

PRECURSORES DE GLICOSAMINOGLICANOS NA RECEPÇÃO ARTICULAR APÓS TRAUMA IATROGÊNICO NO JOELHO DE CÃES.

Resumo:

A ação de precursores dos GAGs foi avaliada na regeneração de lesões iatrogênicas realizadas sob a forma de trocleoplastia articular pela técnica de abrasão. Foram utilizados 24 cães adultos, saudáveis, separados em quatro grupos de seis. Os cães dos grupos I e II receberam um tratamento com precursores dos GAGs administrados por via oral, por um período de 60 (grupo II) e 90 dias (grupo I). Os cães dos grupos III e IV foram submetidos apenas à intervenção cirúrgica e considerados testemunha por 60 e 90 dias.

Os animais foram avaliados clinicamente quanto ao uso funcional do membro e grau de claudicação, e submetido a avaliações macro e microscópica pós-morte. Nos cães tratados foi evidenciada a formação de tecido cicatricial liso, branco-acinzentado recobrendo o local da lesão, que se caracterizou por fibrocartilagem em estágio de evolução mais organizado que naqueles do grupo testemunha.

A cartilagem articular recobre a superfície articular dos ossos longos e providencia uma camada protetora que proporciona o movimento articular. O tecido cartilaginoso é composto por uma substância fundamental, delgadas fibras colágenas e três tipos celulares: o condroblasto, o condrócito e o condroclasto. Os dois primeiros são considerados um mesmo tipo celular em diferentes estágios de desenvolvimento. A cartilagem articular possui uma alta concentração de proteoglicanos, os quais são importantes na função normal do tecido. Os proteoglicanos consistem de uma cadeia protéica central contendo glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), ladeada por duas cadeias laterais de condroitina-sulfato e queratina-sulfato. Estudos revelaram que os GAGs possuem três sub-estruturas antígenicamente distintas. Estas são condroitina rica em sulfato, queratina rica em sulfato, e regiões unidas por ácido hialurônico. A substância básica tem como constituintes primários os glicosaminoglicanos (GAGs), dos quais a condroitina-4-sulfato e a condroitina-6-sulfato são os mais comuns nos animais adultos. Secretados pelas células cartilaginosas. Os GAGs formam complexos com os núcleos protéicos para formar os proteoglicanos. Estes unem-se por meio de ácido hialurônico, formando agregados que possuem função de estabilizar e definir o volume da matriz e gerar forças compressivas sobre a mesma. A estabilização matricial é dada pela ligação química dos proteoglicanos ao ácido hialurônico e às fibras colágenas.

A cartilagem não possui inervação, é avascular e alinfática. Sua nutrição é feita por um sistema de difusão. Os nutrientes difundem-se dos vasos situados no pericôndrio para o líquido sinovial e, então através da densa matriz, para as células. A manutenção da cartilagem é responsabilidade do condrócito, que remove e substitui os componentes amorfos e fibroso e adiciona os GAGs altamente sulfatados à matriz. A vascularização de pericôndrio junto à cartilagem articular é indiretamente fonte do líquido sinovial e, assim, a maior fonte de nutrição para a cartilagem. A maioria dos agentes terapêuticos atravessa o filtro. O funcionamento biomecânico do tecido articular é grandemente dependente da regulação dinâmica dos componentes da matriz extracelular pelas células residentes da cartilagem, denominados condrócitos. Os condrócitos fazem o balanceamento de secreções e degradação de colágeno e proteoglicanos componentes da matriz fundamental. Quando a superfície articular for agredida ocorre um desbalanceamento, resultando na perda de rede formadora da matriz e no aparecimento do defeito na superfície articular. Acredita-se que o uso de substâncias condroprotetoras, cuja composição incluía a presença de metionina, glutamina, glucosamina, arginina e cisteína, ao estimular a biossíntese de glicosaminoglicanos, favoreça a regeneração articular de lesões de origem traumática.

GAGs de baixo peso molecular tem sido usados para estimular a produção de colágeno pelos condrócitos mantidos em cultura celular. As células provenientes de animais artríticos apresentam maior sensibilidade à estimulação por GAGs que as células provenientes de animais normais, no entanto, a adição de GAGs na cultura tem inibido a concentração de colágeno e glicosaminoglicanos. Resultados semelhantes foram encontrados em eqüinos, nos quais a inibição como também uma redução em cultura de células cartilaginosas. Alterações bioquímicas na cartilagem de joelhos de cães adultos, um com osteoartrite natural e três com osteoartrite induzida por secções do ligamento cruzado anterior, foram estudadas. Os cães foram sacrificados em períodos de três, seis, nove e quarenta e oito semanas. A cartilagem do joelho contralateral foi utilizada como controle. Os joelhos osteoártríticos apresentaram a cartilagem espaçada e mais hidratada

que os controles os proteoglicanos foram mais facilmente extraídos e encontrou-se uma maior proporção de galactosamina e glucosamina. Tais alterações estavam presentes já no cão sacrificado no período de três semanas. Este resultado sugere que, em resposta ao mecanismo de estresse, os condrócitos sintetizam mais condroitina-sulfato do que queratina-sulfato que normalmente na cartilagem articular imatura. Os efeitos de uma fórmula combinada de precursores mucopolissacarídeos foi pesquisada em 42 cães portadores de artrose, seis portadores de displasia coxofemoral e cinco com displasia e artrose. O acompanhamento clínico e radiológico demonstrou uma positividade terapêutica em 98% dos casos sendo que, em 72% o resultado foi altamente definido. Estudos sobre a regeneração articular após lesão iatrogênica superficial e profunda em cães em crescimento evidenciou, ao exame anátomo-patológico realizado após 12 semanas, apenas uma moderada capacidade de regeneração, em que foi detectado aumento na atividade mitótica com proliferação de condrócitos e presença de metaplasia cartilaginosa. No passado acreditava-se que os ferimentos na superfície não podiam cicatrizar, pois devido ao estado avascular, não ocorria a reação inflamatória (mediada por vasos sanguíneos) que prepara os diferentes tecidos para a granulação e reparação. Estudos realizados com biologia molecular indicam que o reparo de defeitos totais da cartilagem articular é primeiramente preenchido com células derivadas do osso, com alto nível de colágeno tipo I e osteonectina, enquanto superficialmente é observada uma lenta transição, a partir do coágulo de fibrina, de células mesenquimais indiferenciadas contendo colágeno tipo III. Este tecido, subseqüentemente, transforma-se em tecido fibrocartilaginoso com pequenos grupos de células convertendo-se em um aparentemente correto fenótipo condrócito. Esta baixa transcrição em nível de colágeno tipo II sugere porém que insuficiente quantidade de fatores reguladores importantes, ou células progenitoras, estão presentes no tecido de reparação. Talvez no futuro tais fatores possam ser administrados na articulação como novos métodos terapêuticos.

Estudo bioquímico em lesões articulares no joelho de coelhos cita que está bem definido que um defeito na cartilagem articular é reparado por tecido fibrocartilaginoso, derivado de células mesenquimais indiferenciadas da medula. Na sexta semana após traumatismo articular há aumento no conteúdo de glicosaminoglicanos e na síntese de proteoglicanos, estimulados por fatores de crescimento.

Os GAGs têm o poder de inibir tanto a via clássica, como a via alternativa da cascata do complemento e causam a depleção dos componentes do complemento. Desta forma previnem o desenvolvimento de artrite experimentalmente induzida em muitas espécies. Os efeitos terapêuticos dos GAGs no tratamento de artrite química degenerativa e traumática podem ser atribuídos predominantemente à inibição da atividade do complemento. Os proteoglicanos têm a habilidade de “varrer” radicais livres e diminuir a liberação de prostaglandina e os proteoglicanos degradam enzimas lisossomais decorrentes dos leucotrienos e inibem protoases. Embora os GAGs diminuam a distribuição de proteoglicanos e colágeno isto também resulta na produção de glicosaminoglicanos de alto peso molecular pelos condrócitos e aumenta a síntese de ácido hialurônico pelas células sinoviais. As técnicas de trocleoplastia causam trauma iatrogênico à cartilagem articular. A trocleoplastia por abrasão é uma técnica das mais simples e consiste na remoção da cartilagem articular e de 1 a 2 mm de osso subcondral no sulco troclear. O defeito preenchido por tecido conectivo frouxo bem vascularizado, altamente celular que posteriormente se organiza em tecido conectivo fibroso denso, que lembra fibrocartilagem.

Os mecanismos pelos quais os GAGs podem minimizar as perdas de cartilagens lesadas ou portadoras de enfermidades articulares degenerativas não estão completamente esclarecidos. Assim, foi objetivo deste trabalho verificar a capacidade de regeneração da cartilagem articular, com o emprego de precursores biológicos necessários à biossíntese das glicosaminoglicanos sulfatadas e não sulfatadas, polímeros estes necessários à síntese e à manutenção deste tipo de tecido.

MATERIAL DE MÉTODO

Foram utilizados cães clinicamente sadio, adultos, pesando entre 18 e 28 kg sadios, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Todos os animais foram submetidos à sulcoplastia troclear por abrasão em um dos membros pélvicos.

Grupo I: seis cães submetidos a sulcoplastia troclear por abrasão, todos recebendo tratamento com precursores dos GAGs, na dose de um comprimido 1 pela manhã e um comprimido 1 e um 2 à tarde, durante 60 dias.

Grupo II: seis cães submetidos à sulcoplastia troclear por abrasão, recebendo a mesma dose de precursores dos GAG, por 90 dias.

Grupo III: seis animais submetidos à sulcoplastia troclear por abrasão e observados por 60 dias.

Grupo IV: seis animais submetidos à sulcoplastia troclear por abrasão e observados por 90 dias.

Os precursores dos GAGs utilizados no experimento apresentam em sua composição os seguintes elementos:

Comprimido 1: 40 mg de D-L metionina, 10 mg de L-cisteína, 10 mg CIH arginina, 4 mg de histidina, 4 mg de CIH betaína, 16 mg de L-glutamina, 4 mg de CIH piridoxina (B6), 16 mg de D-glicosamina e excipiente q.s.p. 400 mg.

Comprimido 2: 10 mg de gluconato de cobre, 20 mg de gluconato de magnésio, 16 mg de gluconato de manganês, 30 mg de gluconato de zinco e excipiente q.s.p. 400 mg.

PREPARAÇÃO DOS ANIMAIS

Cada cão foi submetido a um período de adaptação de uma semana, durante a qual foi examinado, desverminado e submetido à coleta de sangue para hemograma. Trinta minutos antes do início da cirurgia, cada animal foi tranquilizado com 0,2 mg/kg de acepromazina e 0.05 mg/kg de fentanil, via intravenosa, neste momento, também, o animal recebeu profilaxia antimicrobiana com ampicilina sódica na dose de 20 mg/kg, por via intravenosa. Na seqüência, foi efetuada a tricotomia na região comprometida entre o 1/3 proximal da coxa e o 1/3 distal da perna.

TRANS-OPERATÓRIO

Todos os animais foram submetidos ao seguinte protocolo: na sala de cirurgia cada animal recebeu adaptação de dispositivo venoso na veia cefálica ao qual foi adaptada solução de Ringer-lactato para reposição hidroeletrólítica trans-cirúrgica. A seguir recebeu indução anestésica com tiopental sódico (10 mg/kg) e, após a abolição do reflexo orotraqueal, foi entubado e mantido sob ventilação mecânica com oxigênio. A manutenção anestésica foi efetuada com Halotano vaporizado oxigênio em circuito não reinalatório.

Após contenção em decúbito dorsal em mesa cirúrgica, a área operatória foi submetida à antissepsia pelo esquema álcool-iodo-álcool, e delimitada por panos de campo esterilizados. A abordagem de articulação fêmur-tíbio-patelar foi feita conforme técnica descrita na literatura. Uma vez luxada a patela e exposta a face do fêmur, foi feita remoção de um segmento de cartilagem articular (0,4 x 1,2 cm) até o osso subcondral, com uma broca odontológica adaptada a uma caneta perfuradora de alta rotação (300000 rpm). Na seqüência, a articulação foi irrigada abundantemente com solução salina e foi efetuada redução da luxação patelar. A cápsula articular foi reconstituída com fio de mononáilon 3-0 em sutura de Sultan.

Os planos subjacentes foram aproximados com pontos isolados simples com o mesmo fio. A pele foi suturada com pontos de Krishner, também com fio de mononáilon.

No pós-operatório os animais receberam bandagem na articulação fêmur-tíbio-patelar e limpeza da ferida cirúrgica até os sete dias. Quando da retirada dos pontos. Como medicação analgésica receberam morfina na dose de 0,1 mg/kg, quatro vezes ao dia, por via intramuscular, nos três primeiros dias, e antiinflamatório não esteróide (flunixin meglumine) na dose de 1,1 mg/kg via subcutânea, uma vez ao dia, durante os três dias seguintes.

As intervenções foram realizadas no Bloco de Cirurgia Experimental da Universidade federal de Santa Maria.

Quadro 1 – Característica da deambulação em graus correspondentes para avaliação clínica pós-operatória de cães submetidos a sulcoplastia troclear por abrasão e tratados com precursores dos GAGs.

		Grau	Descrição
AValiação CLÍNICA	Após a cirurgia, os animais foram examinados diariamente dando-se atenção à	I	Não usa nem apóia o membro
		II	Uso e apoio infreqüente do membro na estação e no caminhar. Não sustenta o peso na extremidade afetada, elevando-a ao correr.
		III	Uso claudicante do membro na estação no caminhar. Sustentação parcial do peso na extremidade afetada, elevando-a ao correr.
		IV	Caminha sem claudicar. Normal na estação. Claudica ao correr. Sem elevar o membro.
		V	Uso funcional do membro.

adaptação pós-cirúrgica. O retorno da deambulação foi avaliado atribuindo-se conceitos conforme o grau de recuperação, com base nos parâmetros apresentados no quadro 1.

Todos os animais foram mantidos em baias individuais durante a primeira semana de pós-operatório, a partir daí foram mantidos em grupos de seis, em canis coletivos medindo 16 m², sem restrição ao exercício. Foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial balanceada. Ao final do período de observação, todos os cães tiveram a articulação abordada, fotografada e avaliada macroscopicamente. Foram colhidas amostras da área em reparação, que foram fixadas em formol neutro a 10%, descalcificadas com solução de ácido nítrico a 10% pelo período de 48 horas, então clivadas, incluídas em parafina, cortadas a 6 mm e coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina.

A avaliação dos resultados histológicos foi realizada sem conhecimento do examinador a respeito da distribuição dos grupos. O tecido neoformado no local de erosão foi analisado de acordo com suas características microscópicas, tais como: organização tecidual, características celulares, presença de vascularização.

Tabela 1 – Resultados da avaliação clínica de cães conforme o grau de deambulação de cada grupo em relação ao período evolutivo a sulcoplastia troclear por abrasão.

Dias	7	15	21	28	35	42	49
GC 60	III* (4**)	III (4)	IV (3)	IV (2)	IV (2)	IV (2)	IV (1)
GC 90	IV (2)	IV (2)	V (3)	V (4)	V (4)	V (4)	V (5)
GT 60	III (2)	IV (1)	IV (1)	IV (1)	IV (1)	V (6)	V (6)
GT 90	IV (3)	IV (2)	IV (2)	IV (2)	IV (2)	IV (2)	IV (2)

GC = grupo controle;

GT60 = tratamento com precursores dos GAGs, por 60 dias.

GT90 = tratamento com precursores dos GAGs, por 90 dias.

* Graus de deambulação conforme TUDURY & RAISER (1985)

** Número de cães relacionando ao grau de deambulação no período.

RESULTADOS

O medicamento foi bem tolerado pelos animais, não havendo dificuldade em sua administração, nem foi evidenciado qualquer sinal clínico de efeito colateral. Durante a manutenção em canis coletivos os cães foram agrupados de modo a conviverem pacificamente e tinham livre movimentação no recinto e acesso ao sol.

Os dados de avaliação clínica pós-operatória (*Tabela 1*) demonstram que houve progressiva melhora na deambulação, que foi mais rápida nos animais tratados com os precursores dos GAGs, nos diferentes períodos de observação.

O exame macroscópico das articulações demonstrou, nos animais controle, que aos 60 dias de evolução a área articular estava irregular, com tecido avermelhado sem revestimento cartilaginoso.

Aos 90 dias, a articulação mostrava superfície central acinzentada circundada por área rosada e retraída com depósito de tecido adiposo em 1/3 da superfície lesionada.

Nos animais tratados com precursores de GAGs, aos 60 dias de evolução já se constatou presença de tecido de aspecto cartilaginoso recobrimdo 1/3 da lesão em quatro cães, e 2/3 nos outros dois. Aos 90 dias a superfície articular estava revestida de tecido semelhante à cartilagem, recobrimdo 75% da superfície lesionada em cinco cães e sem evidência de cartilagem em um. Nesse, a sinóvia tinha coloração avermelhada. A sinóvia estava amarelo-xaroposa em um cão testemunha aos 60 dias e nos demais estava clara, com aspecto semelhante ao joelho contralateral.

O resultado da avaliação microscópica está relacionado no Quadro 2.

Quadro 2- Resultados da avaliação microscópica das amostras obtidas dos cães submetidos à trocleoplastia e observadas por períodos de 60 e 90 dias com e sem tratamento GAGs (Precursores de Glicosaminoglicanos)

Controle 60 dias	Desaparecimento do tecido cartilaginoso e substituição por tecido de granulação caracterizado por proliferação de células fusiformes com núcleo grande, irregular, acentuadamente hipercromático, citoplasma relativamente escasso e irregular. Vascularização leve e infiltrado multifocal leve a moderado de células inflamatórias.
Controle 90 dias	Desaparecimento do tecido cartilaginoso e substituição por tecido de granulação caracterizado por proliferação de células fusiformes com núcleo grande, irregular, acentuadamente hipercromático, citoplasma relativamente escasso e irregular. Vascularização leve infiltrado de células mononucleares.
Tratamento 60 dias	Desaparecimento da cartilagem articular; substituição por tecido de granulação caracterizado por células fusiformes com núcleo irregular moderadamente hipocromático, citoplasma escasso e irregular. Vascularização moderada. Superfície externa ou porção superficial do corte histológico apresenta células mais coradas que a superfície interna ou porção profunda.
Tratamento 90 dias	Tecido de granulação com intensa proliferação “neovascular”. Túnicas vasculares bem evidentes e núcleo regular.

DISCUSSÃO

Modelos experimentais que reproduzam os sinais clínicos e alterações patológicas semelhantes às que ocorrem naturalmente na doença articular degenerativa não existem. A técnica de sulcoplastia por ressecção foi selecionada para testar o efeito dos precursores dos glicosaminoglicanos devido à frequência das luxações patelares de grau 3 ou 4 que requerem aprofundamento do sulco troclear. Esta técnica resulta em lesão articular extensa, facilitando a avaliação da capacidade regenerativa ou de reparação.

Comparando a evolução clínica dos cães testemunhas e daqueles tratados com precursores dos GAGs observa-se que, naqueles tratados, a recuperação foi mais rápida. Esse dado permite teorizar que os aminoácidos e sais minerais que compõe o medicamento elevam o teor de glicosaminoglicanos e proteoglicanos, já que são seus precursores, conferindo efeito antiinflamatório e analgesia, ao interferir com os componentes da inflamação favorecendo, assim, deambulação mais precoce. Esse efeito parece se estender ao longo do processo de reparação, o que se justificaria pela progressiva recuperação da capacidade amortizadora da cartilagem articular. Os dados apresentados na *Tabela 1* demonstram, já na segunda de pós-operatório, uma diferença sensível entre os animais dos grupos controle e tratamento quanto ao grau de recuperação. Esse resultado supera as expectativas uma vez que, segundo estudo sobre a ação de precursores mucopolissacarídeos, há necessidade de ao menos 30 a 60 dias de tratamento para observar melhora clínica nos casos de artrose. O preenchimento da erosão articular denota reposição de osso e proliferação na superfície de tecido com características de cartilagem.

Essa proliferação foi significativamente superior nos animais que receberam precursores dos GAGs. Como todos os animais foram alimentados com ração comercial balanceada, portanto contendo as necessidades basais, não resta dúvida de que uma suplementação com precursores específicos acelera o processo regenerativo ou de reparação. Isto foi demonstrado pelas avaliações histológicas, nas quais os

grupos tratamento apresentaram tecido de reparação mais espesso, inicialmente fibroso, tornando-se fibrocartilaginoso, o que tem sido denominado processo de progressiva hialinização.

Embora seja citado que as lesões articulares são reparadas por tecido fibrocartilaginoso mesmo quando estimulada a síntese de glicosaminoglicanos e proteoglicanos por fatores de crescimento, o aspecto macroscópico observado no presente experimento, principalmente nas amostras obtidas aos 90 dias de evolução, é semelhante à cartilagem. O exame histológico mostrou distribuição celular uniforme e intensa proliferação vascular nos grupos tratamento, em contraste com a desorganização tecidual encontrada nos grupos controle, o que denota a presença de tecido mais resistente.

A presença de sulcos rosados nas bordas da lesão, mesmo aos 90 dias, confirma que o tecido articular é difícil de cicatrizar, por ser um tecido avascular e a reação inflamatória mediada por vasos sanguíneos iniciar-se no tecido subjacente, ou seja, no osso subcondral. Por outro lado, nos animais medicados com precursores dos GAGs a lesão tornou-se mais rasa com a evolução, o que pode indicar que o fármaco é também coadjuvante da osteogênese, oferecendo um leito para a proliferação cartilaginosa em sua superfície. Assim, pode-se deduzir que os precursores dos GAGs comportam-se como regeneradores osteoarticulares.

A técnica de trocleoplastia, sem dúvida, causa lesão articular, mas não simula os efeitos da doença articular degenerativa. Sabe-se que o condrócitos provenientes de animais artríticos, em cultura apresentam maior sensibilidade aos GAGs que condrócitos provenientes de animais saudáveis. Partindo dessa premissa, parece provável que o tratamento com precursores glicosaminoglicanos ofereça condições mais adequadas para a cicatrização de lesões ulcerativas, uma vez que otimiza a cicatrização de lesões iatrogênicas de origem traumática.

A avaliação clínica não deixa dúvidas quanto ao efeito benéfico dos precursores dos GAGs no processo de cicatrização osteoarticular. Embora o estudo histológico permita identificar um tecido com características de reparação, este apresentava-se com maior grau de organização que aqueles dos grupos controles.

Referência:

Souza,R; Raiser,A;Guimarães, L; Rios, M; Araújo, L; Leottee, A; Hintze, C.Precursores de Glicosaminoglicanos na reparação articular após trauma Tatrogênico no joelho de cães. Revista Clínica Veterinária, Ano IV, nº 23, Novembro/Dezembro,1999. pág 33-38.