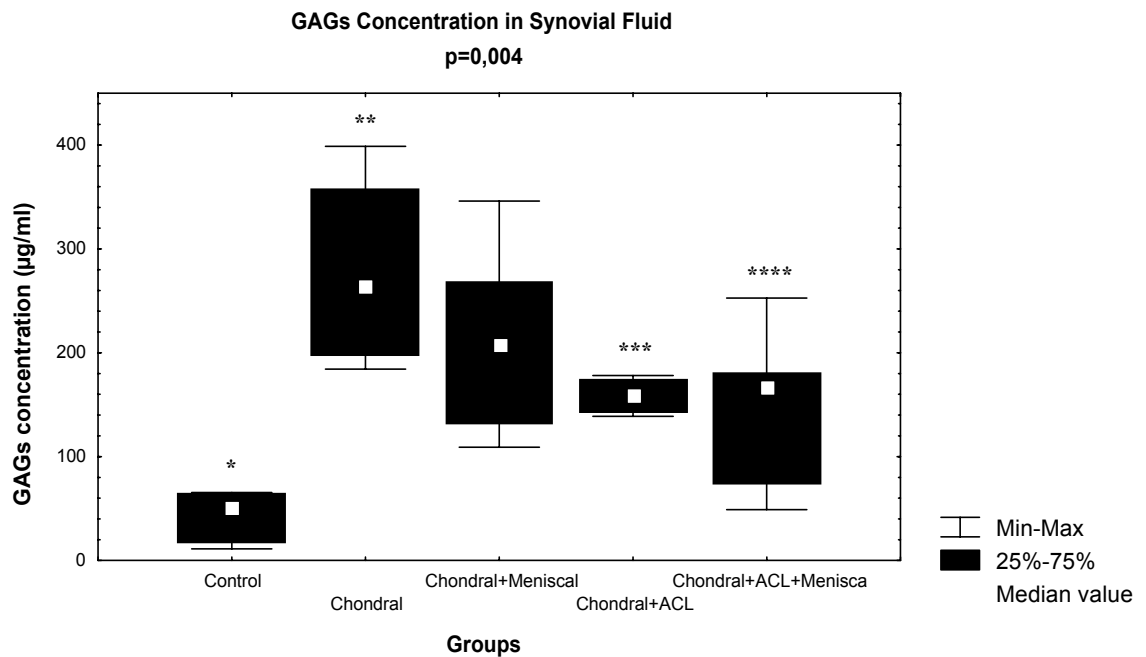
**Figure 2. Synovial fluid GAG concentration in the different groups**

Table 3 shows the correlations found among the variables in this study. Significant correlation was observed between GAG concentration and time since injury for the chondral group, moderate correlation between GAG concentration and time since injury for the chondral + meniscal group and moderate correlation between grade of chondral injury and time since injury for the chondral + ACL + meniscal group.

**Table 2. Results using Spearman's correlation in each group**

Group	Correlation	Value
<b>Chondral</b>	GAG concentration and Time since injury	$r = -1$ $p=0.00$
<b>Chondral + Meniscal</b>	GAG concentration and Time since injury	$r = 0.67$ $p=0.094$
<b>Chondral + ACL + Meniscal</b>	Chondral injury score and Time since injury	$r = 0.66$ $p=0.106$

## Discussion

The present study has shown the existence of variation in the synovial fluid GAG concentration according to the type and amount of damaged tissues in knees with chondral, ligament and/or meniscal injuries.

It is generally accepted that the release, mainly of cartilage matrix-derived molecules, or fragments (biomarkers), to the synovial fluid reflects the metabolic process in the articular cartilage<sup>13</sup>. However, the influence of a series of factors must be considered in order to evaluate their contribution to the concentration of molecules present in the synovial fluid.

Nakayama *et al* (2002) reported that the synovial fluid GAG concentration of subjects without injuries decreases with age and is lower in women than in men in the same age range<sup>5</sup>.

The present study involved 29 adult subjects (mean age  $38.3 \pm 10.9$  years) and no statistically significant difference was found concerning age between groups. Age seems not to have influenced the synovial fluid GAG concentration, since some samples did not confirm its influence. Individuals aged 50 years and over (Subjects 10, 11, 12, 17 and 29, Table 1) had a tendency to increase the GAG concentration.

Concerning the influence of sex in synovial fluid GAG concentration, we found in this study the highest GAG concentrations in the chondral group, that also had the largest number of women (Table 1).

Lohmander *et al* (1993) studied the concentration of fragments of proteoglycans in the synovial fluid of subjects of both sexes with knee OA in the 28-60 year age range and did not notice any influence of age and sex on the concentration of fragments of proteoglycans in the synovial fluid<sup>7</sup>. Literature shows that age is a strong risk factor for osteoarthritis, although the mechanism responsible for it is not yet clear. The



progression rate of OA varies from patient to patient, even in groups of the same age range and with the same type of injury<sup>20</sup>.

The subjects in our study had different times since injury (between 7 and 440 days). As we tried to correlate the synovial fluid GAG concentration with acute and chronic periods, it was not possible to find in the literature any consensus regarding the values found in the different phases. However, there is a trend towards higher values in the acute phase<sup>7,20</sup>. Several authors reported an increase in the amount of antibodies that are chondroitin sulfate markers, as well as in the total GAG concentration in patients with chronic knee injury, and these values remained elevated for many years after the trauma<sup>12,21,22</sup>. A study that analyzed subjects presenting with acute ACL injury only found no correlation between the time since injury and the estimated amount of GAGs in the articular cartilage<sup>13</sup>.

In our study no statistically significant differences were found in the time since injury between the different groups studied (Figure 1), although there was strong correlation between the time since injury and GAG concentration in the chondral injury group, with higher concentration in the early stages after the trauma. However, in the chondral + meniscal group we found a moderate reverse correlation in relation to these two variables and lower concentration in the early stages after the trauma.

Thus, the findings of the present study concerning sex, age and time since injury in subjects with chondral injury indicate that injury alone may be the determining factor in synovial fluid GAG concentration, since our results have not shown any influence from these variables.

A study by Dahlberg *et al* (1994) showed an increase in the number of markers for the cartilage metabolism in the contralateral limb of subjects with unilateral affections when compared to a control group of healthy subjects, suggesting that the

contralateral limb cannot be used as the control <sup>23</sup>. However, it is very difficult to investigate GAG concentrations in the synovial fluid of non-affected knees, mainly because it is difficult to puncture synovial fluid from these joints. The mechanism responsible for the changes in the contralateral knee, mainly concerning the GAG concentration, is not yet explained, although it is possible that cytokines and products degraded from the matrix are released from the affected joint, and can be carried to other healthy joints through the bloodstream. Therefore, they would be involved in the early onset of the pathological process in healthy joints <sup>23</sup>. Additionally, there is evidence that unilateral knee injuries can alter the gait biomechanics by promoting on the contralateral knee abnormal loads that would induce changes in the articular cartilage and alter the synovial fluid GAG concentration <sup>12</sup>.

Considering the systemic influences, the present study has evaluated healthy knees as the control group. In this group, the values of GAG concentration ranged from 11.2 to 65.4  $\mu\text{g/ml}$ , which agrees with the findings of Belcher *et al* (1997) who found values of approximately 50 - 150  $\mu\text{g/ml}$  <sup>24</sup>. Taskiran *et al* (1998), on the other hand, analyzed the synovial fluid GAG concentration of control knees from volunteers without ligament injury and found a normality value of  $13.1 \pm 12.7 \mu\text{g/ml}$  <sup>22</sup>, but the difference in the reference values can be explained by the different techniques used to quantify fragments of proteoglycans in the synovial fluid. Therefore, it is possible to say that the GAG concentration found in our control group agrees with the values found in literature, since the studies on GAG concentration in synovial fluid using healthy subjects as controls showed values that were lower compared to those found in the groups of subjects with injuries.

In a review about articular cartilage, Lohmander (1994) described that the concentration of proteoglycan fragments in the synovial fluid is related to the grade of

OA and is higher in the early stages compared to the end stages, and higher during the acute phase compared to the chronic phase<sup>20</sup>. In the present study we evaluated the grade of chondral injury according to the ICRS classification, not the grade of osteoarthritis. No statistically significant difference was found in this study between the grade of chondral injury (ICRS) in the different groups, which leads us again to believe that the differences found in the synovial fluid GAG concentration between groups is due mainly to the existence of other injured structures, such as meniscal and ACL injuries.

Uesaka *et al* (2001) measured the concentration of chondroitin sulfate, which is a type of GAG, and found an increase in the chondroitin sulfate values during the early OA stages, that tended to decrease with its progression, indicating a possible inverse relationship between the concentration of this marker and the grade of articular degeneration<sup>15</sup>.

Other studies also found an inverse relationship between the grade of OA and the average synovial fluid GAG concentration, and the highest degree of cartilage degeneration tended again to show a decrease in proteoglycan concentration. This relationship is probably due to the decrease in the amount of cartilage tissue in the joint<sup>7,13,17,15,25</sup>. However, in our study we observed statistically significant differences in the groups and between groups when we correlated the degree of chondral injury (ICRS) and the synovial fluid GAG concentration. This finding can be explained by the fact that we worked with groups with similar ICRS degrees of chondral injuries.

Although the changes in composition of the synovial fluid were discussed as if they were mainly changes in the articular cartilage, the involvement of extra-articular tissues such as those of the meniscus, ACL and synovia were not appropriately

investigated, since these tissues also have proteoglycans in their extracellular matrix and their metabolism is not well documented<sup>26</sup>.

The cartilage injury process can occur due to mechanical trauma, starting the loss of proteoglycans from the extracellular matrix and a rupture in the collagen fibrillar network followed by migration of chondrocytes through this matrix. The chondrocytes are exposed to stimuli that will alter their metabolic performance. Without the protection of the matrix, these cells will multiply themselves in the injury site and increase their synthesis mechanism, in an attempt to regenerate. This is a transient attempt, since the action of the proteases that progressively start the cartilage degradation and cell death will soon prevail. With the degradation, fragments of proteoglycans and collagen will fall into the synovial fluid and reach the synovia. These fragments start acting as neoantigens after exposure of certain sequences of peptides. They generate an irritating effect by stimulating synoviocytes that start synthesizing catabolic cytokines such as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ . These cytokines will interact with chondrocytes and stimulate even further the production of proteases. More degradation will occur and the amount of fragments will increase in proportion; these fragments start stimulating again the synovial cells, closing a cycle that can perpetuate the arthritic process<sup>27,28</sup>. This mechanism explains the increase of GAG concentration in the chondral group, although the mechanism of persistence of fragments in the fluid still remains obscure. If injured, tissues such as those of ligaments and menisci could bring different molecular information, since their neuromuscular afferences are different from those of the cartilage tissue and are involved also in the osteoarthritis cycle.

Nakayama *et al* (2002) reported that the difficulties to interpret fragments of proteoglycans in the synovial fluid are due not only due to their molecular origin and the different tissues in the joint, but also to the fact that the clinical stage of the articular

affection certainly has a different effect on each tissue. More investigation is required to identify the origin of the synovial fluid proteoglycan fragments<sup>5</sup>. We believe that using different types of biological markers will allow one to properly monitor and treat affections of the cartilage tissue.

## **Conclusion**

We reached the conclusion that damage in articular structures seems to be the determining factor in the change of concentration of glycosaminoglycans in the synovial fluid, being higher in isolated chondral injuries. When associated with rupture of the anterior cruciate ligament and/or to meniscal injury, chondral injuries influence a tendency to decrease and are not related to sex, age, time since injury and degree of chondral injury among the groups studied.

## References

- 29-Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. *The American Journal of Sports Medicine* 2005;33:295-306.
- 30-Ishiguro N, Kojima T, Poole R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci* 2002;65:73-84.
- 31-Bayliss MT, Osborne D, Woodhouse S, Davidson C. Sulfatation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. *J Biol Chemistry* 1999;374:15892-900.
- 32-Plaas AHK, West LA, Palms SW, Nelson FRT. Glycosaminoglycan sulfation in human osteoarthritis. *J Biol Chemistry* 1998;273:12642-9.
- 33-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 and Rheumatism* 2002;46:2105-8.
- 34-Nakayama Y, Shirai Y, Mori A, Yoshiara K, Uesaka S. Evaluation of glycosaminoglycans levels in normal joint fluid of the knee. *J Nippon Med Sch* 2000;67:92-5.
- 35-Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1993;36:181-9.
- 36-Martel-Pelletier J. Pathophysiology of Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 1998;6:374-6.
- 37-Freemont AJ, Denton J. The cytology of synovial fluid. In: *Diagnostic Cytology*, Gray W, Ed. New York: Churchill Livingstone Press 1995:887-98.
- 38-Rorvik AM, Grondahl AM. Markers of osteoarthritis: a review of the literature. *Veterinary Surgery* 1995;24:255-62.

- 39- Struglics A, Larsson S, Pratta MA, Kumar S, Lark MW, Lohmander LS. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006;14:101-13.
- 40- Hazell PK, Dent C, Fairclough JA, Bayliss MT, Hardingham TE. Changes in glycosaminoglycan epitope levels in knee joint fluid following injury. *Arthritis Rheum* 1995;38:953-9.
- 41- Tiderius CJ, Olsson LE, Nyquist F, Dahlberg L. Cartilage glycosaminoglycan loss in the acute phase after anterior cruciate ligament injury. *Arthritis and Rheumatism* 2005;52:120-7.
- 42- Brenner SS, Klotz U, Alscher DM, Mais A, Lauer G, Schweer HN, *et al.* Osteoarthritis of the knee: clinical assessments and inflammatory markers. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004;12:469-75.
- 43- Uesaka S, Nakayama Y, Shirai Y, Yoshihara K. Serum and Synovial fluid levels of chondroitin sulfate in patients with osteoarthritis of the knee joint. *Journal Nippon Medical School* 2001;68:165-70.
- 44- Bautoch JC, Clayton MK, Chu Q, Johnson KA. Synovial fluid chondroitin sulfate epitopes 3B3 and 7D4, and glycosaminoglycan in human knee osteoarthritis after exercise. *Ann Rheum Dis* 2000;59:887-91.
- 45- 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. *The Journal of Rheumatology* 2000;27:753-63.
- 46- ICRS Document: Clinical cartilage injury evaluation system. January 2000.



- 47-Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 1982;9:247-8.
- 48-Lohmander LS. Articular cartilage and osteoarthritis. The role of molecular markers to monitor breakdown, repair and disease. *J Anat* 1994;184:477-92.
- 49-Lohmander LS. Articular cartilage and osteoarthritis. The release of aggrecan fragments into synovial fluid after joint injury and in osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology* 1995;22:75-7.
- 50-Taskiran E, Taskiran D, Duran T, Lok V. Articular cartilage homeostasis after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surgery* 1998;6:93-8.
- 51-Dahlberg 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. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1994;53:823-7.
- 52-Belcher C, Yaqub R, Fawthrop F, Bayliss M, Doherty M. Synovial fluid chondroitin and keratin sulfate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1997;56:299-307.
- 53-Dahlberg L, Ryd L, Heinegard D, Lohmander LS. Proteoglycan fragments in joint fluid: influence of arthrosis and inflammation. *Acta Orthop Scand* 1992;63:417-23.
- 54-Lewis S, Crossman M, Flannelly J, Belcher C, Doherty M, Bayliss MT, *et al.* Chondroitin sulphation patterns in synovial fluid in osteoarthritis subsets. *Ann Rheum Dis* 1999;58:441-5.
- 55-Felice JC, Costa LFC, Duarte DG, Chahade WH. Elementos básicos de diagnóstico da Osteoartrose. *Temas de Reumatologia Clínica* 2002;3:68-81.

- 56-Huziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress: A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002;10:432-63.