Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

AVALIAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTO PESO MOLECULAR COMO TRATAMENTO DA SINOVITE EXPERIMENTAL EM EQUINOS.

MARCELA DOS SANTOS RIBEIRO

Botucatu, SP
Fevereiro – 2025

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

AVALIAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTO PESO MOLECULAR COMO TRATAMENTO DA SINOVITE EXPERIMENTAL EM EQUINOS.

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de MESTRE.

Marcela dos Santos Ribeiro
Orientadora: Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, SP
Fevereiro - 2025

R484a

Ribeiro, Marcela dos Santos
Avaliação do ácido hialurônico de alto peso molecular como tratamento da sinovite experimental em equinos / Marcela dos Santos Ribeiro. -- Botucatu, 2025
64 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientadora: Ana Liz Garcia Alves

1. Sinovite. 2. Ácido Hialurônico. 3. Articulação. 4. líquido sinovial. 5. Inflamação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

1

2

Nome do autor (a): Marcela dos Santos Ribeiro

Título: AVALIAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTO PESO MOLECULAR COMO TRATAMENTO DA SINOVITE EXPERIMENTAL EM EQUINOS.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves
Presidente e Orientadora
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dra. Anna Paula Balesdent Barreira
Membro Departamento de Medicina e cirurgia veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. João Pedro Hübbe Pfeifer
Membro Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas/SP

Data da qualificação: 26 de fevereiro de 2025.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Ana Liz Garcia Alves, que me deu a oportunidade de aprender e ser orientada por ela. É um privilégio poder aprender tanto com a senhora.

Agradeço também a Profa. Raquel Yvonne Baccarin por me orientar na análise da concentração do ácido hialurônico e nos conceder a possibilidade de mensuração.

Ao professor Vitor Hugo dos Santos, que foi fundamental no meu percurso ao mestrado.

As minhas irmãs da pós-graduação, Vittória Guerra Altheman e Lorena Cardozo Ferrai, que me receberam tão bem e me ajudaram tanto.

A todos que ajudaram no desenvolvimento do projeto.

A querida Clotilde Gonçalves de Oliveira, que foi companhia e ombro amigo durante esse percurso.

Mais que qualquer dos agradecimentos, agradeço a minha família por ser alicerce na minha vida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

“Se você pode sonhar, você pode realizar."

Walt Disney

RESUMO

RIBEIRO, M.S. **AVALIAÇÃO DO ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTO PESO MOLECULAR COMO TRATAMENTO DA SINOVITE EXPERIMENTAL EM EQUINOS.** Botucatu – SP. 2025. 64p. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A sinovite acomete frequentemente atletas, sejam equinos ou até mesmo o homem. O surgimento de lesões no ambiente articular, seja mecânico ou por patógenos, alteram a homeostase articular, havendo a liberação de fatores inflamatórios no líquido sinovial. O processo inflamatório estabelecido, corrobora para a degradação condral, devido a liberação de interleucinas e metaloproteinases de matriz, sendo um fator predisponente para a osteoartrite. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tratamento com ácido hialurônico de alto peso molecular sobre a sinovite experimental aguda em equinos comparado a animais não tratados. A sinovite foi induzida com LPS(0,25ng) em equinos adultos (n = 16) na articulação rádio cárpica, sem alteração articular e após 12 horas da indução, receberam o tratamento, sendo o grupo tratado com ácido hialurônico (20 mg/ml) de alto peso molecular (2.280 KDa) e o grupo controle PBS (2 ml). Os animais foram avaliados rigorosamente nos momentos 0 (imediatamente antes da indução da sinovite), 12, 24 e 48 horas após a indução e 7 e 14 dias após a indução da sinovite, através de exame ortopédico, do líquido sinovial, ultrassonografia e termografia da articulação. Os resultados das avaliações foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro wilk) e aqueles que apresentaram comportamento paramétrico passaram pela ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. As análises não paramétricas passaram pelo teste de Mann-Whitney, sendo as comparações realizadas pelo teste de Friedman. A diferença estatística foi considerada quando $p<0,05$. A suplementação com o ácido hialurônico foi eficaz em reduzir a claudicação nos animais tratados, tendo ainda se mantido estável na articulação por pelo menos 36 horas após sua aplicação, mantendo a presença de moléculas de alto peso molecular no ambiente articular.

Palavras-chave: peso molecular, inflamação, líquido sinovial, articulação.

ABSTRACT

EVALUATION OF HIGH MOLECULAR WEIGHT HYALURONIC ACID AS A TREATMENT FOR EXPERIMENTAL SYNOVITIS IN EQUINES. Botucatu – SP. 2025. 64 pages. Dissertation (Master's degree) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University.

Synovitis frequently affects athletes, whether they are equines or humans. The occurrence of injuries within the articular environment, whether mechanical or pathogen-induced, disrupts articular homeostasis, leading to the release of inflammatory factors into the synovial fluid. The established inflammatory process contributes to chondral degradation due to the release of interleukins and matrix metalloproteinases, predisposing the joint to osteoarthritis. The objective of this study was to evaluate the influence of hyaluronic acid treatment on acute experimental synovitis in equines compared to untreated animals. Synovitis was induced in adult equines (n=16) in the radiocarpal joint, without prior articular alteration, using LPS (0.25 ng). Twelve hours after induction, the animals received the treatment: the treated group received high molecular weight hyaluronic acid (20 mg/ml, 2.280 kDa), while the control group received PBS (2 ml). The animals were rigorously evaluated at 0 (immediately before synovitis induction), 12, 24, and 48 hours post-induction, and at 7 and 14 days post-induction through orthopedic examination, ultrasonography, and thermography of the joint and synovial fluid. The evaluation results were subjected to the Shapiro-Wilk normality test. Parametric data were analyzed using ANOVA followed by Tukey's test, while non-parametric data were analyzed using the Mann-Whitney test, with comparisons made using Friedman's test. Statistical significance was considered when $p<0.05$. Supplementation with hyaluronic acid was effective in providing analgesia in treated animals and remained stable in the joint for at least 36 hours after application, maintaining the presence of high molecular weight molecules within the articular environment.

Keywords: Hyaluronan, molecular weight, inflammation, synovial fluid, joint.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de articulações no esqueleto 4

Figura 2. Articulação sinovial..... 5

Figura 3. Composição da cartilagem articular..... 6

Figura 4. Composição da membrana sinovial..... 7

Figura 5. Ácido hialurônico na matriz extracelular..... 9

Figura 6. Síntese do ácido hialurônico..... 10

Figura 7. Receptores celulares e suas interações com diferentes pesos moleculares de ácido hialurônico..... 11

Figura 8. Avaliação dos escores do exame de claudicação..... 32

Figura 9. Avaliação ultrassonográfica da espessura da membrana sinovial 33

Figura 10. Mensuração da concentração dos biomarcadores C2C e condroitin sulfato no líquido sinovial..... 36

Figura 11. Concentração do ácido hialurônico no líquido sinovial..... 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mediana (Q1 e Q3) dos parâmetros de claudicação ao passo, claudicação ao trote, claudicação após a flexão e distensão/efusão articular..... 32

Tabela 2. Celularidade do líquido sinovial..... 35

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....4
REFERÊNCIAS.....13
CAPÍTULO 2.....17
AGRADECIMENTOS.....20
Resumo.....22
Importância.....22
Objetivo.....22
Métodos.....22
Conclusões e relevância.....23
INTRODUÇÃO.....24
MÉTODOS.....27
RESULTADOS.....34
Análise física.....37
Análise Química.....37
Análise de Celularidade.....38
Biomarcadores de degradação da matriz extracelular.....38
Eletroforese do ácido hialurônico.....39
DISCUSSÃO.....42
REFERÊNCIAS.....49
Material Suplementar.....51

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As enfermidades relacionadas à articulação são consideradas a maior causa de perda econômica na indústria do cavalo (1). As lesões musculoesqueléticas são comuns durante a prática de esportes (2), devido aos danos gerados pela biomecânica, podendo a ocorrência de traumas repetidos dar início a um processo inflamatório no ambiente intra-articular (1).

A membrana sinovial é a primeira estrutura a ser afetada pelo processo inflamatório (3,1,4), ela é responsável pela produção do líquido sinovial, que possui funções como a lubrificação articular, amortecimento e a modulação da atividade dos condrócitos (5). Os sinoviócitos, células presentes na camada íntima da membrana sinovial, são responsáveis pela secreção de diversas proteínas, que compõem o líquido sinovial, como o ácido hialurônico, colágeno, lubricina, metaloproteinases (MMPs), interleucinas e eicosanóides (1), influenciando diretamente na composição líquido sinovial (6).

O processo inflamatório é desencadeado com a exposição da membrana sinovial a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) ou padrões moleculares associados a lesões (DAMPS), que por sua vez tem origem a partir de microrganismos ou mesmo de agressões estéreis, desencadeando o estresse celular e danos a matriz extracelular (7,8). Os receptores da membrana plasmática que respondem a presença dessas moléculas, são expressos principalmente por células mielóides, sendo importante no reconhecimento microbiano ou na regulação da resposta inflamatória, o que resulta na produção e liberação de citocinas inflamatórias, como as interleucinas e TNF-α. Tais citocinas ativam o mecanismo de imunidade inata e atraem quimiotaticamente mais células inflamatórias para o local (9,8), intensificando o processo já existente e dando origem a sinovite (3,4,1).

A interleucina 1 e o TNF-α, promovem a produção de MMPs, óxido nítrico, prostaglandinas e inibem a produção do agrecan e do colágeno do tipo II, são deletérios para o ambiente intra-articular, causando a degradação da cartilagem articular, fator importante no desenvolvimento da osteoartrite (OA) (4,2,1).

Atualmente existem diversas opções de tratamento para a inflamação sinovial (6), cujo tratamento visa a inibição da degradação das estruturas envolvidas, restituição do ambiente sinovial normal e promoção do alívio da dor (1,6).

O ácido hialurônico é uma substância encontrada no líquido sinovial e na matriz extracelular articular, que possui propriedades viscoelásticas (10,11,12,1). Durante o processo inflamatório intra-articular, o líquido sinovial encontra-se em maior volume e com menor viscosidade. A concentração de ácido hialurônico é mais baixa e suas moléculas são menores, o que interfere diretamente na viscosidade do líquido sinovial, diminuindo suas funções de lubrificação e de amortecimento (10,1). Através do estudo do peso molecular do

ácido hialurônico, acredita-se que este fator influencie diretamente na função e qualidade da molécula, sendo as moléculas de alto e intermediário peso molecular responsáveis pelo aumento do processo de cicatrização e por proporcionar maior viscosidade do líquido sinovial (13), enquanto moléculas de baixo peso molecular apresentam ação pró inflamatória, intensificando o processo inflamatório já existente (14,13). Foi observado ainda em estudos *in-vitro* que o peso molecular influencia em efeitos condroprotetores, anti-inflamatórios, mecânicos e analgésicos, alterando o peso molecular do ácido hialurônico endógeno (13).

No ambiente articular, o ácido hialurônico é responsável por restaurar as propriedades fisiológicas do líquido sinovial de amortecimento, lubrificação das articulações e a sua síntese (10,11,12,1). Possui efeito anti-inflamatório, capaz de inibir o estímulo das células de defesa, a formação e liberação de prostaglandinas e elimina radicais livres (10,12,1).

O tratamento de enfermidades articulares representa um desafio para o médico veterinário. Diversas terapias são continuamente estudadas, incluindo a terapia com ácido hialurônico de alto peso molecular, que visa atenuar a progressão do processo inflamatório, contribuindo para a modulação da inflamação articular e a preservação da integridade funcional das estruturas envolvidas. Avaliar como suas propriedades atuam no ambiente articular, através da mensuração de biomarcadores de degradação condral, comportamento da molécula no ambiente articular e os animais clinicamente, faz-se importante para o esclarecimento sobre a sua atuação na sinovite e sua importância como opção de tratamento.

Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é avaliar através da sinovite experimental aguda, os efeitos do tratamento do ácido hialurônico na composição do líquido sinovial e nos sinais clínicos comparado com animais sem tratamento.

Objetivo específico

Investigar se a suplementação com ácido hialurônico de alto peso molecular apresenta ação anti-inflamatória no tratamento da sinovite experimental aguda em equinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As articulações ósseas são classificadas a partir de sua mobilidade, havendo articulações imóveis (sinartroses ou fibrosas), como exemplo as junções ósseas do crânio, as com baixa mobilidade (anfiartroses ou cartilaginosas) e as móveis (diartroses ou sinoviais) (Figura 1)(1,15,6).

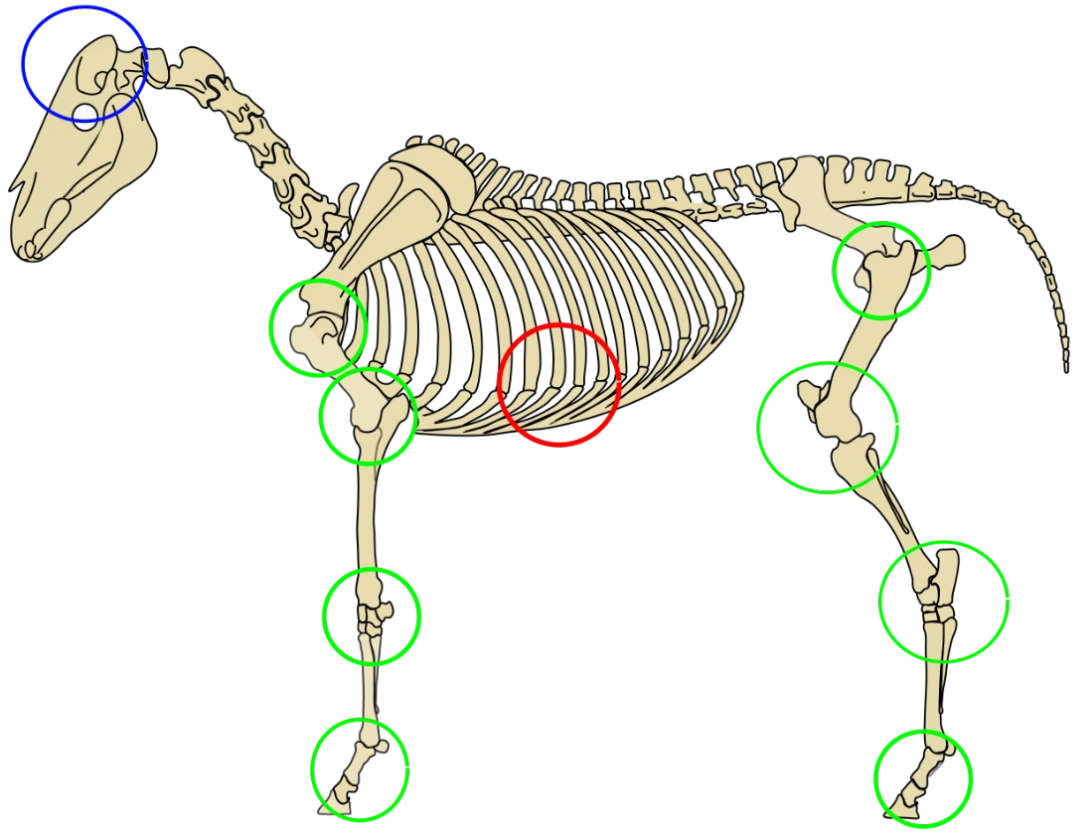

FIGURA 1. Tipos de articulações no esqueleto: azul - sinartroses ou fibrosas; vermelho - anfiartroses ou cartilaginosas; e verde - diartroses ou sinoviais.

A articulação sinovial é um dos elementos essenciais para o movimento, sendo responsável por conectar duas extremidades ósseas, permitir o movimento, fazer a transferência de cargas geradas pelo movimento, estabilizar o membro em diferentes tipos de solo, lubrificar e absorver o impacto entre os ossos (16,1,6,17). São componentes da articulação sinovial a cartilagem articular que recobre a superfície óssea, proporcionando o deslizamento das estruturas ósseas e minimizando o atrito da articulação, a membrana sinovial que tem função fagocitaria, regulação dos componentes do líquido sinovial e regeneração, o líquido sinovial responsável pelo amortecimento da articulação e lubrificação, a cápsula fibrosa que recobre a membrana sinovial, fornece estabilidade e alinhamento e os ligamentos, também responsáveis pela estabilidade articular e alinhamento(figura 2)(1,6).

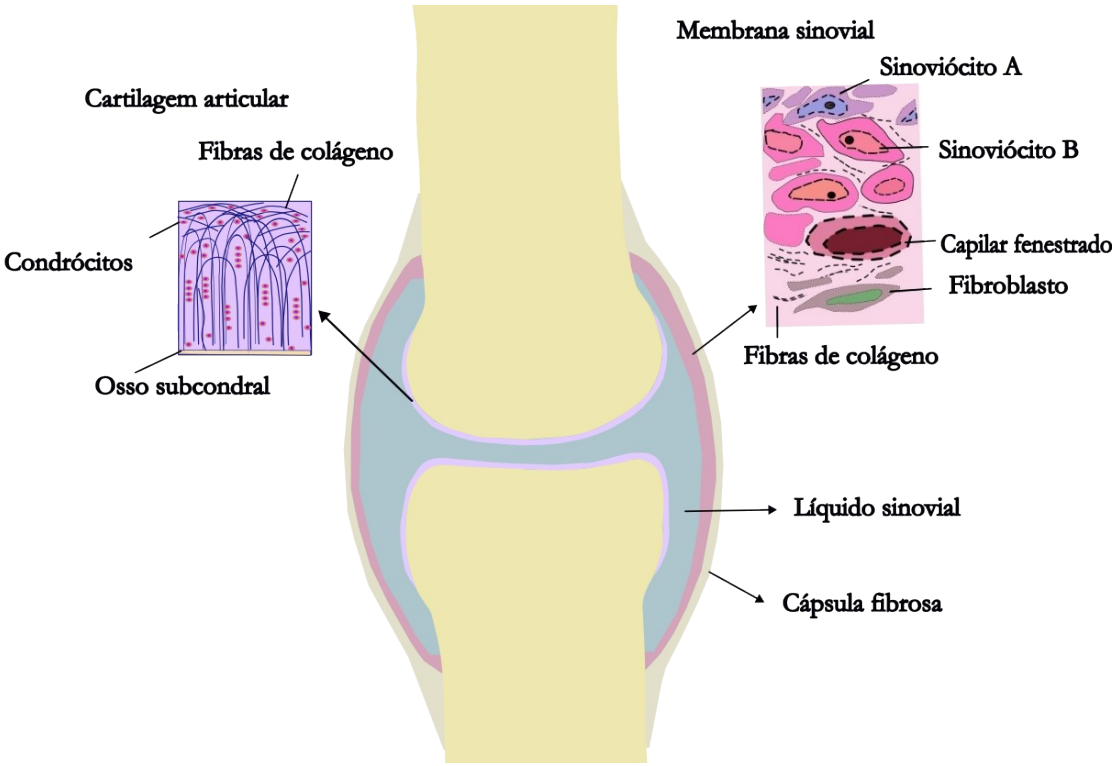

Figura 2. Articulação sinovial.

A cartilagem articular é do tipo hialina, sua matriz é composta principalmente pelo colágeno do tipo II que se encontra associado ao ácido hialurônico, glicoproteínas e proteoglicanos. O tecido cartilaginoso ainda conta com a presença de condrócitos, células da cartilagem responsáveis pela produção de colágeno, principalmente o colágeno do tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas (figura 3) (16,15,6). A cartilagem articular é uma estrutura avascular, quando ainda imatura, ela é nutrida pelos vasos do osso subcondral, mas após a maturação, há o crescimento de uma placa óssea, que separa a cartilagem do osso subcondral, perdendo o acesso ao suprimento sanguíneo. Com isso, quando madura, a cartilagem depende do líquido sinovial para sua nutrição (16,15,6).

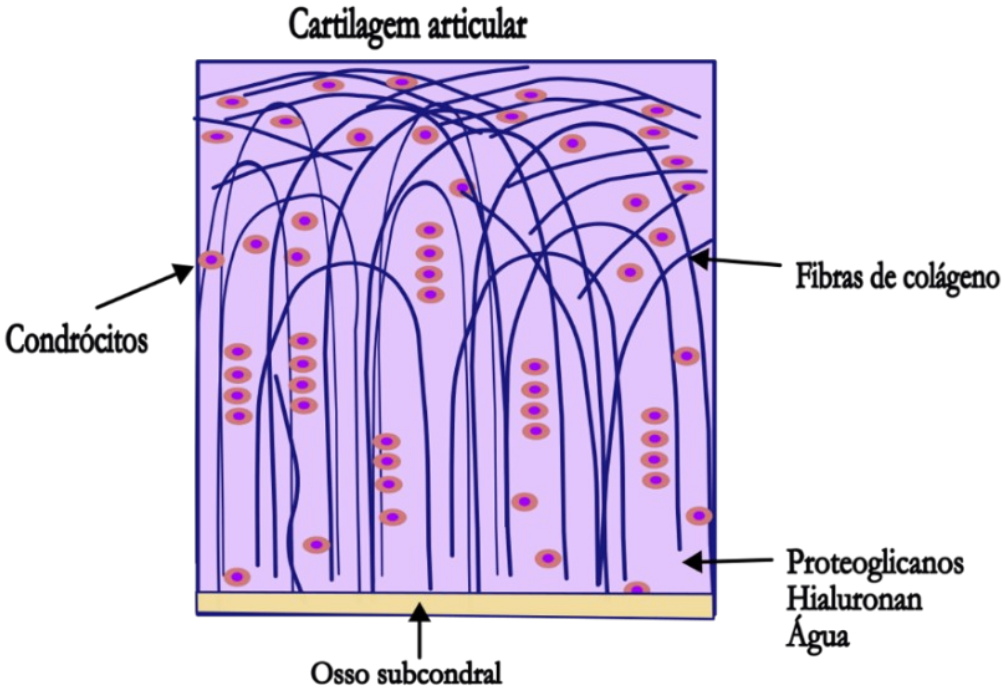

Figura 3. Composição da cartilagem articular.

A membrana sinovial recobre a articulação onde não há a presença de cartilagem. É um tecido do tipo mesenquimal modificado que consiste em duas camadas, a íntima e a subíntima. Sua camada íntima é bem vascularizada, com capilares fenestrados, que são responsáveis por produzir um ultrafiltrado plasmático e permanece em contato com a cavidade articular; já camada subíntima apresenta tecido conectivo e fica em contato com a capsula fibrosa. Além das células do tecido conjuntivo e leucócitos, a camada íntima possui dois tipos celulares especializadas, os sinoviócitos do tipo A e do tipo B (figura 4) (16,1,15,6). Os sinoviócitos do tipo A possuem função similar aos macrófagos, removendo resíduos do líquido sinovial e os do tipo B apresentam função secretória, secretando proteínas (ácido hialurônico, colágeno, lubricin, pro-metaloproteinases de matrix, interleucinas e proteoglicanos) para ela mesma e para o ultrafiltrado plasmático, que compõem o líquido sinovial (16,17,1,15,6).

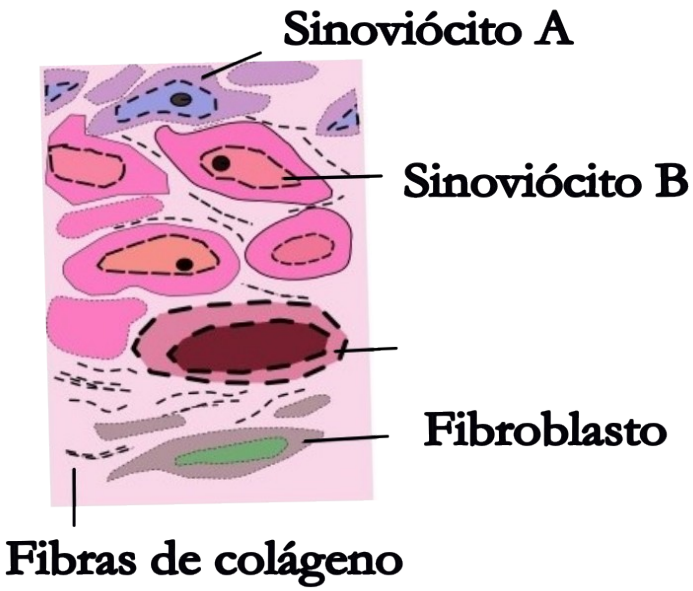

Figura 4. Composição da membrana sinovial

O líquido sinovial é um ultrafiltrado plasmático, acrescido de ácido hialurônico de alto peso molecular e proteoglicanos, que devido as suas características reológicas, apresenta função de amortecimento da articulação e lubrificação das extremidades ósseas, garantindo junto à cartilagem articular o deslizamento sem atrito das junções ósseas (18,1,6). O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano não ramificado de alto peso molecular, que está presente em diversos tecidos do corpo. A molécula de alto peso tem a capacidade de se ligar de 10 a 10.000 vezes seu peso em moléculas de água, devido a isto, a molécula ativa hidratada, é capaz de preencher o espaço, amortecendo o impacto e agindo ainda como lubrificante. Além de atuar no líquido sinovial, o ácido hialurônico é um importante componente da matriz extracelular (19,20).

Assim como em atletas humanos, as articulações de equinos atletas são constantemente expostas a impactos. A alta demanda biomecânica exigida nas competições pode predispor estes animais a inúmeras lesões ortopédicas (21,2). O processo inflamatório articular se inicia após a exposição da membrana sinovial a moléculas especificas, advindas de microrganismos ou de agressões estéreis, causando estresse celular e dano à matriz extracelular(7). As moléculas podem ser ligadas ou não à presença de um agente infeccioso, e são chamadas de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) ou DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos) (9).

A inflamação da membrana sinovial é denominada sinovite, frequentemente acompanhada pela liberação de diversos mediadores inflamatórios, tornando-se um fator

predisponente para o desenvolvimento da osteoartrite (OA)(4,3). Com a liberação de mediadores inflamatórios no líquido sinovial, há a quebra do ácido hialurônico, em moléculas de baixo peso molecular, perdendo assim o seu potencial viscoelástico, corroborando para o agravamento do processo inflamatório (6).

Pesquisas recentes buscam métodos capazes de modificar o curso e progressão desta enfermidade. Atualmente a terapia medicamentosa é baseada na administração de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), corticosteroides, glicosaminoglicanos polissulfatadas (PSGAGs), N-acetilglucosamina (NAG), ácido hialurônico (AH), ou ainda uma combinação entre alguns destes princípios (22,23). De forma contraditória, o tratamento da sinovite com anti-inflamatórios esteroidais, que consiste em debelar a reação inflamatória, também contribui para a degradação da cartilagem articular. Por isso, diversas terapias são continuamente estudadas, como os repositores de viscosidade do líquido sinovial(24).

O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano de cadeia simples não ramificado e não sulfatado, presente em diversos tecidos e fluídos do corpo. A molécula do ácido hialurônico é composta pela repetição dos dissacarídeos ácido D- glicurônico e N- acetil- D glucosamina, sendo conectadas através da via beta (1,3) e (1,4) glicosídica (25,26,27,28). Ele possui papel importante na estruturação de tecidos (como na matriz extracelular) (figura 5) e através de sua característica de se ligar a moléculas de água, possui capacidade de preencher espaços, desempenhando função de amortecimento dentro do ambiente articular (29,20).

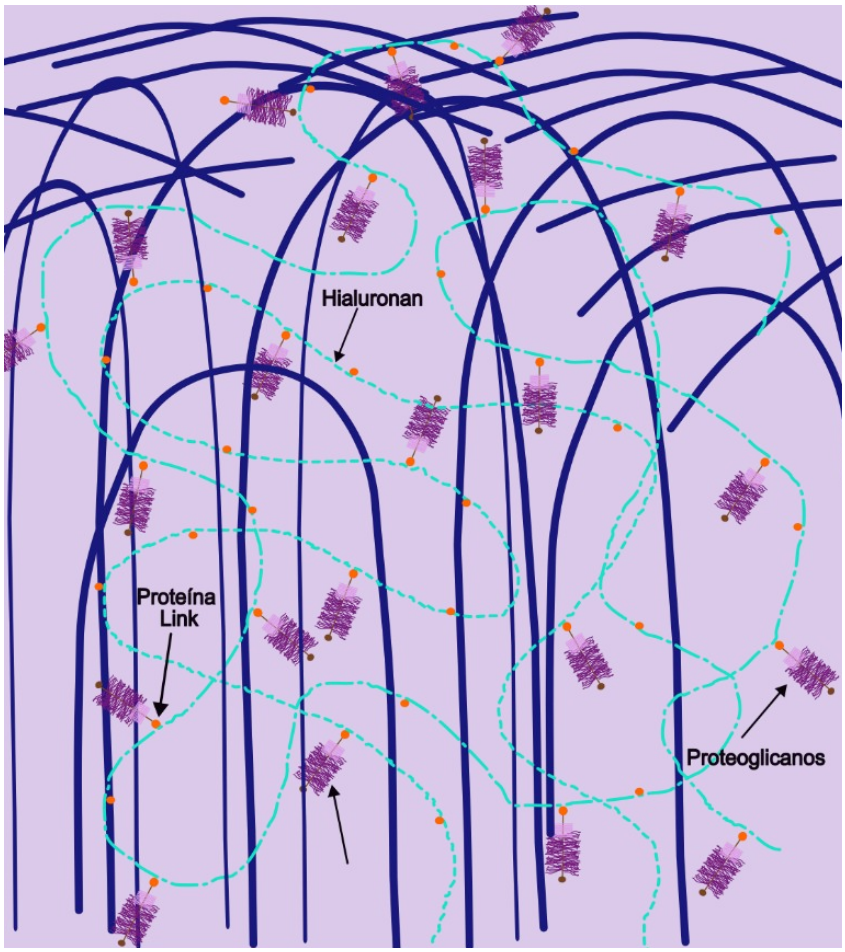

Figura 5. Ácido hialurônico na matriz extracelular

A síntese do ácido hialurônico ocorre através das enzimas HA sintases (HAS) localizadas na membrana plasmática das células (figura 6). Estas enzimas se ligam aos precursores dos dissacarídeos que compõem a molécula de ácido hialurônico, UDP-glucuronato e UDP-N-acetilglicosamina, que doam os dissacarídeos ácido D-glicurônico e o N-acetil-D-glucosamina (respectivamente) à enzima, estas constroem as cadeias de ácido hialurônico, alternando os dissacarídeos e as excretando para fora da célula no espaço extracelular(28,27). A ativação das HAS ocorre através da disponibilidade e concentração dos seus substratos e, além disso, podem sofrer estímulos a partir da presença de citocinas, como o fator de crescimento transformador beta (TGF-β), que é capaz de estimular a produção do ácido hialurônico, enquanto o fator de necrose tumoral pode inibir(30,31).

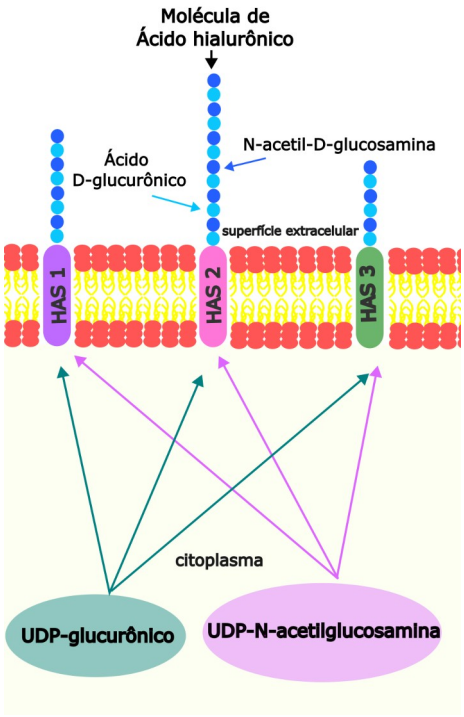

Figura 6. Síntese do ácido hialurônico.

O ácido hialurônico exerce função física e química, no líquido sinovial através de sua capacidade de se ligar a moléculas de água e preencher espaços, promove a característica viscoelástica ao líquido e amortecer o impacto das estruturas articulares durante o movimento(18,13,32). Unido ao lubricin e a fosfolipídeos, ele ainda promove a lubrificação da superfície da cartilagem, fazendo com que o movimento seja livre de atritos, promovendo o deslizamento das superfícies articulares(33,34). Como função química, ele promove a sinalização celular, interagindo com receptores presentes na membrana celular promovendo não apenas ações benéficas, mas à partir do seu peso molecular, também pode apresentar estímulos inflamatórios(35,32,29,36).

O ácido hialurônico atua como um sinalizador ao ligar-se a receptores (proteínas de ligação) presentes na membrana plasmática de células, como neste caso, condrócitos, sinoviócitos, macrófagos e linfócitos, atuando na regulação do comportamento celular, na motilidade, adesão e no processo de multiplicação celular. Acredita-se que o ácido hialurônico possa modular o tráfego de quinases específicas dentro da célula, regulando o comportamento celular (29,37).

O receptor de superfície CD44 é expresso em diversas células, sendo sintetizado como uma glicoproteína transmembrana de passagem única, ele é o principal receptor da molécula de ácido hialurônico, participando de uma série de processos fisiológicos, ativando cascatas de sinalização, iniciando a expressão de genes relacionados ao crescimento e

sobrevivência celular (29,36,38). O CD44 pode interagir com componentes extracelulares solúveis e com a matriz extracelular, sendo esta capacidade regulada de dentro da célula (39).A ação estimulada pela ligação ao CD44 depende do peso molecular da molécula de ácido hialurônico. A molécula de baixo peso molecular age como DAMP, sendo que sua ligação promove a maturação e ativação das células dendríticas, liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL1-β, TNF-α, IL-6, e a IL-12) por diversas células que expressam o receptor CD44, estimula a migração e a multiplicação celular. A interação da molécula de alto peso molecular inibe a angiogênese, a proliferação e a diferenciação celular (40,36,29,38,41).

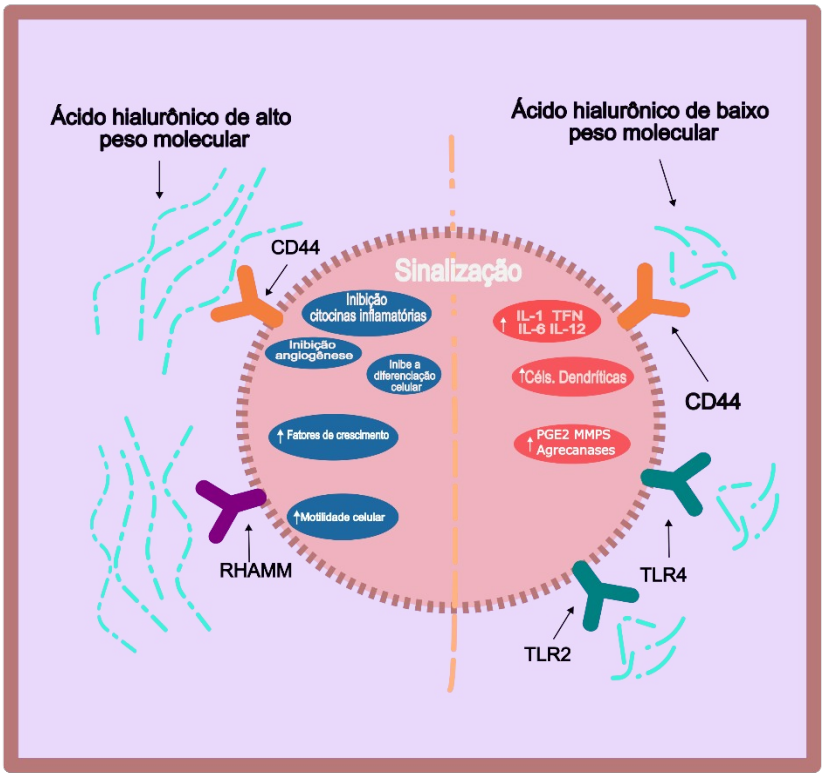

Figura 7. Receptores celulares e suas interações com diferentes pesos moleculares de ácido hialurônico

Os fragmentos de baixo peso molecular do ácido hialurônico ainda são capazes de interagir com receptores Toll-like 2 e 4, que também promovem o ambiente inflamatório, (40). Esses mediadores inflamatórios induzidos pelo ácido hialurônico podem aumentar a resposta inflamatória que já foi posta em movimento, enviando o sistema para um ciclo de feedback positivo onde a inflamação promove mais inflamação, que, se não for controlada, pode eventualmente levar à fibrose(29).

A presença e qualidade do ácido hialurônico no líquido sinovial impacta diretamente a saúde articular, o uso desse glicosaminoglicano no tratamento de doenças articulares já é estabelecido como um dos tratamentos de escolha, oferecendo qualidade de vida e preservando a cartilagem articular.

REFERÊNCIAS

[1] AUER, J. A. et al. **Equine surgery**. Fifth edition ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2019.

[2] BROSSI, P. M. et al. Platelet-rich plasma in orthopedic therapy: a comparative systematic review of clinical and experimental data in equine and human musculoskeletal lesions. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 98, 22 abr. 2015.

[3] SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 11, p. 625–635, nov. 2010.

[4] ROSS, T. N. et al. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: a comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 12, p. 1583–1590, 1 dez. 2012.

[5] SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, Osteoarthritis. v. 51, n. 2, p. 249–257, 1 ago. 2012.

[6] STASHAK, T. S.; BAXTER, G. M. **Adams and Stashak's lameness in horses**. 7th edition ed. Hoboken: wiley Blackwell, 2020.

[7] PICCININI, A. M.; MIDWOOD, K. S. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, n. 1, p. 672395, 2010.

[8] HASHKES, P. J.; LAXER, R. M.; SIMON, A. (EDS.). **Textbook of Autoinflammation**. Cham: Springer International Publishing, 2019.

[9] ARLEEVSKAYA, M. I. et al. Toll-Like Receptors, Infections, and Rheumatoid Arthritis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 58, n. 2, p. 172–181, 1 abr. 2020.

[10] CARON, J. P. Intra-Articular Injections for Joint Disease in Horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, New Therapies for Joint Disease. v. 21, n. 3, p. 559–573, 1 dez. 2005.

[11] GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 1, p. 51–69, 1 jan. 2006.

[12] **Manual Farmacológico Veterinario Plumb**. [s.l: s.n.].

[13] NEUENSCHWANDER, H. M. et al. Hyaluronic acid has chondroprotective and joint-preserving effects on LPS-induced synovitis in horses. **Journal of Veterinary Science**, v. 20, n. 6, p. e67, 2019.

[14] MISRA, S. et al. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 6 maio 2015.

[15] MESCHER, A. L.; JUNQUEIRA, L. C. U. **Junqueira's basic histology: text and atlas**. Fifteenth edition ed. New York: Mcgraw-Hill Education, 2018.

[16] WANG, G. et al. Changes in Synovial Fluid Inflammatory Mediators and Cartilage Biomarkers After Experimental Acute Equine Synovitis. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 59, n. 1, p. 129–134, 1 mar. 2015.

[17] LONGOBARDI, L. et al. Synovial Joints: from Development to Homeostasis. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 1, p. 41–51, 1 fev. 2015.

[18] MCILWRAITH, C. W. et al. (EDS.). **Joint disease in the horse**. Second edition ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016.

[19] OLIVEIRA, J. M. et al. (EDS.). **Osteochondral Tissue Engineering: Challenges, Current Strategies, and Technological Advances**. Cham: Springer International Publishing, 2018. v. 1059

[20] KOBAYASHI, T.; CHANMEE, T.; ITANO, N. Hyaluronan: Metabolism and Function. **Biomolecules**, v. 10, n. 11, p. 1525, 7 nov. 2020.

[21] COLBATH, A. C. et al. Induction of Synovitis Using Interleukin-1 Beta: Are There Differences in the Response of Middle Carpal Joint Compared to the Tibiotarsal Joint? **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, 31 ago. 2018.

[22] FRISBIE, D. D. et al. Evaluation of topically administered diclofenac liposomal cream for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. 1 fev. 2009.

[23] FRISBIE, D. D. et al. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. 1 fev. 2009.

[24] BORZACCHIELLO, A. et al. Effect of hyaluronic acid amide derivative on equine synovial fluid viscoelasticity. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 92A, n. 3, p. 1162–1170, 2010.

[25] GUPTA, R. C. et al. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, p. 192, 25 jun. 2019.

[26] KIM, Y. S.; GUILAK, F. Engineering Hyaluronic Acid for the Development of New Treatment Strategies for Osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8662, 4 ago. 2022.

[27] CAON, I. et al. Cell Energy Metabolism and Hyaluronan Synthesis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 35–47, 1 jan. 2021.

[28] DEANGELIS, P. L.; ZIMMER, J. Hyaluronan synthases; mechanisms, myths, & mysteries of three types of unique bifunctional glycosyltransferases. **Glycobiology**, v. 33, n. 12, p. 1117–1127, 30 dez. 2023.

[29] MISRA, S. et al. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 6 maio 2015.

[30] LI, L. et al. Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB. **Biochemical Journal**, v. 404, n. 2, p. 327–336, 14 maio 2007.

[31] JIANG, D.; LIANG, J.; NOBLE, P. W. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 221–264, jan. 2011.

[32] MASUKO, K. Anti-inflammatory effects of hyaluronan in arthritis therapy: Not just for viscosity. **International Journal of General Medicine**, p. 77, abr. 2009.

[33] GONZALES, G. et al. Grafting of cationic molecules to hyaluronic acid improves adsorption and cartilage lubrication. **Biomaterials Science**, v. 12, n. 18, p. 4747–4758, 2024.

[34] RUGGIERO, A. Milestones in Natural Lubrication of Synovial Joints. **Frontiers in Mechanical Engineering**, v. 6, p. 52, 31 jul. 2020.

[35] AKMAL, M. et al. The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**, v. 87-B, n. 8, p. 1143–1149, ago. 2005.

[36] VIGETTI, D. et al. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 8, p. 2452–2459, ago. 2014.

[37] KOBAYASHI, T.; CHANMEE, T.; ITANO, N. Hyaluronan: Metabolism and Function. **Biomolecules**, v. 10, n. 11, p. 1525, 7 nov. 2020.

[38] WENG, X. et al. The membrane receptor CD44: novel insights into metabolism. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 33, n. 5, p. 318–332, maio 2022.

[39] PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 33–45, jan. 2003.

[40] RUPPERT, S. M. et al. Tissue integrity signals communicated by high-molecular weight hyaluronan and the resolution of inflammation. **Immunologic Research**, v. 58, n. 2–3, p. 186–192, maio 2014.

[41] ALTMAN, R. et al. Anti-Inflammatory Effects of Intra-Articular Hyaluronic Acid: A Systematic Review. **CARTILAGE**, v. 10, n. 1, p. 43–52, jan. 2019.

CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido para a revista:

Journal of Veterinary Science

(Sob as normas vigentes disponíveis em: https://vetsci.org/index.php?body=instructions)

Clinical Trial and Protocol

Veterinary Clinical Sciences

Avaliação do ácido hialurônico de alto peso molecular como tratamento da sinovite experimental em equinos

Marcela dos Santos **Ribeiro** [1,†], VittoriaGuerra **Altheman**[1,†],Anna Paula Balesdent **Barreira** [2,†], Lorena Cardozo **Ferrari**[1,†], Carlos Alberto **Hussni**[1,†],Celso Antonio **Rodrigues**[1,†],Marcos Jun **Watanabe**[1,†],Gustavo Dos Santos **Rosa**[1,†],Heitor **Cestari**[1,†], Letícia de Oliveira **Cota**[3,†], **Raquel Yvonne Arantes Baccarin**[3,†], Ana Liz Garcia **Alves**[1,*].

[1] Departamento de Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu- FMVZ/UNESP - Botucatu, SP, Brasil;

[2] Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil.

[3] Departamento de Clínica Médica , Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil.

Ana Liz Garcia **Alves**

Departamento de Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e

Zootecnia de Botucatu- FMVZ/UNESP - Botucatu, SP, Brasil

E-mail: ana.liz@unesp.br, ORCID: https://orcid.org/0000-0001-9092-7819

***ORCID**

Marcela dos Santos **Ribeiro**: https://orcid.org/0009-0008-8102-1941

VittoriaGuerra **Altheman**: https://orcid.org/0000-0003-0540-9932

Anna Paula Balesdent **Barreira**: https://orcid.org/0000-0002-1243-5939

Lorena Cardozo **Ferrari**: https://orcid.org/0000-0003-1477-865X

Carlos Alberto **Hussni**: https://orcid.org/0000-0003-1477-865X

Celso Antonio **Rodrigues**: https://orcid.org/0000-0002-4837-463X

Marcos Jun **Watanabe**: https://orcid.org/0000-0002-7317-4250

Gustavo Dos Santos **Rosa**: https://orcid.org/0000-0002-7444-4523

Heitor **Cestari**: https://orcid.org/0000-0002-2508-1906

Raquel Yvonne Arantes **Baccarin** : https://orcid.org/0000-0001-9730-0840

Letícia de Oliveira **Cota**: https://orcid.org/0000-0002-1328-6998

Conflito de interesse.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Financiamento: Esta pesquisa foi financiada pela empresa Botupharma®.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPQ (313089/2921-3) Brasil (código de financiamento 001), FAPESP Projeto:2018/09446-5, A empresa farmacêutica Botupharma®, patrocinadora do experimento.

Declaração de disponibilidade de dados os conjuntos de dados usados e/ou analisados durante o estudo atual estão disponíveis com o autor correspondente mediante solicitação razoável.

Avaliação do ácido hialurônico de alto peso molecular como tratamento da sinovite experimental em equinos

Resumo

Importância

A sinovite acomete frequentemente atletas, sejam equinos ou mesmo o homem. O surgimento de lesões no ambiente articular, alteram a homeostase articular, havendo a liberação de fatores inflamatórios no líquido sinovial. O processo inflamatório estabelecido, corrobora para a degradação condral, devido a liberação de interleucinas e metaloproteinases de matriz, sendo um fator predisponente para a osteoartrite.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tratamento com ácido hialurônico sobre a sinovite experimental aguda em equinos comparado a animais não tratados.

Métodos

A sinovite foi induzida em equinos adultos (n=16) na articulação rádio cárpica, sem alteração articular prévia com LPS(0,25ng) e após 12 horas da indução, receberam o tratamento, sendo o grupo tratado recebido ácido hialurônico (20mg/ml) de alto peso molecular(2.280KDa) e o grupo controle PBS (2ml). Os animais foram avaliados rigorosamente nos momentos 0 (imediatamente antes da indução da sinovite), 12, 24 e 48 horas após a indução e 7 e 14 dias após a indução da sinovite, através de exame ortopédico, ultrassonografia e termografia da articulação e do líquido sinovial. Os resultados das avaliações foram submetidos a teste de normalidade (Shapiro wilk) e aqueles que apresentaram comportamento paramétrico passaram pela ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. As análises não paramétricas passaram pelo teste de Mann-Whitney, sendo as comparações realizadas pelo teste de Friedman. A diferença estatística foi considerada quando $p<0,05$.

Conclusões e relevância

A suplementação com o ácido hialurônico foi eficaz em produzir analgesia nos animais tratados, tendo ainda se mantido estável na articulação por pelo menos 36 horas após sua aplicação, mantendo a presença de moléculas de alto peso molecular no ambiente articular.

Keywords: hialuronan, peso molecular, inflamação, líquido sinovial, articulação.

INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano não sulfatado e não ramificado, componente vital da matriz extracelular e do líquido sinovial, composto pela repetição dos dissacarídeos β1-3 D-N-acetylglucosamina e β1-4 D-ácido glicurônico. A molécula de ácido hialurônico, em boas condições, possui alto peso molecular, tendo ainda características hidrofílicas, que lhe confere propriedades reológicas e a capacidade de preencher espaços quando hidratada (1,2,3,4).

A qualidade do ácido hialurônico é diretamente relacionada ao tamanho de sua molécula, havendo a classificação de alto peso molecular, baixo peso molecular e de oligômeros. A molécula de alto peso molecular possui maior capacidade de se ligar a moléculas de água, o que lhe confere suas características reológicas, fornecendo maior capacidade de amortecimento. Moléculas de baixo peso molecular apresentam baixa capacidade de ligação a moléculas de água, o que faz com que elas percam sua característica reológica, diminuindo a viscosidade do líquido sinovial (5,6).

Na superfície cartilaginosa, a partir da interação com lubricin e fosfolipídeos, o ácido hialurônico promove a lubrificação, permitindo que as extremidades conectadas pela articulação deslizem sem atrito durante o movimento, sendo esta, mais uma (21,13,12)

Além de características protetoras, o ácido hialurônico age como um sinalizador celular, ao se ligar a receptores de membrana celular (7,8,3). O CD44 é o principal receptor da membrana celular para o ácido hialurônico. A interação da molécula de ácido hialurônico com o CD44 ocorre independentemente do tamanho da molécula, porém o tamanho da molécula de ácido hialurônico influencia diretamente no estímulo gerado por esta ligação, apresentando estímulo inflamatório quando ligado a moléculas de baixo peso molecular e a oligômeros, e efeito analgésico, anabólico e proliferativo na ligação com moléculas de alto peso molecular (7,9,8).

Além de seu uso como analgésico, são relatados efeitos positivos em culturas celulares, estimulando a proliferação celular e diferenciação de células tronco em condrócitos, agindo ainda sobre eles, estimulando a produção de colágeno, agrecan e ácido hialurônico de alto peso molecular. A presença do ácido hialurônico de alto peso molecular é capaz ainda de converter macrófagos ativados pela via clássica em macrófagos de via alternativa e ativar por essa via macrófagos em repouso (1,10,8,7).

Durante o processo inflamatório da membrana sinovial (sinovite), há a liberação de diversos fatores inflamatórios, além das interleucinas 1, 6 e 10 e fator de necrose tumoral, há ainda a liberação de hialuronidases, que são responsáveis pela degradação do ácido hialurônico. A degradação do ácido hialurônico pode resultar na quebra de moléculas de alto peso em moléculas menores, o que intensifica o processo inflamatório, gerando um turnover positivo. A perda da viscosidade e a presença de metaloproteínases de matriz (MMP) e outros fatores inflamatórios podem desencadear a degradação da cartilagem articular e predispor a presença da osteoartrite (11,12,2,13,3).

Interromper o processo inflamatório e melhorar as características reológicas do líquido sinovial é vital para a preservação da cartilagem articular e seu ambiente em geral. A utilização de anti-inflamatórios, apesar de promoverem a analgesia e melhorarem a qualidade de vida do paciente, não apresentam efeitos regenerativos, podendo ainda comprometer a vida atlética a longo prazo. O uso do ácido hialurônico como tratamento para a sinovite tem sido muito aceito por ortopedistas não apenas na medicina veterinária, mas também na medicina humana, apresentando ótimos resultados, fornecendo analgesia e qualidade de vida aos pacientes que fazem seu uso (9,14,11).

O objetivo do presente trabalho é avaliar equinos com sinovite induzida experimentalmente tratados e não tratados com o uso de ácido hialurônico de alto peso molecular. Serão avaliados

os aspectos físicos, celulares e químicos do líquido sinovial. Os animais ainda serão avaliados fisicamente através de exame ortopédico, ultrassonografia e termografia da região articular. Será avaliado ainda o comportamento do ácido hialurônico no líquido sinovial, através da mensuração da concentração e peso molecular.

MÉTODOS

Comitê de ética (CEUA)

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ /UNESP, registrada Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal - CONCEA com CIAEP nº 01.0115.2014 em 05/06/2014. O presente estudo foi protocolado (Protocolo CEUA 0172/2022) e aprovado, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794 (Lei Arouca), de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal.

Delineamento experimental

O estudo foi realizado no setor de Cirurgia de Grandes Animais, Laboratório de Análises Clínicas e Laboratório de Terapia Celular, todos pertencentes à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ, UNESP, Campus Botucatu e as análises do ácido hialurônico através da eletroforese no Laboratório de Cromatografia, no Departamento de Clínica Veterinária pertencente Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, USP, São Paulo. Os animais foram alocados no Biotério de grandes animais do departamento de cirurgia animal e reprodução veterinária em sistema semi-intensivo de criação, em piquetes coletivos de 25.000 m², área por animal de mínimo 100m². Receberam 2 kg de concentrado/dia, feno de tifton, acesso ao capim de pastoreio Coast Cross e água ad libitum, em comedouros e bebedouros coletivos.

Para o estudo foram selecionados 16 equinos, hígidos, sem raça definida, acima de 12 meses, sem distinção de sexo e sem alterações na articulação rádio cárpica. Para a seleção dos animais, foi realizada avaliação clínica, sendo constituída do exame físico geral, exame de sangue (hemograma completo e ureia, creatinina, FA, AST, GGT, albumina, glicose e CK), exame ortopédico e radiográfico da articulação em estudo. Para o monitoramento dos animais nos momentos experimentais foram realizados o exame clínico geral (frequência cardíaca, frequência respiratória, tempo de preenchimento capilar, coloração da mucosa, temperatura retal e motilidade intestinal), exame ortopédico, análise do líquido sinovial e exames de imagem da articulação. A distribuição dos animais nos grupos foi feita de forma randomizada, sendo o grupo Controle composto por 4 machos e 4 fêmeas, e o grupo Tratado composto por 6 machos e 2 fêmeas (n= 8 animais por grupo).

A sinovite foi induzida na articulação rádio cárpica, através da artrocentese do recesso rádio cárpico em sua face dorsal, havendo inicialmente a coleta de líquido sinovial (caracterizado como momento zero(0h)) seguida da administração de 2ml de solução estéril de PBS (1 Phosphate-Buffered Saline, ph 7.4 - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, EUA) acrescida de 0,25 ng de lipopolissacarídeo (LPS) proveniente de Escherichia coli sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich®. Saint Louis, Missouri, EUA).

Após 12 horas (momento 12h) da indução da sinovite, foram realizados os exames clínico geral, ortopédico e de imagem dos animais, seguido da artrocentese da articulação com coleta de líquido sinovial, seguido da administração do tratamento, sendo no grupo controle administrado 2ml de PBS e no grupo tratamento 2 mL do produto Pró-joint (ácido hialurônico com peso molecular de 2.280 Kilodaltons a 1%) (Botupharma®. Botucatu, São Paulo, Brasil). A partir do tratamento, as avaliações, incluindo a artrocentese para coleta do líquido sinovial foram realizadas nos momentos 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias após a indução da sinovite (respectivamente momentos 24h, 48h, D7 e D14)

Exame Ortopédico

O exame ortopédico foi realizado para seleção dos animais e em todos os momentos experimentais (D-2, 0h, 12h, 24h, 48h, 7d e 14d). O exame ortopédico foi composto pelas seguintes avaliações da articulação cárpica: distensão articular (efusão), claudicação ao passo, claudicação ao trote, claudicação ao trote após flexão (teste de flexão) (AEEP, 2022).

A verificação da distensão articular foi classificada de acordo com a percepção visual de aumento de volume de consistência flutuante, o que sugeriria a presença de efusão.

Artrocentese

As artrocenteses foram realizadas imediatamente antes da indução da sinovite no momento D0 (0h) e após 12h, 24h, 48h, 7d e 14d. Os animais foram sedados com cloridrato de xilazina a 10% na dose de 1mg/kg, por via intravenosa, na veia jugular, para a artrocentese do D0, quando houve a indução da sinovite. As demais artrocenteses aconteceram apenas com contenção física e flexão do membro submetido a sinovite experimental. A artrocentese foi realizada sempre pela mesma pessoa após a antissepsia. Para o procedimento, o membro a ser coletado foi mantido flexionado e havendo a punção com o uso de agulha hipodérmica 30x0,8 cm na face dorsal do recesso rádio cárpico da articulação em estudo. Em seguida, era acoplada seringa de 5 mL para coleta de 1 a 2 mL de líquido sinovial. As amostras foram acondicionadas em frascos a vácuo, com e sem anticoagulante (EDTA). As amostras foram encaminhadas sob refrigeração para os laboratórios de Análises Clínicas e Laboratório de Terapia Celular imediatamente após a coleta.

Indução da sinovite

A indução da sinovite ocorreu no momento D0, após a artrocentese. A articulação rádio-cárpica de cada animal foi infiltrada sob condições assépticas com solução estéril de 2 mL de PBS (1 Phosphate-Buffered Saline, ph 7.4 - Gibco (Thermo Fisher Scientific), Grand Island, New York, EUA) contendo 0,25 ng de lipopolissacarídeo LPS proveniente de *Escherichia coli*

sorotipo 055:B5 (Sigma-Aldrich®. Saint Louis, Missouri, EUA) (Neuenschwander et al., 2019).

Tratamento

O tratamento foi estabelecido por via intra-articular 12 horas após a indução da sinovite, na sequência da artrocentese, já descrita anteriormente. Nas articulações que compõem o Grupo Tratado foram administrados 2 mL do produto Pró Joint (Ácido hialurônico com peso molecular de 2.280 Kilodaltons 1%), enquanto no Grupo Controle, foram utilizados 2 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS). A dose e o período de tratamento foram pré-definidos pela empresa patrocinadora.

Análise do líquido sinovial

A análise do líquido sinovial teve por objetivo monitorara-lo durante todos os momentos experimentais e avaliar a influência sobre ele da administração do ácido hialurônico exógeno. A amostra foi submetida à análise para a determinação da celularidade (hemácias, neutrófilos, células mononucleares), física (volume, coagulação, coloração e aspecto) e química (pH, Glicose e Sangue oculto).

Para a análise química, a determinação do pH do líquido sinovial, da glicose e do sangue oculto, foi feita através do uso da fita reagente utilizada para urinálise. A densidade, proteína e o fibrinogênio foram avaliados através da refratometria do líquido sinovial.

Elisa do líquido sinovial

Os marcadores C2C (degradação do colágeno do tipo II) e CS846 (isótopo de condroitin sulfato, usado para marcar a síntese de cartilagem) foram avaliados através de ELISA, com kits comerciais (C2C - cat#60-1001-001 IBEX Parmaceuticals Inc.Montréal, Québec; Canada, CS846 cat#60-1004 IBEX Parmaceuticals Inc.Montréal, Québec, Canada) com técnica descrita pelo fabricante utilizando a amostra do líquido sinovial mantida no freezer -80C°.

Eletroforese do líquido sinovial

A eletroforese do líquido sinovial foi realizada segundo Neuenschwander et al. (2019) para a quantificação do ácido hialurônico e determinação do tamanho da molécula. Desta amostra, 50µL de cada animal, foram adicionados a 100µL de protease alcalina P126 maxatase (4mg/mL Tris HCL 0,05 pH 8,0) e foram incubados em banho-maria a 50°C, durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas em temperatura ambiente a 3000 G por 15 minutos para a separação e remoção de resíduos. O sobrenadante foi armazenado em um tubo de 600µL seco com vácuo, por 2 horas a 45°C. As amostras foram ressuspendidas em 25µL de água destilada. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose, em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05M e pH 9 (PDA), em cuba refrigerada, por aproximadamente 1 hora. Foram utilizados 5 µL de um padrão HS na concentração de 1mg/mL. Após a eletroforese, o ácido hialurônico foi fixado no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1% por pelo menos duas horas, sendo em seguida coberto com papel filtro e seco sob corrente de ar aquecida. O ácido hialurônico foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido com acetato de sódio 0,025 M. As lâminas foram escaneadas para a análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas.

Para a determinação do peso molecular a eletroforese foi feita utilizando géis de agarose a 1% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 0,04 M, pH 8 (acetato 0,02 M, EDTA 0,01 M). Os géis foram calibrados com HA de pesos moleculares conhecidos (Select-HA; Sigma-Aldrich), e dois padrões de HA de pesos moleculares conhecidos foram utilizados em cada placa de gel: HA de crista de galo, 2 mg/mL (peso molecular modal de 800 kDa) e HA de traqueia bovina, 1 mg/mL (peso molecular modal de 20 kDa). Após a eletroforese, os géis foram corados com azul de toluidina a 0,1% em tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 5, por 15 minutos, e o excesso de corante foi removido por lavagem com tampão acetato de sódio 0,025 M. Os

padrões de migração e as distâncias migradas foram medidos por densitometria. As distâncias de migração foram inversamente proporcionais ao logaritmo do peso molecular do HA (peso molecular baixo 0–500 kDa; peso molecular médio ≥ 500 e < 2.000 kDa; peso molecular alto ≥ 2.000 kDa).

Exame Ultrassonográfico

O exame ultrassonográfico foi realizado com equipamento Esaote, MyLab70 e transdutor linear de 8-17MHz. A aquisição da imagem ocorreu em triplicatas e corte longitudinal da articulação rádio cárpica, entre os tendões dos músculos extensores carpo radial e extensor digital longo. Foram mensuradas a espessura da membrana sinovial (MS) e quando notada a presença de líquido sinovial, foi realizada medida da distensão articular, representada pela distância entre a superfície óssea e a face externa da MS, incluindo, portanto, a MS e o LS. O local de mensuração foi estabelecido na epífise distal do osso rádio, a 4 milímetros distais do espaço articular, onde foi calculada a média entre as triplicatas.

Análise Estatística

O pressuposto de distribuição normal foi avaliado considerando uma abordagem matemática (teste de Shapiro Wilk) e visual (figura QQ plot) incorporada no PROC UNIVARIATE. Uma análise de inferência para modelos mistos lineares generalizados (GLMMs) (Proc Glimmix) foi utilizada para comparar a média entre os grupos controle vs tratamento (Tabela 2). As matrizes de covariância foram escolhidas a partir dos critérios de informação de AIC (Akaike's Information Criterion), AICC (Consistent Akaike's Information Criterion) e BIC (Bayesian Information Criterion). Como efeitos fixos foram considerados o grupo (G), dia (D) e a sua interação (G*D). O comando PDIFF foi utilizado para comparar as médias. Os resultados são mostrados como média ± erro padrão da média (EPM). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar o grupo tratamento vs controle. As comparações entre os dias dentro de cada grupo foram realizadas com o teste de Friedman.Os resultados são mostrados com mediana (Q1 e Q3). Diferença estatística foi considerada quando $p<0,05$.

RESULTADOS

Exame Ortopédico

O exame ortopédico foi realizado nos momentos 0, 12h, 24h, 48h, 7d e 14d.

Os grupos tratamento e controle apresentaram aumento das claudicações (ao trote, após a flexão e ao passo) e distensão articular após a indução da sinovite (momento 12h) em comparação ao momento 0h (antes da indução da sinovite).

No momento 24h (12 horas após a aplicação do ácido hialurônico ou placebo), os animais do grupo tratado não apresentaram mais sinais de claudicação na avaliação ao trote e após a flexão. Já no grupo controle, a claudicação foi mais intensa (momento 24h e 48h) em relação ao grupo tratado e retornou aos valores basais somente no sétimo dia (7D) após a indução da sinovite (Tabela 1, Figura 1).

Da mesma forma, na claudicação ao passo, o retorno aos valores basais ocorreu mais rapidamente no grupo tratado (momento 24h) em relação ao grupo controle (momento 48h). E, o escore de claudicação foi significativamente maior no grupo controle comparado ao grupo tratado.

A distensão articular apresentou valores semelhantes aos iniciais (0h) no grupo tratado no momento 24h (12 horas da aplicação do ácido hialurônico), já no grupo controle, a distensão cessou somente no momento 48h.

Tabela 1. Mediana (Q1 e Q3) dos parâmetros de claudicação ao passo, claudicação ao trote, claudicação após a flexão e distensão/efusão articular avaliados no exame ortopédico nos momentos 0h, 12h, 24h, 48h, 7dias e 14 dias no grupo controle e grupo tratado.

Parâmetros		**0h**	**12h**	**24h**	**48h**	**7D**	**14D**
Claud. ao trote (0-5)	Controle	0(0 - 0)^{A}	2,5 (2 - 3)^{B}	2 (1,2 - 2,7)^{a}	2 (1 - 2)^{a}	0(0 - 0,7)^{A}	0 (0 - 0,7)
	Tratamento	0(0 - 0)^{A}	2 (1 - 2,7)^{B}	1 (0 - 1)^{bA}	1 (0 - 1)^{b}	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
Claud. após flexão (0-5)	Controle	0(0 - 0)^{A}	2,5 (2 - 3)^{B}	2 (2 - 3)^{a}	2 (2 - 2)^{a}	0(0 - 1,5)^{A}	0 (0 - 1,7)
	Tratamento	0(0 - 0)^{A}	2 (1,2 - 2,7)^{B}	1 (0,2 - 1,7)^{bA}	1 (0 - 1)^{b}	0 (0 - 0,7)	0 (0 - 0)
Claud. ao passo (0-5)	Controle	0(0 - 0)^{A}	2,5 (2 - 3) ^{B}	2 (1 - 2,7)^{a}	1,5 (1 - 2)^{aA}	0 (0 - 0,7)	0 (0 - 0)
	Tratamento	0(0 - 0)^{A}	1 (0 - 2,7)^{B}	0 (0 - 1,7)^{bA}	0 (0 - 0,7)^{b}	0 (0 - 0,7)	0 (0 - 0)
Distensão articular (0-4)	Controle	0(0 - 0)^{A}	1 (1 - 1,7)^{B}	1 (1 - 2)	1 (0,2- 1,7)^{A}	0 (0 - 1)	0 (0 - 0)
	Tratamento	0(0 - 0)^{A}	2 (1 - 2,7)^{B}	1 (1 - 1)^{A}	1 (0 - 1)	0 (0 - 0,7)	0 (0 - 0)

a-b Letras diferentes numa mesma coluna indicam diferença estatística (p <0,05) entre grupos dentro de cada momento. A-B Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística (p <0,05) entre momento 0h e momento pós-inflamação (12h); momento 0h e retorno aos valores basais dentro de cada grupo.

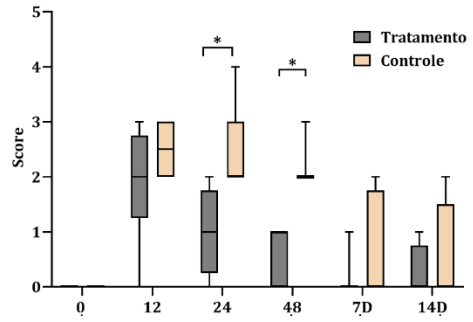

Figura 1. Mediana dos escores do exame de claudicação ao trote após flexão nos momentos experimentais no grupo tratamento e grupo controle ao longo dos momentos do protocolo experimental, com análise estatística entre grupos e entre momentos. O intervalo de confiança adotado foi 95%.

Exame ultrassonográfico

As imagens ultrassonográficas basais caracterizaram higidez articular inicial dos animais experimentais. Após a indução da sinovite (momento 12 horas) o grupo controle apresentou aumento na espessura da membrana sinovial, apesar de o grupo tratamento não apresentar diferença entre momentos, não houve diferença entre os grupos (figura 2). No momento 24 horas houve diferença significativa entre os grupos, tendo o grupo tratamento mantido o valor basal (não apresentou alteração na espessura da membrana sinovial) e o grupo controle tendo alcançado seu pico de elevação. Apesar de os grupos não apresentarem diferença significativa entre si nos momentos experimentais restantes, o grupo controle não retornou a valores basais, enquanto o grupo tratamento se manteve em todos os momentos sem apresentar diferença significativa em relação ao momento basal.

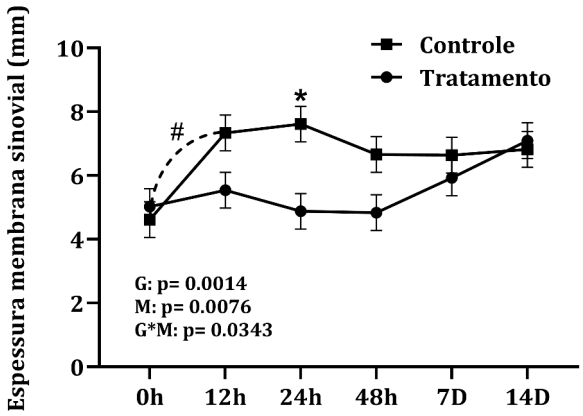

Figura 2. Espessura média da membrana sinovial da articulação rádio cárpica submetida ao tratamento (ácido hialurônico e PBS) dos grupos tratamento e controle ao longo dos momentos experimentais. Foi realizada análise estatística entre grupos e momentos, considerando intervalo de confiança de 95%, com o asterisco representando diferença entre grupos no mesmo momento e a hashtag representando diferença entre os momentos dentro de um mesmo grupo.

Análise do líquido sinovial

Análise física

Na análise física do líquido sinovial os parâmetros de volume, cor, aspecto e coagulação se mantiveram dentro da normalidade nos grupos tratado e controle em todos os momentos experimentais. A densidade do líquido sinovial aumentou significativamente após a indução da sinovite em ambos os grupos, sendo que no grupo tratado os valores retornaram à normalidade no momento 24h (12h após a aplicação do ácido hialurônico) enquanto no grupo controle, o retorno se deu no momento 48h.

Análise Química

Segundo a análise química do líquido sinovial, a indução da sinovite aumentou somente os níveis de concentração de proteínas e fibrinogênio tanto no grupo tratado quanto no grupo controle, e ambos retornaram à normalidade no momento. O pH do líquido sinovial, presença de sangue oculto e glicose apresentaram variações nos momentos entre 48h e 7 dias, no entanto, na análise intragrupo, não houve diferenças significativas entre o momento 0h (valores basais) e os demais momentos experimentais até o final do estudo.

Análise de Celularidade

A indução da sinovite levou ao aumento significativo de hemácias e neutrófilos no líquido sinovial, comprovando a ação do agente indutor (tabela 2). Ao fim do experimento a quantidade de hemácias e neutrófilos voltou a normalidade em 7 dias após a indução em ambos os grupos. Não foi observada diferença entre os grupos em nenhum momento experimental.

Tabela 2. Valores da contagem (log ±erro padrão) de hemácias e neutrófilos e mediana (Q1 e Q3) dos valores de macrófagos e eosinófilos detectados no líquido sinovial nos momentos 0h, 12h, 24h, 48h, 7dias e 14 dias no grupo controle e grupo tratado.

Células		**0h**	**12h**	**24h**	**48h**	**7D**	**14D**
Hemácias (Log)	Controle	1,9±0,4 ^{A}	5,4±0,4^{B}	5,5 ± 0,4	5,0 ± 0,4	2,1±0,4^{A}	2,0±0,4
	Tratamento	2,0±0,4 ^{A}	4,7±0,4^{B}	5,0 ± 0,4	5,3 ± 0,4	3,7±0,4^{A}	3,0±0,4
Neutrófilos (Log)	Controle	0,7±0,1^{A}	4,5±0,1^{B}	4,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	1,5±0,1^{A}	1,4 ± 0,1
	Tratamento	0,4 ±0,1 ^{A}	4,1±0,1 ^{B}	3,7 ± 0,1	3,3 ± 0,1	0,9±0,1^{A}	1,2 ± 0,1
Céls Mononucleares (céls/µL)	Controle	156±76,3	4593±788	4617±1199	2738±576^{A}	372±22^{B}	288±40,3
	Tratamento	204±180	4881±2393	2690±283	2917±695	624±298	220±28,2
Eosinófilos (céls/µL)	Controle	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
	Tratamento	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)

a-b Letras diferentes entre a coluna indica diferença estatística (p <0,05) para cada parâmetro ao comparar o grupo controle vs tratamento dentro de cada momento. A-B Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística (p <0,05) entre momento 0h e momento pós-inflamação (12h); momento 0h e retorno aos valores basais dentro de cada grupo.

Biomarcadores de degradação da matriz extracelular

No ensaio de ELISA para o biomarcador de degradação de colágeno (C2C), houve diferença significativa entre o momento zero e 24h após a indução da lesão em ambos os grupos, quando foi observada maior concentração de C2C, reduzindo gradativamente aos valores próximos aos basais no dia 7. (Figura 3).

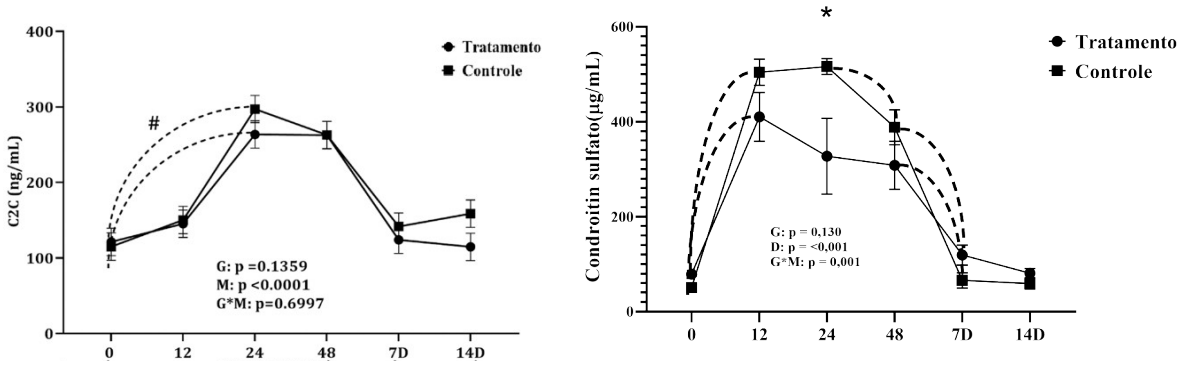

Figura 3. Mensuração da concentração dos biomarcadores condroitin sulfato e do C2C no líquido sinovial dos grupos controle e tratado com ácido hialurônico em todos os momentos experimentais. O intervalo de confiança adotado foi de 95%. A diferença entre momentos foi representada pela hashtag (#).

Na eletroforese do condroitin sulfato não, os grupos apresentaram aumento nas concentrações de condroitin sulfato após a indução da sinovite (momento 12 horas), no momento 24 horas (após o tratamento) os grupos apresentaram diferença entre si, sendo o grupo controle tendo apresentado valores maiores que o grupo tratamento. A partir do momento 48 horas, os grupos deixaram de apresentar diferença significativa entre ele, reduzindo a concentração até o momento 7 dias, quando retornaram a valores próximos ao basal. apresentaram diferenças significativas na avaliação entre os grupos no mesmo momento nem dentro do mesmo grupo em diferentes momentos.

Eletroforese do ácido hialurônico

A eletroforese do líquido sinovial foi realizada para a quantificação do ácido hialurônico no ambiente articular (ácido hialurônico) e determinação do peso molecular, sendo analisadas as amostras de todos os momentos de coleta (0h, 12h, 24h, 48h, 7d e 14d) em ambos os grupos.

Na concentração total do ácido hialurônico momento 24h (12 horas após a administração intra-articular do ácido hialurônico), pode-se observar o aumento significativo em sua concentração no líquido sinovial, que apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle. No momento 48 horas após a indução da sinovite a concentração do ácido

hialurônico ainda se manteve significativamente aumentada e diferindo do grupo controle (Figura 4). Na concentração dividida pelos pesos moleculares, temos o peso fisiológico (que no momento basal apresentou valores entre 6.000 e 20.000 KDa) sofrendo uma queda em sua concentração, tendo seu retorno a valores próximos aos basais após 7 dias. Na concentração das moléculas de alto peso molecular (categoria em que se enquadra o produto utilizado) há o aumento da concentração no grupo tratamento no momento 24 horas, se estendendo até pelo menos o momento 48 horas, retornando aos níveis basais no momento 14 dias. Na concentração das moléculas de baixo peso molecular, pode-se observar que elas estão praticamente ausentes nos animais saudáveis, mas após a indução da sinovite há o aumento em sua concentração (momento 12 horas) que se mantém até o momento14 dias, quando retornam a valores basais.

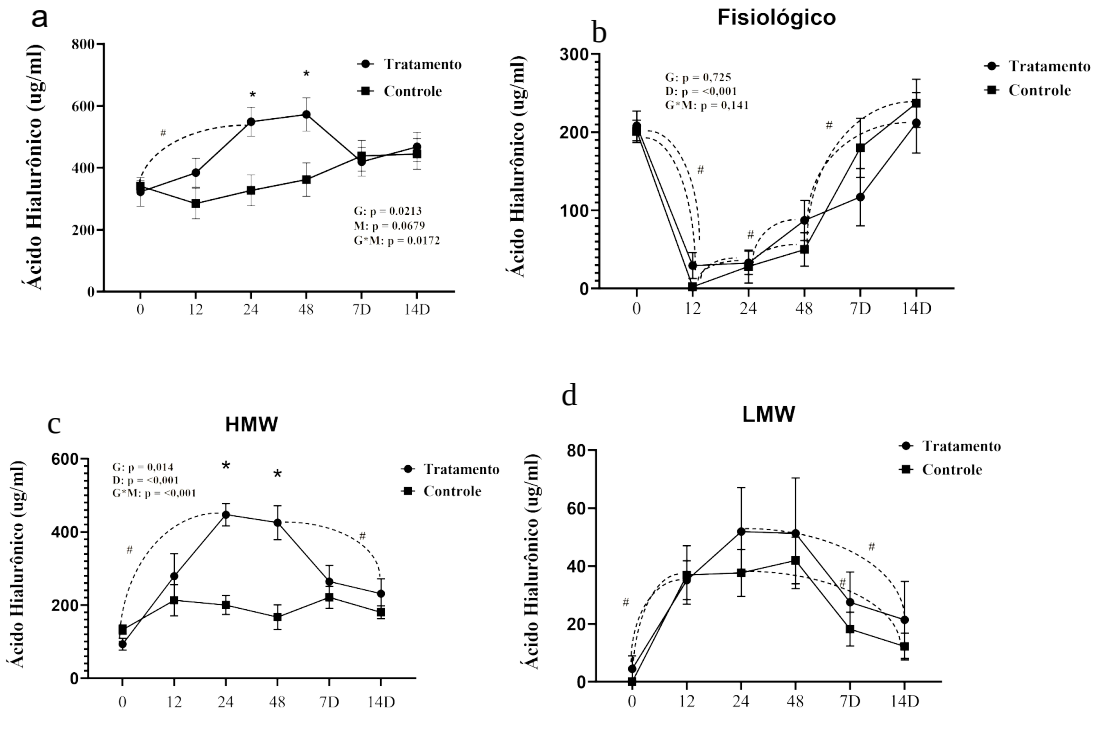

Figura 4. Concentração do ácido hialurônico no líquido sinovial através de exame de eletroforese dos equinos induzidos a sinovite experimental dos grupos controle e tratados com ácido hialurônico, ao longo dos momentos do protocolo experimental. a) concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial, apresentando o aumento da concentração no grupo tratamento após a suplementação, que se manteve até o momento 48 horas; b) concentração de moléculas de tamanho fisiológico; c) concentração de ácido hialurônico de alto peso molecular (referente ao peso do produto utilizado), demonstrando seu aumento após a suplementação no momento 12 horas e mantendo-se até o momento 48 horas; d) concentração de ácido hialurônico de baixo peso molecular. Nos gráfico b, c e d pode-se observar a redução do peso molecular no momento 12 horas. O intervalo de confiança adotado foi de 95%. A diferença entre momentos foi sinalizada com *hashtag* (#) e a diferença entre grupos com asteriscos (*).

DISCUSSÃO

A viscossuplementação com moléculas de alto peso molecular tem o intuito de modular o ambiente articular. A partir do estímulo inflamatório há a liberação não apenas de citocinas inflamatórias, mas também a quebra de moléculas de ácido hialurônico em baixo peso molecular, que são capazes de se ligar a receptores inflamatórios, sinalizando para que haja a intensificação deste processo, provocando assim um turnover, onde a inflamação gera mais inflamação. O uso do ácido hialurônico de alto peso molecular visa a interrupção desse turnover, pela sua preferência em se ligar a receptor

A administração do LPS foi capaz de promover a quebra das moléculas fisiológicas, reduzindo sua concentração no momento 12 horas o que ocasionou o aumento de moléculas de baixo peso molecular. As moléculas de baixo peso molecular mantiveram-se presentes no líquido sinovial até o momento 14 dias, sendo ainda o momento em que há o retorno da concentração basal das moléculas de peso fisiológico no líquido sinovial. A presença de moléculas de baixo peso molecular no líquido sinovial, como já abordado, intensifica o processo inflamatório, estimulando que as células liberem citocinas através da sua ligação com os receptores CD44 e Toll like 2 e 4, propiciando a degradação da cartilagem articular. No momento 24 horas, 12 horas após o tratamento, os grupos apresentaram diferença significativa na concentração de moléculas de alto peso molecular, tendo o grupo tratado, como esperado, o aumento da sua concentração, enquanto o grupo controle manteve sua concentração em níveis basais durante todo o experimento. Após a administração do ácido hialurônico de alto peso molecular, as moléculas se mantiveram estáveis, mantendo o peso e concentração até pelo menos o momento 48 horas, totalizando 36horas de estabilidade dentro da articulação. A presença dessas moléculas estimula a modulação do ambiente inflamatório, diminuindo a liberação de fatores inflamatórios e aumentando a presença de fatores pró reparação.

Neuenschwander et al., (2019) observaram resultado similar sete horas após a administração de ácido hialurônico de alto peso molecular, apresentando diferença significativa em relação ao momento basal do estudo. Porém, a concentração diminuiu a partir de 23 horas após a administração do ácido hialurônico, permanecendo com concentração inferior a basal (15).

A análise dos escores do exame de claudicação ao trote e claudicação após flexão apresentaram diferença significativa entre os grupos. Em ambos os grupos, a claudicação progrediu gradativamente de modo a alcançar o pico de elevação no momento de avaliação 12 horas. No momento 24horas, os grupos tratamento e controle apresentavam diferença significativa entre si, sendo que o grupo tratado apresentou menor grau de claudicação em relação ao grupo controle (grau I e grau II respectivamente), o que ocorreu até o momento 7 dias, momento que o grupo controle retornou aos valores basais. A redução da claudicação do grupo tradado cursou junto ao aumento da concentração de ácido hialurônico de médio peso molecular no líquido sinovial, sendo a diferença entre grupos presentes nos mesmos momentos experimentais (menor grau de claudicação e maior concentração de ácido hialurônico).

Assim como no presente estudo, Niemelä; Tulamo; Hielm-Björkman (2016), observaram melhora na claudicação após o teste de flexão em equinos com claudicação tratados com ácido hialurônico (n=14), tendo o grupo controle (n=13) não apresentado melhora durante o experimento (16). Leighton et al. (2014) realizaram um estudo em pacientes humanos, com osteoartrite do joelho, sendo comparado o tratamento com metilprednisolona (n=221) e HS (n=221), no qual o ácido hialurônico não foi inferior a metilprednisolona em relação à analgesia, apresentando resultado estável e se estendendo durante 26 semanas após 2 aplicações (17). Neuenschwander et al. (2019) compararam o tratamento com triancinolona (corticoide; grupo controle) (n=8), ácido hialurônico de alto peso molecular (n=8) e ácido hialurônico de baixo peso molecular (n=8) em equinos com sinovite induzida por LPS. E foi

observada redução significativa da claudicação em ambos os tratamentos com ácido hialurônico após 24 horas, se estendendo até 48 horas.

Pozo, Balazs e Belmonte (1997) investigaram o impacto do ácido hialurônico na sensibilidade dos nociceptores articulares, observando uma redução significativa nas respostas nervosas, tanto contínuas quanto geradas pelo movimento, após a administração do composto em gatos com artrite. Gotoh et al. (1993) sugeriram a presença de receptores nas terminações nervosas articulares que detectam dor, com base em seu estudo em ratos sobre o efeito do peso molecular do ácido hialurônico na dor articular. Ferrari et al. (2016) e Ferrari et al. (2018) demonstraram que moléculas de baixo peso molecular de ácido hialurônico induzem hiperalgesia através do receptor CD44, enquanto as de alto peso molecular apresentam efeito analgésico, especialmente após a inflamação induzida por mediadores como interleucina 6 e prostaglandina. Esses achados, combinados com os resultados de nosso experimento, que evidenciam a ação analgésica do ácido hialurônico de alto peso molecular na redução da claudicação em animais, indicando a relação entre o ácido hialurônico, seu peso molecular e os efeitos sobre a algesia e analgesia.

Masuko et. al., (2009) atribuíram ao ácido hialurônico não apenas a função condroprotetora, mas também características anti-inflamatórias, interrompendo a liberação de interleucina 1, de MMPs e de estímulo na produção de colágeno, GAGs e ácido hialurônico de alto peso molecular. No presente trabalho a análise do marcador de degradação do colágeno de tipo 2 (C2C), usado para avaliar a degradação da cartilagem articular não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e tratamento durante os momentos experimentais. Diferente do C2C, o glicosaminoglicano sulfatado sulfato de condroitina apresentou diferença significativa entre os momentos 0 e 12 horas (após a indução da sinovite, sem apresentar diferença entre os grupos). No momento 24horas (momento após o tratamento) os grupos apresentaram diferença significativa entre eles, sendo o grupo controle apresentado maior

concentração de sulfato de condroitina no líquido sinovial. O processo inflamatório no ambiente articular provoca a degradação da cartilagem articular, causando a liberação de constituintes da matriz extracelular, sendo no caso do sulfato de condroitina, além disso um mecanismo de proteção, já que este glicosaminoglicano possui função moduladora quando livre no líquido sinovial. A diferença no momento 24horas, pode demonstrar a diminuição do processo de degradação da cartilagem articular após o tratamento com o ácido hialurônico e a necessidade das propriedades modulatórias destes GAGs(21,22).

A indução da sinovite, assim como esperado, resultou no aumento significativo das células no líquido sinovial, apresentando aumento significativo dos neutrófilos, células mononucleares e das proteínas plasmáticas totais no momento 12 horas, caracterizando o processo inflamatório sinovial, bem como descrito por Menarim et al. (2019), que induziram sinovite com LPS em articulação radio-cárpica e társica em seis equinos. Apesar da sinovite induzida ser considerada leve, o número de neutrófilos foi compatível com valores encontrados na sinovite séptica, apresentando resultados similares a outros estudos nos quais a sinovite foi induzida com LPS (23,15,24). As células retornaram aos valores de referência no momento 7dias (7 dias após a indução da sinovite). Lee, et al., (2021) observaram a influência do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular em macrófagos, tendo as moléculas de alto peso não só a capacidade de ativar a via alternativa dos macrófagos mas ainda converter a ativação de macrófagos já ativados pela via clássica, com isso, apesar de não apresentarem diferença significativa entre as concentrações de células mononucleares, faz-se necessário maiores investigações sobre os macrófagos presentes no líquido sinovial, e assim entender essa interação em um estudo in vivo(25).

No exame ultrassonográfico da membrana sinovial, foi observado aumento da espessura da membrana sinovial no grupo controle após a indução da sinovite (momento 12 horas), apesar de o grupo tratado não apresentar diferença, não foi observada diferença significativa entre os

grupos. No exame ultrassonográfico da membrana sinovial, foi observado aumento da espessura da membrana sinovial no grupo controle após a indução da sinovite (momento 12 horas), apesar de o grupo tratado não apresentar diferença, não foi observada diferença significativa entre os grupos. No momento 24 horas, após o tratamento, os grupos apresentaram diferença significativa entre si, tendo o grupo controle apresentado maior espessura da membrana sinovial. O aumento da espessura da membrana sinovial está diretamente relacionado com o processo inflamatório, sendo este aumento correspondente ao aumento da infiltração de células inflamatórias neste tecido e até mesmo pela hiperplasia de sinoviócitos durante a sinovite (26,27). Os resultados apresentados nesse exame indicam que o grupo tratado apresentou menor reação inflamatória da membrana sinovial, reduzindo a infiltração celular.

Durante a sinovite, há a mudança do líquido sinovial. A partir do insulto provocado, há a liberação de fatores inflamatórios, como interleucina-1β e 6, fator de necrose tumoral, metaloproteínases de matriz, hialuronidases e oxido nítrico (26,27,24). A mudança da composição do líquido sinovial provoca a degradação da cartilagem articular, de moléculas de ácido hialurônico e causam a infiltração de células inflamatórias na membrana sinovial (11,12,26,27) intensificando o processo inflamatório e gerando a liberação de fragmentos da cartilagem articular, a quebra do ácido hialurônico e a deficiência das células da membrana sinovial e condrócitos em produzir ácido hialurônico de alto peso molecular (28,10,26). Todos esses fatores contribuem com o prolongamento do processo inflamatório e a perda da homeostase do ambiente articular. A suplementação com o ácido hialurônico de alto peso molecular, através da sua interação com as células, permite a redução da liberação das citocinas inflamatórias e estimula as células a produzirem ácido hialurônico de alto peso molecular, GAGs, colágeno e a proliferação celular, sendo um adjuvante no reestabelecimento da homeostase do ambiente articular(7,14,9,3,29). A permanência e estabilidade do ácido

hialurônico administrado intra-articular visa promover por mais tempo a sinalização, e inibição da liberação de fatores inflamatórios no líquido sinovial, promovendo a modulação por maior tempo, interrompendo o prolongamento do processo inflamatório.

Através dos exames realizados neste experimento, podemos observar a relação da administração do ácido hialurônico de alto peso molecular com o exame de claudicação, mensuração da concentração de sulfato de condroitina e da espessura da membrana sinovial, tendo em todos os casos, os parâmetros se mantido dentro de valores basais após a administração e manutenção do ácido hialurônico no líquido sinovial. Apesar de não apresentarmos avaliações de citocinas inflamatórias, nossos resultados são sugestivos da ação moduladora do ácido hialurônico no líquido sinovial inflamado, ressaltando a importância não apenas do uso do ácido hialurônico para analgesia, mas também para proteção do ambiente articular.

REFERÊNCIAS

[1] PETREY, A. C.; DE LA MOTTE, C. A. Hyaluronan, a Crucial Regulator of Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 11 mar. 2014.

[2] KOSIŃSKI, J. et al. HYALURONIC ACID IN ORTHOPEDICS. **Wiadomości Lekarskie**, v. 73, n. 9, p. 1878–1881, set. 2020.

[3] MASUKO, K. Anti-inflammatory effects of hyaluronan in arthritis therapy: Not just for viscosity. **International Journal of General Medicine**, p. 77, abr. 2009.

[4] ABATANGELO, G. et al. Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1743, 21 jul. 2020.

[5] FUNDARÒ, S. P. et al. The Rheology and Physicochemical Characteristics of Hyaluronic Acid Fillers: Their Clinical Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10518, jan. 2022.

[6] RAMPRATAP, P. et al. **Production of isotopically enriched high molecular weight hyaluronic acid and characterization by solid-state NMR**. bioRxiv, , 16 maio 2023. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.16.532902v2>. Acesso em: 3 fev. 2025

[7] MISRA, S. et al. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 6 maio 2015.

[8] FERRARI, L. F. et al. Extracellular matrix hyaluronan signals via its CD44 receptor in the increased responsiveness to mechanical stimulation. **Neuroscience**, v. 324, p. 390–398, jun. 2016.

[9] TAVIANATOU, A. G. et al. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. **The FEBS Journal**, v. 286, n. 15, p. 2883–2908, ago. 2019.

[10] MALEMUD, C. J. Matrix Metalloproteinases and Synovial Joint Pathology. Em: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 148p. 305–325.

[11] MCILWRAITH, C. W. et al. Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 36, n. 3, p. 823–831, mar. 2018.

[12] MCILWRAITH, C. W. et al. (EDS.). **Joint disease in the horse**. Second edition ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2016.

[13] CHEN, C. P. C. et al. Changes of synovial fluid protein concentrations in supra-patellar bursitis patients after the injection of different molecular weights of hyaluronic acid. **Experimental Gerontology**, v. 52, p. 30–35, abr. 2014.

[14] ALTMAN, R. et al. Anti-Inflammatory Effects of Intra-Articular Hyaluronic Acid: A Systematic Review. **Cartilage**, v. 10, n. 1, p. 43–52, jan. 2019.

[15] NEUENSCHWANDER, H. M. et al. Hyaluronic acid has chondroprotective and joint-preserving effects on LPS-induced synovitis in horses. **Journal of Veterinary Science**, v. 20, n. 6, p. e67, 2019.

[16] NIEMELÄ, T. M.; TULAMO, R.-M.; HIELM-BJÖRKMAN, A. K. A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study on intra-articular hyaluronan treatment in equine lameness originating from the metacarpophalangeal joint. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 60, 23 mar. 2016.

[17] LEIGHTON, R. et al. NASHA hyaluronic acid vs methylprednisolone for knee osteoarthritis: a prospective, multi-centre, randomized, non-inferiority trial. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 22, n. 1, p. 17–25, 1 jan. 2014.

[18] POZO, M. A.; BALAZS, E. A.; BELMONTE, C. Reduction of sensory responses to passive movements of inflamed knee joints by hylan, a hyaluronan derivative. **Experimental Brain Research**, v. 116, n. 1, p. 3–9, 1 ago. 1997.

[19] GOTOH, S. et al. Effects of the molecular weight of hyaluronic acid and its action mechanisms on experimental joint pain in rats. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 52, n. 11, p. 817–822, 1 nov. 1993.

[20] FERRARI, L. F. et al. CD44 Signaling Mediates High Molecular Weight Hyaluronan-Induced Antihyperalgesia. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 308–321, 10 jan. 2018.

[21] TÍO, L. et al. Effect of chondroitin sulphate on synovitis of knee osteoarthritic patients. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 149, n. 1, p. 9–16, 7 jul. 2017.

[22] VASSALLO, V. et al. Molecular Fingerprint of Human Pathological Synoviocytes in Response to Extractive Sulfated and Biofermentative Unsulfated Chondroitins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, p. 15865, jan. 2022.

[23] MENARIM, B. C. et al. Autologous bone marrow mononuclear cells modulate joint homeostasis in an equine *in vivo* model of synovitis. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 12, p. 14337–14353, dez. 2019.

[24] WANG, G. et al. Changes in Synovial Fluid Inflammatory Mediators and Cartilage Biomarkers After Experimental Acute Equine Synovitis. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 59, n. 1, p. 129–134, 1 mar. 2015.

[25] **The effects of the molecular weights of hyaluronic acid on the immune responses**. Disponível em: <https://spj.science.org/doi/10.1186/s40824-021-00228-4>. Acesso em: 11 fev. 2025.

[26] SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, Osteoarthritis. v. 51, n. 2, p. 249–257, 1 ago. 2012.

[27] MATHIESSEN, A.; CONAGHAN, P. G. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. **Arthritis Research & Therapy**, v. 19, n. 1, p. 18, 2 fev. 2017.

[28] MATHIESSEN, A.; CONAGHAN, P. G. Synovitis in osteoarthritis: current understanding with therapeutic implications. **Arthritis Research & Therapy**, v. 19, n. 1, p. 18, 2 fev. 2017.

[29] AKMAL, M. et al. The effects of hyaluronic acid on articular chondrocytes. **The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume**, v. 87-B, n. 8, p. 1143–1149, ago. 2005.

Material Suplementar

Termografia

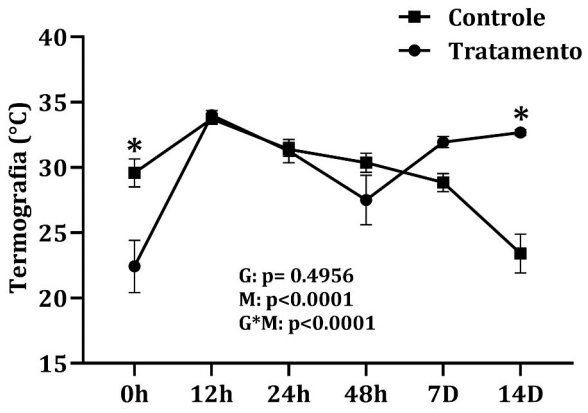

Figura 1: Média da temperatura articular mensurada por câmera térmica. As avaliações foram realizadas nos grupos tratamento e controle nos momentos experimentais. Foi feita análise estatística entre grupos e momentos, considerando intervalo de confiança de 95%.

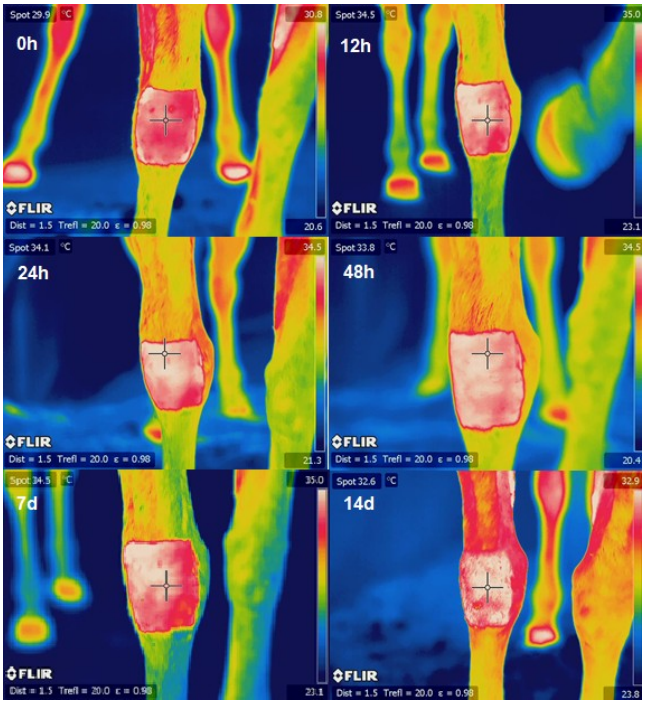

Figura 2. Imagens representativas das termografias em todos os momentos experimentais do mesmo animal.

Ultrassonografia

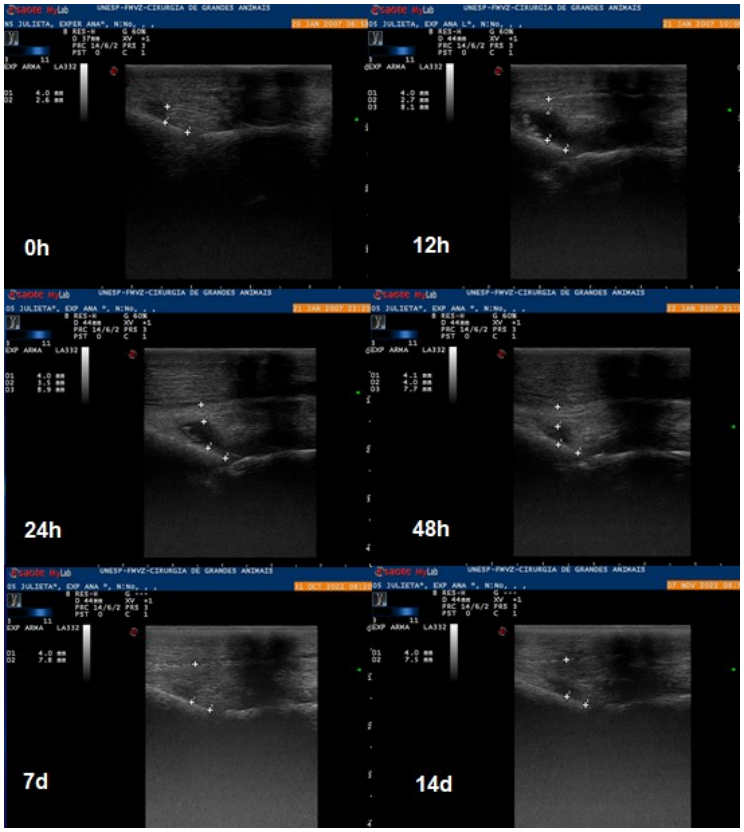

Figura 3. Imagens representativas dos exames ultrassonográficos da articulação radio cárpica para mensuração da espessura em todos os momentos de avaliação do estudo.

Análises Físicas

Tabela 1. Mediana (Q1 e Q3) para os parâmetros de exames físicos realizados no líquido sinovial nos momentos 0h, 12h, 24h, 48h, 7dias e 14 dias no grupo controle e grupo tratado.

Parâmetros		**0hr**	**12hr**	**24hr**	**48hr**	**7D**	**14D**
Volume (mL)	Controle	1 (1–1,3)	1,5 (1,1–1,5)	1 (1 – 1,3)	1 (1 – 1,3)	1,5 (1 – 1,5)	1,5 (1,5–1,8)
	Tratamento	1,5 (1,1–1,5)	1,5 (1–1,5)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1,3)	1,5 (1,1 – 1,5)	1,5 (1,5–1,5)
Cor (0-4)	Controle	1 (1 – 2)[b]	2,5 (2 – 4)	4 (2,2 – 4)	4 (2 – 4)	2 (1 – 3,5)	1,5 (1– 2,7)

	Tratamento	2 (2 – 3,5)[a]	2 (2 – 3,7)	3 (2 – 4)	4 (2 – 4)	3 (2 – 4)	2 (2 – 2)
Aspecto (0-3)	Controle	2 (1 – 2)	2 (2 – 2)	2 (2 – 2)	2 (2 – 2)	1 (0 – 1)	0 (0 – 1)[b]
	Tratamento	0 (0 – 2)	2 (2 – 2)	2 (2 – 2)	2 (1,2 – 2)	2 (1 – 2)	1 (1 – 1)[a]
Densidade (g/cm^3)	Controle	1014 (1012–1016)[A]	1038 (1036–1040)[B]	1027 (1025-1034)	1023 (1017-1027)[A]	1017 (1015-1018)	1014 (1013-1014)
	Tratamento	1013 (1012–1014)[A]	1026 (1019–1039)[B]	1025 (1020-1037)[A]	1028 (1019–1028)	1015 (1011-1018)	1012 (1010-014)
Coagulação (0-1)	Controle	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
	Tratamento	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)

a-b Letras diferentes entre a coluna indica diferença estatística ($p < 0,05$) para cada parâmetro ao compara o grupo controle vs tratamento dentro de cada momento. A-B Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre momento 0h e momento pós-inflamação (12h); momento 0h e retorno aos valores basais dentro de cada grupo.

Análises químicas

Tabela 2. Mediana (Q1 e Q3) dos parâmetros de pH, sangue oculto, glicose, fibrinogênio e média (±erro padrão) da concentração de proteínas avaliados no líquido sinovial nos momentos 0h, 12h, 24h 48, 7dias e 14 dias no grupo controle e grupo tratado.

Parâmetros		**0hr**	**12hr**	**24hr**	**48hr**	**7D**	**14D**
pH	Controle	8 (8 - 8)	8,2 (7,6 - 8,5)	8,5 (8 - 8,5)	8,2 (8 - 8,5)[b]	8 (8 - 8,3)[b]	8,5 (8 - 9)
	Tratamento	8 (8 - 8)	8,5 (7,6 - 8,5)	8 (8 - 8,3)	8,7 (8,5 - 9)[a]	8,5 (8,5-8,5)[a]	8,2 (8 - 9)
Sangue oculto	Controle	4 (1 - 4)	4 (4 - 4)	4 (4 - 4)	4 (4 - 4)	2(0,2 - 3,7)[b]	4 (1 - 4)
	Tratamento	3 (0 - 4)	4 (4 - 4)	4 (4 - 4)	4 (4 - 4)	4 (4 - 4)[a]	4 (1,7 - 4)
Glicose (mg/dL)	Controle	1(1-1,7)	1 (0 - 1)	1 (1 - 1)	1 (1 - 1)[b]	2 (1 - 2)	1 (1 - 1)[b]
	Tratamento	2(1,2-2)	2 (0,2 - 2)	1,5 (1 - 2)	2 (1,2 - 2)[a]	2 (2 - 2)	2 (1,2 - 2)[a]
Fibrinogênio (mg/dL)	Controle	0 (0 - 0)[A]	200 (200-200)[A]	200 (200-200)[B]	200 (50-200)[A]	0 (0 - 150)	0 (0 - 0)
	Tratamento	0 (0 - 0)[A]	200	200	200	0	0 (0 - 0)

			(200-200)^{A}	(200-350)^{B}	(200-200)^{A}	(0 - 0)	
Proteína	Controle	2 ± 0,3^{A}	5,6 ± 0,3^{aB}	4,9 ± 0,3	2,9 ± 0,3^{A}	2,2 ± 0,3	2,1 ± 0,3
(g/dL)	Tratamento	2 ± 0,3^{A}	3,9 ± 0,3^{bB}	4 ± 0,3	3,4 ± 0,3^{A}	2,2 ± 0,3	2 ± 0,3

a-b Letras diferentes entre a coluna indica diferença estatística (p <0,05) para cada parâmetro ao comparar o grupo controle vs tratamento dentro de cada momento. A-B Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística (p <0,05) entre momento 0h e momento pós-inflamação (12h); momento 0h e retorno aos valores basais dentro de cada grupo.

Proteína

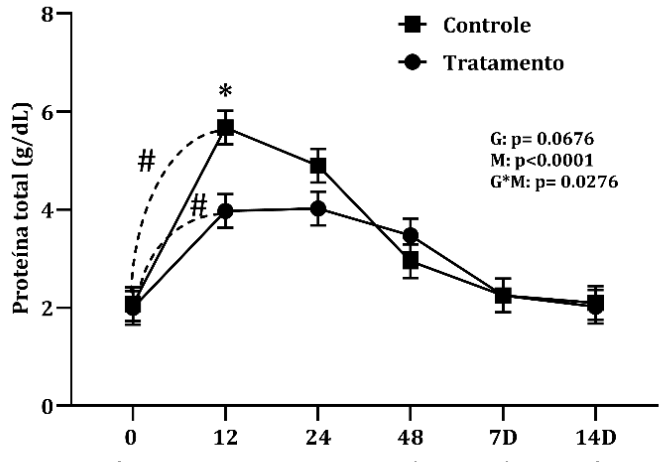

Figura 6. Mensuração da concentração de proteínas observadas no líquido sinovial em todos os momentos experimentais do grupo controle e tratados com ácido hialurônico. O intervalo de confiança adotado foi de 95%. Foram observadas diferença entre os momentos 0 e 12 horas, representado pela hashtag (#) em ambos os grupos e entre os grupos representado pelo asterisco (*) no momento 12 horas.

Eletroforese do ácido hialurônico e condroitin sulfato

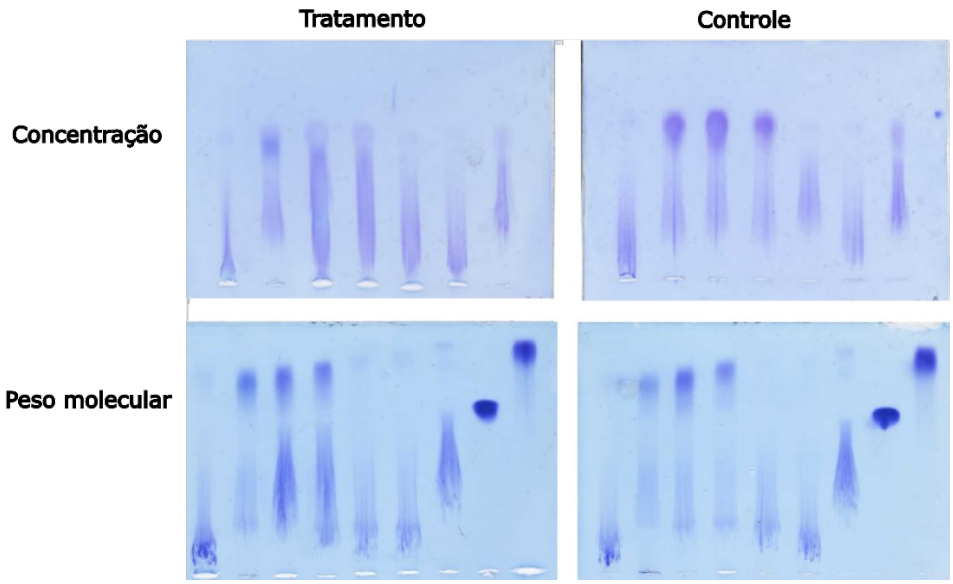

Figura 8. Imagem representativa da análise de eletroforese do líquido sinovial, sendo as duas lâminas superiores do exame de concentração e as 2 abaixo de determinação do peso molecular.

Avaliação da celularidade

Tabela 4. Valores da contagem (log ±erro padrão) de hemácias e neutrófilos e mediana (Q1 e Q3) dos valores de macrófagos e eosinófilos detectados no líquido sinovial nos momentos 0h, 12h, 24h, 48h, 7dias e 14 dias no grupo controle e grupo tratado.

Células		**0h**	**12h**	**24h**	**48h**	**7D**	**14D**
Hemácias (Log)	Controle	1,9±0,4 [A]	5,4±0,4[B]	5,5 ± 0,4	5,0 ± 0,4	2,1±0,4[A]	2,0±0,4
	Tratamento	2,0±0,4 [A]	4,7±0,4[B]	5,0 ± 0,4	5,3 ± 0,4	3,7±0,4[A]	3,0±0,4
Neutrófilos (Log)	Controle	0,7±0,1[A]	4,5±0,1[B]	4,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	1,5±0,1[A]	1,4 ± 0,1
	Tratamento	0,4 ±0,1 [A]	4,1±0,1 [B]	3,7 ± 0,1	3,3 ± 0,1	0,9±0,1[A]	1,2 ± 0,1
Céls Mononucleares (céls/µL)	Controle	156±76,3	4593±788	4617±1199	2738±576[A]	372±22[B]	288±40,3
	Tratamento	204±180	4881±2393	2690±283	2917±695	624±298	220±28,2
Eosinófilos (céls/µL)	Controle	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)
	Tratamento	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)

a-b Letras diferentes entre a coluna indica diferença estatística ($p < 0,05$) para cada parâmetro ao comparar o grupo controle vs tratamento dentro de cada momento. A-B Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre momento 0h e momento pós-inflamação (12h); momento 0h e retorno aos valores basais dentro de cada grupo.