16 SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PIBIC Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

ANÁLISE DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM JOELHOS DE RATOS WISTAR COM OSTEOARTRITE INDUZIDA

Alana Soares de Sousa [1]; Sandro Estevan Moron[2]; Edgar Toledo De Aguiar Júnior[3]

[1]Aluno do Curso de Veterinária; Campus de Araguaína; e-mail: alannamatias@gmail.com "PIBIC/CNPq"

[2]Orientador do Curso de Medicina; Campus de Araguaína; e-mail: sandromoron@mail.uft.edu.br

[3]Co-orientador do Curso de Medicina; Campus de Araguaína; e-mail: edgar.aguiar@mail.uft.edu.br

RESUMO

A osteoartrite de joelho é uma das doenças que mais causa incapacidade no mundo. O objetivo de nosso estudo foi analisar comparativamente, alterações da cartilagem articular em joelhos de ratos com osteoartrite induzida, que receberam infiltração intra-articular de clodronato revestido em lipossoma, procurando correlacionar as alterações estruturais precoces da cartilagem articular com a concentração de um biomarcador sérico da degradação do colágeno e identificar os possíveis efeitos na osteoartrite por meio da inativação dos macrófagos da superfície da sinóvia. Foram utilizados nos experimentos 21 ratos Wistar, divididos em 3 grupos. Um grupo designado de controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento, nos outros 2 grupos se induziu a osteoartrose (OA) por meio da transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). Nos grupos submetidos a TLCA, um recebeu infiltração intra-articular no joelho de clodronato revestido em lipossoma e o outro solução fisiológica, estes procedimentos ocorreram sete dias antes ao procedimento cirúrgico. Durante o experimento amostras de sangue foram colhidas para avaliações laboratoriais, no sétimo e no vigésimo primeiro dia de pós-operatório (PO), quando os animais foram eutanasiados e foi coletado material para histologia. Os resultados identificaram que o biomarcador de degradação da matriz extracelular não foi capaz de identificar as alterações precoces na cartilagem no tempo do experimento, a histologia tem papel fundamental na identificação das alterações iniciais de implantação da osteoartrite e o uso do clodronato lipossoma parece ter um efeito protetor sobre a cartilagem articular.

. **Palavras-chave: Osteoartrite; Joelho; Clodronato lipossomo**

INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é a forma mais comum de artrite, caracterizada por deterioração progressiva da cartilagem que envolve principalmente articulações de suporte de peso, como joelhos e quadris, resultando em danos ao osso subcondral, diminuição ou perda da mobilidade, dores nas articulações, rigidez articular e inflamação (COIMBRA et al., 2002). Embora anteriormente tida como uma patologia degenerativa própria do envelhecimento, por uso e desgaste da articulação, a osteoartrose vem sendo considerada mais recentemente como uma doença inflamatória e de intensa atividade metabólica (ATTUR et al.,2002). Fortes indícios evidenciam que a ativação da sinóvia representa importante papel na etiologia da doença, podendo ser constatado pelo grande acúmulo de macrófagos e alterações inflamatórias teciduais em um elevado número de pacientes com quadros iniciais de OA (BENITO et al., 2005). Como os macrófagos desempenham um papel crucial na orquestração de outras células e na implantação da imunopatogênese da OA, vários estudos investigaram se a saúde da cartilagem e a integridade das articulações se beneficiariam da inativação destes. A remoção de macrófagos de revestimento sinovial por injeção intra-articular de lipossomas carregados de clodronato diminuiu significativamente a expressão gênica de MMP-3 e MMP-9 na sinóvia, juntamente com a redução de TGFβ mediador da formação de osteófito em um modelo de OA induzida por colagenase em camundongos (VAN LENT et al.,2004 ; BLOM et al.,2004,2007).

Apesar de os modelos experimentais em animais refletirem uma forma de OA secundária, estes possibilitam um monitoramento mais preciso da doença, tornando viável o estudo macroscópico, histológico, bioquímico e molecular da cartilagem em diferentes estágios da doença. Estudos utilizando modelos experimentais em animais, indiscutivelmente, fornecem dados importantes ao entendimento da fisiopatologia da OA e da ação terapêutica de diversas drogas. Baseado nesta premissa desenvolvemos um projeto de pesquisa que visa analisar comparativamente, alterações da cartilagem articular em joelhos de ratos com osteoartrite induzida que receberam infiltração intra-articular de clodronato revestido em lipossoma, procurando correlacionar as alterações estruturais precoces da cartilagem articular com a concentração de CTX-II (Telopeptídio C do colágeno tipo II) sérico e identificar os possíveis efeitos benéficos e preventivos na osteoartrite por meio da inativação dos macrófagos da superfície da sinóvia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 21 ratos Wistar, albinos (*Rattus norvegicus*), adultos, machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas) pesando entre 200 e 300 gramas. Os animais foram alojados em gaiolas de aço de 16 cm x 34 cm x 49 cm, cobertos com tampa de ferro e espaço para colocação de ração padrão

e um bebedouro de 500ml de água filtrada fornecida ad libitum. O ambiente foi mantido com temperatura de 22 ºC ± 2ºC em ciclo claro/escuro de 12 horas e tinham livre acesso a água e alimento. Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Morfo-fisiologia e Bioquímica - UFT, campus de Araguaína. Os animais acompanhados durante todo o experimento para identificação de alterações tissulares ou presença de edemas nas articulações, foram pesados diariamente, o montante total de animais foi dividido aleatoriamente em 3 grupos com 7 animais durante 21 dias, sendo eles: a) CLO = animais submetidos a transecção do ligamento cruzado anterior do joelho e que receberam infiltração intra-articular de clodronato encapsulado em lipossoma; b) SF = animais submetidos a cirurgia, porém receberam infiltração intra-articular com soro fisiológico; c) controle CTR= composto por animais que não foram submetidos a cirurgia, mas receberam infiltração intra-articular com soro fisiológico. Cada grupo continha 7 animais, sendo acomodados no máximo 3 indivíduos por gaiola.

Indução da Osteoatrite

O modelo de indução à Osteoartrose escolhido foi mediante transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) de acordo com a metodologia modificada de Silva Júnior (SILVA JUNIOR, 2007). Da seguinte maneira: animais anestesiados com Hidrocloridrato de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (20 mg/kg), por via intramuscular. Após depilação e antissepsia da região, foi realizada uma incisão longitudinal na pele sobre o joelho direito, posteriormente uma incisão parapatelar lateral, e o tendão patelar rebatido medialmente, dando acesso à cavidade articular. Uma vez visualizado o ligamento cruzado anterior, o mesmo foi cuidadosamente seccionado com uma tesoura microcirúrgica, evitando-se ao máximo lesionar outras estruturas articulares. O livre movimento do fêmur em relação à tíbia no sentido póstero-anterior ("sinaI da gaveta") confirma a secção do ligamento. O tendão patelar foi reposicionado, e a incisão suturada com fio absorvível (Vycril 5/0). A pele foi suturada com Nylon 4/0. Os macrófagos foram depletados a partir do revestimento sinovial por injeção intra-articular de Clodronato encapsulado por lipossomos, Clodrosome® de acordo com as recomendações do fabricante (*Encapsula Nano Sciences*). Quando esses lipossomos são injetados na articulação, são especificamente fagocitados pelos macrófagos do revestimento sinovial e não penetram nas camadas mais profundas da sinóvia (BLOM et al., 2007). Uma vez internalizado, o clodronato encapsulado é liberado intracelularmente e o macrófago morre por apoptose (VAN ROOIJEN et.al. 1996). Lipossomas carregados com clodronato foram injetados 7 dias antes da indução da OA experimental, porque a depleção ótima do revestimento é alcançada após 1 semana (BLOM et al., 2007).

Amostras de sangue foram coletadas nos ratos no décimo quarto (D14) e ao vigésimo primeiro dias (D21) após o início do experimento. Os níveis urinários de CTX-II (Telopeptídico C do colágeno tipo II) serão medidos por ensaio imunoenzimático. As dosagens do CTX-II foram feitas após coletas de cada indivíduo, 3mL de sangue por punção simples no membro superior não dominante, por meio do kit de coleta a vácuo. A amostra de sangue foi centrifugada para obtenção do plasma e armazenada a uma temperatura de 80 graus negativos, até que todas as amostras estiverem prontas para ser analisadas. Cada amostra foi analisada por meio do teste do tipo Elisa para detecção de CTX-II (Kit Hu CTX-II da *Cusabio Biotech Catalog*).

Ao vigésimo primeiro dia do início do experimento (D21), os animais de todos os grupos experimentais foram eutanasiados e as articulações foram extraídas e observadas macroscopicamente. Para isso, os ratos foram anestesiados com Hidrocloridrato de Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (20 mg/kg), por via intramuscular. Seguindo a metodologia proposta os fêmures de cada animal foram fixados em formol tamponado a 10%, durante 48 horas. Após a fixação o osso foi processado de acordo com o protocolo de preparação histológica para confecção de lâminas permanentes, corados pela hematoxilina-eosina (H. E.). Cada bloco / secção padrão, para avaliação do grau, estágio, foi confinado a uma superfície articular com a presença de tecidos subjacentes de um dos compartimentos da articulação do joelho, por exemplo, côndilo femoral medial. A secção deverá se estender horizontalmente de uma borda da articulação até a outra e em profundidade da superfície articular até abaixo da placa óssea articular (PRITZKER et al., 2006). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, utilizando o software ASL X (Leica) e fotografados em aumento de 40X, onde 5 campos ao longo da extensão da cartilagem articular do côndilo femoral de todas as amostras coletadas foram fotografados, buscando dessa forma uma avaliação fidedigna da cartilagem como um todo. Os dados foram analisados a partir de observação direta das lâminas coradas com H.E. à microscopia óptica, comparando-se a morfologia óssea e cartilaginosa através da análise de imagens. Ao microscópio as cartilagens foram classificadas seguindo a classificação histopatológica da *Osteoarthritis Research Society International* -OARSI-(PRITZKER et al., 2006). Os níveis séricos de CTX-II foram por ensaio imunoenzimático, Rat CTX-II® (Cross Linked C-telopeptide of Type II Collagen) ELISA, kit adquirido do fabricante Elabscience®.

Para análise estatística utilizou o programa estatístico GraphPad Prism. Os dados das variáveis quantidade de condrócitos e espessura da cartilagem articular foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias por meio do teste Tukey ao nível de 5% de significância. Já os dados da variável análise imunoenzimática foram submetidas ao teste não paramétrico Kruskal

Wallis (para obtenção do valor de P), onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95 % de significância. As variáveis celularidade e presença de clones também foram submetidas ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn (para comparação de médias) ao nível de significância de 5%. O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Processo: 23.101.003.524/2019-38).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao sétimo dia pós-transecção do LCA, os grupos CTR, SF, e CLO apresentaram concentrações diferentes entre si, tendo o grupo SF maior concentração que o grupo CTR (0,077 ± 0,016), e o CTR maior concentração de CTXII que o grupo CLO (0,071 ± 0,011) porém sem diferença estatística. Após 21dias da transecção do LCA, os grupos apresentaram alterações em suas concentrações com discreto aumento nos grupos CTR (0,080 ± 0,007) e CLO (0,078± 0,006) e queda no grupo SF (0,074 ± 0,009) , sem significância estatística. Após o 7º dia da TLCA, o grupo CLO apresentou aumento médio da CTXII, superior ao grupo SF e ao grupo CTR para o período analisado, porém sem diferença estatística (P=0,742) quando analisado no tempo total do experimento. Quando comparada a celularidade entre os diferentes grupos, foi observado que apenas o grupo CTR apresentou celularidade significativamente normal. No grupo SF alguns animais apresentaram hipocelularidade (grau 3), porém o predomínio foi de hipercelularidade, grau1. No grupo clodronato observou-se animais com celularidade normal, grupo 0, e outros com presença de hipercelularidade de grau 1, tendo predominado este último. Porém não houve diferença estatística entre os grupos analisados. Não houve diferença estatística significativa na análise dos clones de condrócitos em cada grupo. Porém, comparando-se a presença destes nas cartilagens observou-se que nos grupos Controle e SF houve principalmente ausência de clones, enquanto no grupo clodronato observou-se a presença de pares ocasionais e em alguns casos densos pares de clones ao longo do tecido. Quanto á espessura da cartilagem essa é considerada de características normais quanto se tem uma diferença entre a cartilagem calcificada e a não calcificada de menor para maior respectivamente, não tendo este padrão sugere-se alterada (VANWANSEELE et al., 2002). A espessura da cartilagem articular medida na área de contato do fêmur dos grupos Solução Fisiológica e clodronato em relação ao grupo Controle após os 21 dias de TLCA e 4 semanas da administração do clodronato lipossoma e da solução fisiológica, não demonstraram diferenças significativas estatisticamente. Feita a comparação das médias da quantidade de condrócitos analisada em cada grupo, percebeu-se que, apesar do leve aumento da quantidade no grupo clodronato comparado aos grupos Controle e SF, não houve diferença significativa entre as quantidades, ou seja, não houve alteração estatística significativa.

De acordo com Bin Bai e Yangi Li (2016) utilizando um modelo de OA induzida por TLCA em coelhos, demonstrou-se que as concentrações de CTX-II aumentaram de maneira significativa somente a partir da quinta semana da realização da TLCA. Duclos (2010), utilizando o mesmo modelo animal, relata aumento das concentrações de CTX-II nas primeiras três semanas, porém, ao término da quarta semana, os grupos não apresentavam diferenças estatísticas em suas concentrações médias. Entretanto em nosso experimento, na quarta semana após a infiltração do clodronato lipossoma, o grupo CLO apresentou concentrações de CTX-II maiores que na segunda semana, constatamos assim que este achado se deve à redução da efetividade do clodronato, que ocorre após três semanas da infiltração com o repovoamento por macrófagos na camada superficial da membrana sinovial e suas implicações no controle de mediadores inflamatórios (VAN ROOIJEN et al., 1996). Assim como em Blom (2007), a utilização da infiltração de clodronato intra-articular demonstrou uma diminuição da gravidade dos achados histológicos quando comparados ao grupo controle. Nossos dados mostraram uma pontuação menor neste grupo quando aplicada a classificação histopatológica proposta pela *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI).

Concluiu-se que, apesar de promover leves alterações morfológicas e histopatológicas do tecido articular de ratos após a depleção de macrófagos, e demonstrar ter a propriedade de atenuar as alterações histológicas da lesão condral, o uso de Clodronato encapsulado administrado intra-articularmente em OA induzida em ratos *Wistar*, demonstrou não ter efeito realmente significativo para o tratamento a longo prazo de OA. Isso evidencia-se pelas análises estatísticas realizadas nesse curto experimento que mostram que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos. Entretanto, é importante ressaltar que mesmo que os resultados obtidos em modelos animais representem apenas hipóteses a serem testadas em estudos clínicos, estes podem ajudar a esclarecer controvérsias em relação a tratamentos e drogas, e, nesse sentido, os resultados obtidos no presente trabalho fornecem evidências de que a metodologia empregada foi adequada e novos estudos com maior tempo de experimento se fazem necessários para compreensão e maior conhecimento sobre a patologia.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil.

LITERATURA CITADA

.

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

BAI B, LI Y. Detecção combinada de concentrações séricas de CTX-II e COMP em coelhos modelo com osteoartrite: uma técnica eficaz para diagnóstico precoce e estimativa da gravidade da doença. **Journal Orthopedic Surgery Research** .v 11, n1, p149, 2016.

BENITO, M. J. et al. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, n. 9, p. 1263–1267, 2005.

BLOM, A. B. et al. Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: Involvement of matrix metalloproteinase 3. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 1, p. 147–157, 2007.

COIMBRA, I. B. et al. Consenso Brasileiro para o tratamento da osteoartrite (artrose). **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2002.

DUCLOS, M. E. et al. "Significance of the serum CTX-II level in an osteoarthritis animal model: a 5-month longitudinal study." **Osteoarthritis and cartilage** vol. 18, n11, p.1467-76, 2010.

PRITZKER, K. P. H. et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: Grading and staging. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, n. 1, p. 13–29, 2006.

SILVA JUNIOR, F. S. DA. Osteoartrite experimental em ratos: efeito de sulfato de glicosamina e sulfato de condroitina sobre a incapacitação articular e a lesão da cartilagem articular.84f.Tese(doutorado) **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.Departamento de Clínica Médica**. Área de concentração, Reumatologia.São Paulo, 2007.

VAN LENT P., BLOM A., VAN DER KRAAN P., et al. Crucial role of synovial lining macro-phages in the promotion of transforming growth factor bemediated osteophyte formation. **Arthritis Rheumatism: Off Journal American College Rheumatology**; 50:103e11, 2004.

VAN ROOIJEN, N.; SANDERS, A.; VAN DEN BERG, T. K. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. **Journal of Immunological Methods**, v. 193, n. 1, p. 93–99, 1996

VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STUSSI, E. **The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. Osteoarthritis and Cartilage** .p.409-418, 2002.