



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

FERNANDA MARIA ARAGÃO XIMENES PORTO

**CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA CARTILAGEM ARTICULAR EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2018

FERNANDA MARIA ARAGÃO XIMENES PORTO

**CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA CARTILAGEM ARTICULAR EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P881c Porto, Fernanda Maria Aragão Ximenes.
Caracterização ultraestrutural da cartilagem articular em modelos experimentais de osteoartrite em camundongos / Fernanda Maria Aragão Ximenes Porto. – 2018.
78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha.

1. Osteoartrite. 2. Modelos Animais. 3. Microscopia Eletrônica de Varredura. 4.
Cartilagem Articular. I. Título.

CDD 611

FERNANDA MARIA ARAGÃO XIMENES PORTO

CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA CARTILAGEM ARTICULAR EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfofisiologia óssea e articular.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro (Examinadora)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico este trabalho ao meu amado filho Vinícius...

Que apesar de sua tenra e breve existência...

Contribuiu para que eu lutasse pelo meu sonho de ser

Mestre!

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos são direcionados a todos que colaboraram com a realização deste trabalho.

A Deus, por todas as inúmeras bênçãos colocadas em minha vida.

Ao meu pai Aguiar (*in memoriam*) e minha mãe Zefinha, que, além do dom da vida, me ensinaram a valorizar a formação ética, acadêmica e cristã como tripé essencial nos caminhos da vida.

Ao meu esposo Ricardo e meu filho Guilherme por todo amor verdadeiro e companheirismo que me permitiram ser uma pessoa que ama, que às vezes conquista, que às vezes perde e que sempre continua tentando.

Aos meus irmãos Flávio e Carlos André, por estarem sempre ao meu lado, como “guardiões” dessa caçula.

A minha tia Salésia a quem devo muitíssimo na minha formação, sem a qual todas as minhas conquistas na vida profissional seriam impossíveis.

A minha orientadora professora Dra. Virgínia, que me acolheu maternamente como orientadora e me inspirou com sua vocação à docência e amizade. Suas orientações e seu apoio tiveram inestimável valor.

A querida Gigi que me ajuda nas atividades domésticas, permitindo que eu me doasse na elaboração da minha dissertação.

Aos meus amigos do LIO (Carol Dinelly, Rodolfo, Anelise) que me ajudaram bastante nos experimentos com tanta paciência e amizade.

Aos meus amigos do NEMPI (Josi, Dvison, Regina, Theides) que me me apresentaram e me encorajaram ao mundo da pesquisa experimental.

A minha amiga Érika Augusta, exemplo de amiga e fisioterapeuta.

Ao professor Dr. Airton, pela acolhida em seu Laboratório e suas sábias palavras em nossas reuniões.

Aos profissionais da Central Analítica sempre tão solícitos na obtenção das imagens desse trabalho.

A todos meus professores, por terem compartilhado seus conhecimentos e pela colaboração na minha formação científica.

A todos que fazem parte da Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, especialmente à secretária Laísa, pela disponibilidade e ajuda.

A FUNCAP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

A osteoartrite (OA) é caracterizada por progressiva deterioração da cartilagem articular acompanhada por alterações em tecidos circunvizinhos. Métodos cirúrgicos de indução de OA, tais como transsecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) e desestabilização do menisco medial (DMM), promovem alterações histológicas como degeneração da cartilagem após quatro semanas de indução. Este trabalho caracterizou as lesões ultraestruturais na cartilagem articular em dois modelos de OA. Para tanto, camundongos Swiss foram submetidos à meniscotomia (n=15) ou TLCA (n=15), e eutanasiados, sob anestesia, nos tempos de 3, 7 ou 14 dias pós-cirurgia. O grupo sham (n=15) foi submetido à incisão da pele e ruptura da cápsula articular, seguida por sutura dos tecidos. Após eutanásia, articulações do joelho foram dissecadas e preparadas para análise por Microscopia Óptica (MO) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Amostras de sinóvia e cartilagem articular foram coradas por HE e safranina-O para análise histológica. Imagens obtidas por MEV foram analisadas quanto à espessura da cartilagem articular, número de camadas de condrócitos, coeficiente de rugosidade e grau de degradação da cartilagem, além de microtopografia de superfície. A análise histopatológica da sinóvia revelou aumento dos escores indicativos de padrão inflamatório com tendência crescente ao longo dos dias de experimento nos grupos submetidos à meniscotomia e à TLCA. Não foi possível observar alteração na cartilagem articular através da MO nos grupos estudados. As imagens obtidas por MEV revelaram perda da continuidade articular, fissuras e destacamento da superfície articular nos grupos TLCA e DMM aos 14 dias. No mesmo período, houve uma diminuição da espessura da cartilagem tibial nos grupos DMM e TLCA. Houve decréscimo no número de camadas de condrócitos no fêmur e na tíbia no grupo DMM quando comparado ao grupo sham, em todos os tempos do experimento ($p < 0,05$). Após duas semanas, os coeficientes de rugosidade no fêmur e na tíbia aumentaram no grupo DMM, deixando a microtopografia da superfície mais heterogênea quando comparada ao grupo sham. Portanto, lesões precoces de OA são detectáveis por MEV nos tempos de 7 e 14 dias nos modelos de TLCA e DMM. Estes achados não foram observados através MO.

Palavras-chave: Osteoartrite. Modelos animais. Microscopia Eletrônica de Varredura. Cartilagem articular.

ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is characterized by progressive deterioration of articular cartilage accompanied by changes in surrounding tissues. Surgical methods for OA induction, such as anterior cruciate ligament transection (ACLT) and destabilization of the medial meniscus (DMM) promote histological changes such as degeneration of cartilage at four weeks after induction. This study characterized the ultrastructural injuries in articular cartilage in OA two models. Therefore, Swiss mice underwent DMM (n = 15) or ACLT (n = 15), and euthanized under anesthesia, in times of 3, 7 or 14 days post-surgery. Sham group (n = 15) was submitted to skin incision and breaking joint capsule, followed by suturing the tissues. After euthanasia, knee joints were dissected and prepared for analysis by optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM). Samples of synovium and articular cartilage were stained with HE and O-safranin for histological analysis. Images obtained by SEM were examined for articular cartilage thickness, number of layers of chondrocytes, roughness coefficient and the degree of cartilage degradation, and surface microtopography. The histopathological analysis showed increasing trend synovial scores indicating inflammatory pattern over the experimental period in the groups submitted to DMM and ACLT. It was not possible to observe changes in the articular cartilage through the OM at all groups. The images obtained by SEM revealed loss of articular continuity, cracks and detachment of the joint surface at ACLT and DMM groups at 14 days. In the same period there was a decrease in tibial cartilage thickness in DMM and ACLT groups. There was a decrease in the number of layers of chondrocytes in the femur and tibia in the DMM group compared to the sham group in all experimental days ($p < 0.05$). After two weeks, the roughness coefficient in the tibia and femur increased in the DMM group, making the surface microtopography more heterogeneous as compared to the sham group. Therefore, early OA lesions are detectable by SEM at times of 7 and 14 days in the ACLT models and DMM. These findings were not observed by OM.

Keywords: Osteoarthritis. Animal models. Scanning Electron Microscopy. Articular cartilage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1- Vista anterior da articulação do joelho.....	12
Figura 2- Organização em zonas da cartilagem articular.....	16
Figura 3- Composição da cartilagem articular em três estágios.....	19
Figura 4- Processos-chave envolvendo o início e a progressão da OA.....	23
Tabela 1- Classificação das alterações histológicas da cartilagem articular de acordo com a OARSI.....	24
Figura 5- Aspecto da cartilagem articular normal por MEV.....	28
Figura 6- Delineamento experimental do estudo.....	29
Figura 7- Principais etapas do processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura.....	35
Figura 8- Divisão em zonas A, B e C de fêmur e tíbia de camundongos, respectivamente.....	39
Figura 9- Ilustração da ferramenta Surface Plot 3D.....	40
Figura 10- Classificação de Degradação da Cartilagem Articular para MEV.....	42
Figura 11- Ilustração representativa da histopatologia sinovial de camundongos submetidos à OA pelos métodos de TLCA e DMM.....	43
Tabela 2 – Efeito da indução da OA nas sinóvias de camundongos submetidos à TLCA ou meniscotomia.....	44
Figura 12- Ilustração representativa da histopatologia das articulações em intervalos precoces de OA induzidas por dois métodos cirúrgicos: TLCA e meniscotomia.....	45
Figura 13- Imagens obtidas por MEV do fêmur de camundongos (80x).....	47
Figura 14- Imagens obtidas por MEV da tíbia de camundongos (80x).....	48
Figura 15- Imagens obtidas por MEV do fêmur de camundongos (350x).....	49
Figura 16- Imagens obtidas por MEV da tíbia de camundongos (350x).....	50
Figura 17- Imagens obtidas por MEV da superfície articular do fêmur e da tíbia de camundongos de 3 a 14 dias pós-cirurgia.....	51
Gráfico 1- Espessura da cartilagem articular nos diferentes grupos de OA.....	52
Figura 18- Imagem por MEV das camadas de condrócitos no fêmur.....	53
Gráfico 2- Número de camadas de condrócitos nos diferentes grupos.....	54

Figura 19- Plotagem bidimensional da superfície articular (0,1x0,1mm) e surface plot em 3D (3 dias).....	55
Figura 20- Plotagem bidimensional da superfície articular (0,1x0,1mm) e surface plot em 3D (7 dias).....	56
Figura 21- Plotagem bidimensional da superfície articular (0,1x0,1mm) e surface plot em 3D (14 dias).....	57
Gráfico 3- Cinética do coeficiente de rugosidade nos diferentes grupos de OA.....	58
Gráfico 4- Classificação de desgaste da cartilagem articular.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OA	Osteoartrite
DMM	Desestabilização do menisco medial
LCA	Ligamento cruzado anterior
TLCA	Transecção do ligamento cruzado anterior
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
i.m.	Intramuscular
HE	Hematoxilina-Eosina
OARSI	<i>Osteoarthritis Research Society International</i>
EDTA	Sal sódico do ácido etilendiamino- tetra- acético
<i>Ra</i>	Coeficiente de Rugosidade aritmético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Cartilagem articular.....	12
1.2	Osteoartrite.....	17
1.3	Modelos Experimentais de Osteoartrite.....	20
1.4	Métodos ultraestruturais de análise da cartilagem.....	25
1.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	26
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivos Específicos.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Desenho do estudo e aspectos éticos.....	33
4.2	Seleção dos animais.....	33
4.3	Drogas.....	33
4.4	Grupos Experimentais e procedimento cirúrgico.....	33
4.5	Sacrifício dos animais.....	35
4.6	Preparo do material histológico.....	36
4.7	Análise histológica da sinóvia.....	36
4.8	Análise histológica da cartilagem.....	36
4.9	Preparo do material para MEV.....	37
4.10	Autorização e obtenção das imagens por MEV.....	38
4.11	Análise das imagens por MEV.....	38
4.11.1	<i>Medida de espessura da cartilagem.....</i>	<i>39</i>
4.11.2	<i>Contagem das camadas de condrócitos.....</i>	<i>39</i>
4.11.3	<i>Surface plot 3D.....</i>	<i>40</i>
4.11.4	<i>Coeficiente Ra de rugosidade.....</i>	<i>41</i>
4.11.5	<i>Classificação da degradação articular.....</i>	<i>41</i>
4.12	Análise estatística.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Análise histopatológica da sinóvia.....	43
5.2	Análise histológica da cartilagem articular.....	45

5.2.1	<i>Coloração por HE e safranina O</i>	45
5.3	Análise de imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	46
5.3.1	<i>Espessura da cartilagem</i>	52
5.3.2	<i>Camadas de condrócitos</i>	52
5.3.3	<i>Surface plot 3D</i>	54
5.3.4	<i>Coefficiente de rugosidade</i>	58
5.3.5	<i>Classificação de degradação articular</i>	58
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXO A- Aprovação da CEPA.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cartilagem articular

Nas articulações sinoviais, a cartilagem articular é a superfície de apoio que permite o movimento suave entre os segmentos ósseos adjacentes, como o do joelho (representado na Figura 1). Toda a articulação é fechada em uma cápsula de tecido fibroso, cuja superfície interna é revestida com a membrana sinovial que secreta um fluido conhecido como líquido sinovial (HASSELBACHER, 1998).

A cartilagem articular consiste em um tecido avascular bastante especializado, com elevado nível de organização celular complementado por uma matriz bem resistente, porém flexível (ESPANHA, 2010). Portanto, a cartilagem desempenha claramente uma função mecânica, distribuindo as cargas entre os ossos opostos em uma articulação sinovial.

Figura 1- Vista anterior da articulação do joelho. Ilustração da visão anterior do joelho, com seus componentes articulares e periarticulares, incluindo ligamentos, tendões, meniscos, com destaque para cartilagem articular.



Fonte: Adaptado de http://www.kneeclinic.info/knee_problems.php

Localizados entre a superfície articular, os meniscos constituem estruturas fibrocartilagenosas que desempenham papéis importantes na transmissão de carga, absorção de choques e manutenção da estabilidade articular (KOHN, MORENO, 1995; WOJTYS, CHAN, 2005). Cerca de 98% da matriz meniscal contém colágeno tipo I e menos de 1% de proteoglicanos (MARTIN, 2008).

As células da cartilagem articular, os condrócitos, presentes em pequenas proporções representam o centro metabólico e produtor da vasta matriz extracelular encontrada na cartilagem, composta basicamente por água, proteoglicanos, colágeno, dentre outras proteínas. As principais macromoléculas, como o colágeno e os proteoglicanos, perfazem cerca de 10% a 30%, enquanto a água representa cerca de 65% a 85% do peso seco do tecido (VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003).

Os proteoglicanos destacam-se por possuírem alto peso molecular. Eles são formados por vários elementos organizados numa complexa arquitetura aniônica, com função de mola biológica. Sua unidade básica são os glicosaminoglicanos (GAG), altamente sulfatados, um dos responsáveis pelas propriedades hidrofílicas dos proteoglicanos (BRANDT, MANKIN, 1993).

Na cartilagem são encontrados dois tipos de GAG: o sulfato de condroitina e o queratan sulfato. Essas moléculas estão ligadas covalentemente a uma proteína central, formando complexos denominados de agregans. Estes se ligam ao ácido hialurônico, por meio de proteínas de ligação (ALBERTS *et al.*, 1994).

O colágeno é encontrado na cartilagem articular sob a forma de finas fibrilas dispersas pela substância fundamental, formando uma rede que serve como um esqueleto organizador, auxiliando a manutenção da integridade estrutural da cartilagem articular (PORFIRIO, FANARO, 2016). Pode-se afirmar que o colágeno é o principal elemento estrutural que confere resistência ao tecido (LINSENMAYER, 1991). Hay (1991) considera que, além da função de suporte, este elemento participa na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular, exercendo também atividade antigênica. Por meio da técnica de microscopia eletrônica, podem ser revelados até 15 tipos de colágeno na cartilagem articular, mas o colágeno do tipo II representa 90 a 95% do total encontrado nesse tecido (EYRE, 2002).

As fibras de colágeno resistem sobretudo às forças de tensão, que se exercem paralelamente à superfície da cartilagem, graças à sua notável resistência tênsil (ESPANHA, 2010). Além delas, as fibras elásticas na cartilagem articular,

primeiramente estudadas por Cotta-Pereira, Del-Caro, Montes (1984), parecem exercer função notadamente estrutural, biomecânica e condroprotetora (HE *et al.*, 2014). Ainda são escassos os estudos envolvendo as fibras elásticas no estudo da cartilagem, entretanto o desenvolvimento da microscopia confocal tem revelado uma extensa rede elástica em espécies como cavalos e cangurus (MANSFIELD *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2013).

Devido a sua complexa composição, seu alto teor de água e sua capacidade de suportar pressão hidrostática, a cartilagem é capaz de transferir força, de grande magnitude, de uma superfície a outra, conferindo ao tecido uma tendência expansiva (VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003). Tal propriedade permite a recuperação da deformação quando cessada a aplicação de uma força compressora deformante.

Em condições fisiológicas, a cartilagem também promove uma superfície de deslizamento de baixa fricção, conferindo um baixo coeficiente de atrito entre as superfícies deslizantes (GHADIALLY, LALONDE, WEDGE 1983; MEACHIM, STOCKWELL, 1979).

A composição e a estrutura da cartilagem articular não é uniforme, assim como a densidade e arranjo das suas moléculas. Dessa forma, pode ser descrita em quatro zonas ou camadas, a saber: superficial, de transição, profunda e calcificada (SIMON, 1970; MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008). Essas encontram-se abaixo explicitadas:

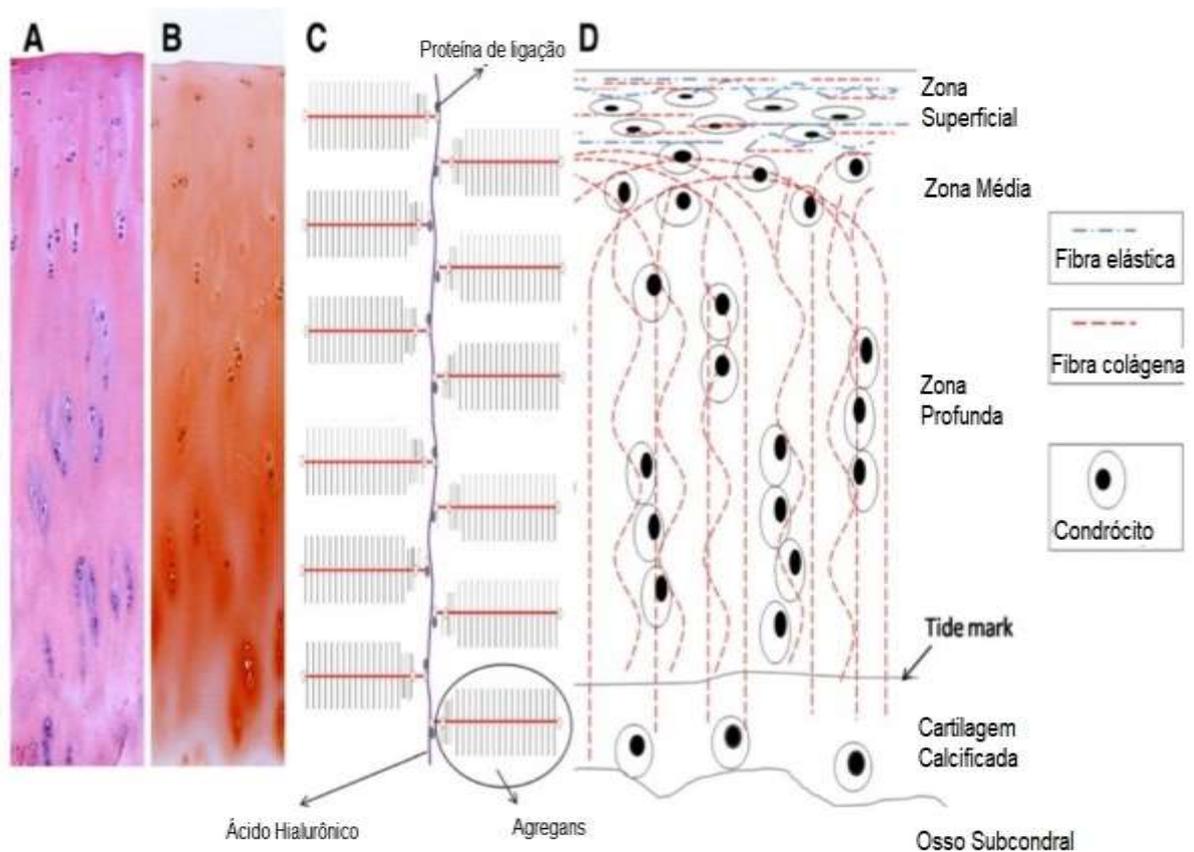
- ❖ Zona superficial (zona tangencial) - É considerada a mais fina das camadas, sendo composta por células elipsoides paralelas à superfície articular. Ela é coberta por um filme de líquido sinovial responsável pela lubrificação e baixo coeficiente de atrito, durante o movimento articular. A disposição paralela de suas fibrilas promove resistência às forças de tensão e cisalhamento. Esta camada funciona como um filtro de grandes macromoléculas, protegendo a cartilagem do sistema imune do tecido sinovial.
- ❖ Zona média (zona de transição) - Apresenta estruturas e componentes comuns às zonas superficial e profunda. A sua densidade celular é baixa, com células predominantemente esferoidais, envoltas por uma matriz celular abundante. As fibras colágenas de maior diâmetro são aleatoriamente dispostas nesta zona e a concentração de proteoglicanos é bastante elevada.

- ❖ Zona profunda (zona radial) – Nessa camada, as células estão dispostas perpendicularmente à superfície e são esferoidais na forma. Esta camada contém as fibrilas colágenas de maior diâmetro e a maior concentração de proteoglicanos, embora a densidade celular seja a menor de todas as camadas.
- ❖ Zona calcificada – Essa camada é mineralizada e contém um pequeno volume de células distribuídas dentro de uma matriz calcificada com atividade metabólica baixa. Os condrócitos desta camada sintetizam colágeno tipo X, responsável por promover importante integridade estrutural e absorção de choque ao longo do osso subcondral.

A separação da zona profunda para a calcificada é estabelecida por uma zona limitante basófila, denominada de traço da maré (*tidemark*). Esta zona calcificada pode ser considerada como o limite entre o osso subcondral e a cartilagem não calcificada, ancorando-a firmemente ao osso e contribuindo para a resistência da interface cartilagem/osso (GHADIALLY, 1981).

A Figura 2 representa o tecido cartilaginoso sob as seguintes perspectivas: cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina (HE) e safranina-O, desenho estrutural do complexo agregan e esquema por zonas de cartilagem.

Figura 2- Organização em zonas da cartilagem articular. (A) Corte histológico com coloração em HE, (B) corte histológico com coloração em safranina-O, (C) Imagem esquemática do complexo agregan, com proteína de ligação e ácido hialurônico, (D) Diagrama esquemático representa o arranjo entre as fibras colágenas e elásticas ao longo da cartilagem articular, com variações de forma dos condrócitos e organização em camadas.



Fonte: Adaptado de He *et al.* (2014).

A composição e a complexa organização estrutural do colágeno e dos proteoglicanos garantem as propriedades inerentes à cartilagem articular, como resistência, elasticidade e compressibilidade. Tais propriedades são necessárias para dissipar e amortecer as forças, além de reduzir a fricção, a que as articulações sinoviais estão sujeitas, sem muito gasto de energia. Portanto, a integridade dos componentes da cartilagem articular é essencial para garantir a função normal das articulações (VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003).

1.2 Osteoartrite

Apesar de todas as propriedades características da cartilagem articular, o seu potencial de reparo fisiológico é bastante limitado. Isso decorre do número insuficiente de células e da limitada capacidade dos condrócitos maduros em migrar, proliferar e produzir matriz cartilaginosa para revestir a área lesionada, além de sua condição avascular e aneural (MILANO *et al.*, 2010).

Nesse contexto, com o processo de envelhecimento, ocorre uma diminuição natural dos proteoglicanos da matriz, diminuindo ainda mais a capacidade regenerativa das lesões (MCLLWRAITH *et al.*, 2011; YAMADA, 2011; MILANO *et al.*, 2012).

Além da idade, os principais fatores associados a incidência de OA são: a predisposição genética, a etnia, a obesidade, a dieta, os fatores ocupacionais e os níveis de atividade (CARR, 2003).

O estabelecimento da doença está associado, portanto, a um desequilíbrio na homeostasia entre a síntese de matriz e a degradação do tecido articular (MARTEL-PELLETIER *et al.*, 2008).

De acordo com Cooper (1998), a OA pode ser dividida em formas primária e secundária, diferindo quanto aos fatores causais e às articulações mais acometidas. A forma primária caracteriza-se pela ausência de fatores desencadeantes e pelo acometimento mais freqüente de algumas articulações: interfalangianas distais e proximais de mãos, trapézio-metacárpicas, acrômio-claviculares, quadris, joelhos, primeiras metatarso-falanginas e inter-apofisárias. Já a forma secundária pode originar-se de qualquer insulto à cartilagem articular, incluindo trauma, artrite, sobrecarga e instabilidade articular.

A OA é caracterizada por progressiva deterioração da cartilagem articular acompanhada por alterações no osso subcondral, ligamentos, cápsula, membrana sinovial, músculos periarticulares e demais tecidos articulares (PALMER, BERTONE, 1994; MCLLWRAITH, 1996; MCLLWRAITH, 2005; BRANDT *et al.*, 2009).

A progressão da OA vem, necessariamente, associada a alterações na morfologia e na organização dos elementos da cartilagem. Observações recentes demonstraram que tanto as alterações características dos estágios precoces quanto dos estágios avançados são importantes para compreensão da patogenia da OA (BURRAND, GALLANT, 2012).

Sinais precoces de acometimento da cartilagem articular podem surgir numa zona focal da superfície e poderão aumentar progressivamente. As primeiras mudanças observadas consistem na fibrilação, no rompimento da rede colágena, no aumento do conteúdo de água e na remodelação do osso subcondral (BUCKWALTER, MANKIN, 1997; BANK *et al.*, 2000).

Essa cascata de eventos explica o aumento no volume do tecido, uma vez que a rede colágena fragilizada não exerce a tensão necessária para conter a pressão osmótica de pró-hidratação exercida pelos proteoglicanos remanescentes (REIFE, STUART, HASTY, 1995).

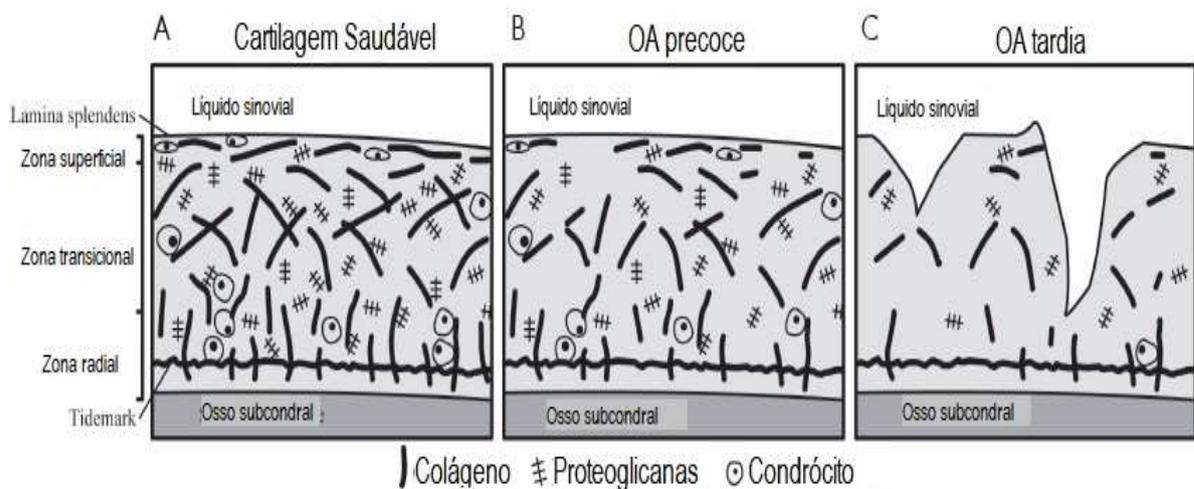
As fissuras (ou *microcracks*) que surgem paralelamente à superfície, posteriormente, podem penetrar verticalmente na cartilagem, atingindo eventualmente o osso subcondral (POOLE, GUILAK, ABRAMSON, 2007).

Num segundo estágio, os condrócitos reagem às alterações da matriz cartilaginosa, aumentando a síntese e a degradação das moléculas da matriz, numa tentativa (sem sucesso) de restaurar a estrutura e a composição do tecido normal. Isso se traduz numa perda da matriz, uma vez que a mesma consiste numa estrutura complexa de interconexões de colágeno, proteoglicanos e glicosaminoglicanas, cuja síntese, secreção, manutenção e degradação é atribuída unicamente aos condrócitos (BUCKWALTER, MANKIN, 1997).

Na fase crônica, as enzimas degenerativas superam a capacidade sintética e a reparação falha. Com a progressão da fibrilação na superfície, as alterações tornam-se mais profundas no tecido, a cartilagem é perdida e o osso subcondral torna-se espessado. Nódulos de osso ou osteófitos freqüentemente formam-se na região lateral da interface cartilagem-osso, refletindo uma tentativa inadequada de reparo da cartilagem (VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003).

Em linhas gerais, à medida que a doença progride, a cartilagem articular diminui em espessura e em integridade mecânica e o osso subcondral aumenta em espessura e enrijecimento, inclusive com alteração da arquitetura trabecular e presença de osteófitos (BURR, 1998). A Figura 3 ilustra a cartilagem em três momentos: saudável, estágio inicial e estágio avançado de OA.

Figura 3- Composição da cartilagem articular em três estágios: (A) Cartilagem Saudável- muitas camadas distintas entre a cartilagem articular e o osso, marcadas pela orientação das fibras colágenas, (B) Estágio inicial da OA- proteoglicanos inicialmente depletados e início de comprometimento da rede colágena, (C) Estágio avançado de OA- proteoglicanos tornam-se gravemente depletadas e a estrutura morfológica da cartilagem torna-se comprometida.



Fonte: Adaptado de Matzat *et al.* (2013).

As articulações acometidas apresentam deformidades, redução de mobilidade e dor, resultando em restrição funcional (DIEPPE, 1999). Tradicionalmente considerada uma desordem primária da cartilagem articular, a osteoartrite (OA) consiste na principal causa de incapacidade e deficiência ao nível mundial (GRAZIO, BALEN, 2009).

O alto custo de exames complementares para diagnóstico de quadros iniciais, indefinições de critérios e, por vezes, sua condição assintomática são fatores que dificultam o cálculo da exata prevalência da OA (WOOLF, PFLEGER, 2000; MAZZUCA *et al.*, 2003). Eubanks *et al.* (2007), em pesquisa realizada por meio de 647 autópsias, encontraram sinais de OA nas articulações interfacetárias lombares em 57% dos indivíduos entre 20-29 anos, e em 100% daqueles com idade acima de 60 anos. Outro estudo, realizado após avaliação das mãos de 3.595 sujeitos, encontrou OA de interfalangianas distais e proximais em, respectivamente, 44% e 16% da população estudada (HAARA *et al.*, 2003).

Tal incidência elevada gera custos e consequências econômicas para os pacientes e para os serviços de saúde. No Brasil, essa enfermidade representa a segunda maior causa das faltas ao trabalho e da aposentadoria por invalidez. De acordo com dados da Previdência Social disponíveis na Sociedade Brasileira de Reumatologia, a Osteoartrite é responsável por 7,5% de todos os afastamentos do trabalho. A doença é a segunda causa da prorrogação do auxílio-doença, com 10,5%, e o quarto motivo das aposentadorias precoces, com 6,2% (SEDA, 2001).

Os fundamentos do tratamento clínico da OA consistem na redução dos sintomas dolorosos e na melhora da funcionalidade por meio de programas de fisioterapia. O uso de analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroides, assim como as infiltrações articulares com corticosteroides promovem uma melhora provisória dos sintomas, embora não ocorram modificações nas características das lesões. Os corticosteroides inibem a proliferação dos condrócitos e diminuem a síntese de matriz, incluindo a expressão de colágeno e a síntese de proteoglicanos. Numerosos estudos têm investigado o papel de agentes condroprotetores da cartilagem (diacereína, sulfato de glucosamina e o sulfato de condroitina) no reparo da cartilagem articular, na desaceleração no processo degenerativo, bem como o seu efeito analgésico (ZHANG *et al.*, 2005, ZHANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008).

De acordo com Bendele (2001), estudos em humanos envolvendo desde alterações graves de OA a abordagens clínicas e terapêuticas estão largamente estabelecidos. Entretanto, alterações precoces ainda são pouco definidas e as mudanças mais sutis ainda são difíceis de serem quantificadas por questões éticas associadas a obtenção das amostras em humanos.

Assim, como consequência direta desse entrave, numerosos modelos animais de OA têm sido desenvolvidos baseados na instabilidade mecânica ou nas intervenções químicas como meios de induzir a doença (LITTLE, ZAKI, 2012). Dessa forma, muito do conhecimento adquirido atualmente foi obtido a partir dos experimentos com modelos animais de OA (MASTBERGEN, LAFEBER, 2011).

1.3 Modelos Experimentais de Osteoartrite

De acordo com Hayami, Pickarski, Zhou (2006), nas últimas duas décadas, modelos animais têm contribuído bastante no entendimento de eventos precoces durante a progressão da OA.

Em Outubro de 2010, a revista *Osteoarthritis and Cartilage* publicou um suplemento com modelos e guias para monitoramento histopatológico da progressão da OA em animais como camundongo, rato, coelho, cachorro, ovelha e cavalo. Cada referência inclui uma revisão dos métodos publicados de indução de OA por espécie, bem como as formas de análise histológica comumente utilizadas (GLASSON *et al.*, 2010).

A progressão espontânea de OA em animais de laboratório é naturalmente lenta. Por essa razão induções cirúrgicas de instabilidade articular, bem como modelos químicos e mecânicos têm sido utilizadas para acelerar a doença nesses animais. Apesar dos modelos experimentais apresentarem suas limitações e peculiaridades, inúmeros modelos murinos cirúrgicos de OA são estudados (TEEPLE *et al.*, 2013).

Entre os principais modelos para o estudo da OA estão a transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA), a desestabilização do menisco medial (DMM) ou meniscotomia e a remoção do menisco medial (meniscectomia) com ou sem transecção de ligamentos (BENDELE, 2001).

Modelos cirúrgicos de instabilidade mecânica são os mais utilizados por reproduzirem experimentalmente o trauma crônico observado na OA. Essa instabilidade leva ao desenvolvimento das lesões na cartilagem e remodelação óssea (LEITE *et al.*, 2014).

Dentre os modelos, a TLCA é a mais utilizada (HAYAMI, PICKARSKI, ZHOU *et al.*, 2006), com alterações compatíveis com OA humana, edema de matriz, perda de condrócitos e fibrilação da cartilagem. Além das alterações da cartilagem, esse modelo apresenta remodelação óssea caracterizada pela perda inicial do osso subcondral após 2 semanas da cirurgia, com posterior aumento de seu volume (HAYAMI *et al.*, 2004; HAYAMI, PICKARSKI, ZHOU *et al.*, 2006).

A meniscectomia do menisco medial produz uma doença degenerativa articular e lesões consistentes em camundongos. Pequenas alterações degenerativas na microscopia óptica foram observadas 4 semanas após a cirurgia e modificações estruturais progressivas foram visualizadas após 8 e 12 semanas (CHANCIE, CLIVE, STUART, 2012).

Em um estudo realizado por Tadashi *et al.* (2006) foram avaliados os modelos de TLCA e combinação da TLCA com meniscectomia. Os autores

observaram uma progressão mais lenta da doença na TLCA. Na combinação, ocorreu dano agressivo à cartilagem após 2 semanas da cirurgia, bem como formação de osteófitos e fibrilação. Essa gravidade foi associada ao maior grau de instabilidade articular.

A transsecção do menisco medial (meniscotomia) é estudada em várias espécies. Histologicamente, o início da lesão em ratos é definido pela fibrilação e perda de proteoglicanos e, em estágios mais avançados, ocorre exposição do osso subcondral e formação de osteófitos (BOVE *et al.*, 2006).

Em estudo recente, Leite *et al.* (2014) demonstraram que camundongos submetidos a uma meniscotomia desenvolveram OA mais grave e mais sintomática que camundongos submetidos à retirada do menisco (meniscectomia). Foi observada ainda uma marcante sinovite nesses animais, demonstrando o componente inflamatório presente. De fato, o tecido sinovial participa de reações imunológicas, contribuindo para o controle do ambiente articular (BRONNER, FARACH-CARSON, 2007).

De fato, a sinóvia desempenha papel importante na OA, sendo os sinoviócitos a principal fonte de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que, por sua vez, diminuem a síntese de colágeno e aumentam mediadores catabólicos, como metaloproteinases (MMPs) e outras substâncias inflamatórias como interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6), prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (NO) (PELLETIER, MARTEL-PELLETIER, ABRAMSON, 2001).

No âmbito do processo inflamatório articular, a literatura fornece evidências consistentes sobre uma associação entre inflamação sinovial e sintomas de OA. Sabe-se que a inflamação sinovial aumenta a sensibilidade de nociceptores¹, levando a uma maior sensibilidade à dor, contribuindo com o aumento da experiência da dor, como a observada na OA (NEOGI *et al.*, 2016). Estruturas como osso subcondral, membrana sinovial, ligamentos e cápsula articular são ricamente inervados e contêm fibras nervosas que podem ser fonte de estímulos nociceptivos na OA (KIDD, PHOTIOU, INGLIS, 2004).

¹ Nociceptores são terminações nervosas livres, não especializadas, que respondem a estímulos nociceptivos, detectando, desse modo, lesão nos tecidos, onde os estímulos desencadeantes podem ser mecânicos, térmicos ou químicos (MILLAN, 2002).

Considerando o envolvimento de muitos tecidos na progressão da OA, Moisiso *et al.* (2011) refere que o osso subcondral tem atraído para si muito da possível etiologia da dor em virtude de sua íntima relação com a cartilagem, sua rica inervação e sua resposta a carga dinâmica. Portanto, a ele é atribuído o importante papel no desencadeamento da dor e na progressão da doença.

Além da participação do osso subcondral, a sinóvia, a cápsula articular e as estruturas extraarticulares, bem como o crescimento de osteófitos são considerados os grandes causadores da dor no início da doença (DIEEPE, 1999) de acordo com a Figura 4.

Figura 4- Processos-chave envolvendo o início e a progressão da OA. A destruição da cartilagem pode resultar de inúmeras causas, incluindo anormalidades articulares congênicas, traumas, anomalias genéticas, além de fatores mecânicos. Perda do controle muscular ou instabilidade ligamentar também podem contribuir nesse desgaste. A destruição da articulação resulta num desarranjo nas forças biomecânicas que ativa o processo da OA: osteófitos tentam “reforçar” a articulação e o aumento do osso subcondral tenta reestabelecer a forma e altura da articulação.



Fonte: Adaptada de Dieppe (1999).

No contexto da participação do osso subcondral na OA, as alterações histopatológicas presentes nessa estrutura são caracterizadas por edema, necrose, fibrose e microfraturas com hemorragias em diferentes estágios (ZANETTI *et al.*, 2000, SAADAT *et al.*, 2008, MURATOVIC *et al.*, 2016).

A *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) classifica as alterações histológicas do tecido cartilaginoso em graus, de acordo com a gravidade das lesões de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1- Classificação das alterações histológicas da cartilagem articular de acordo com a OARSI.

Classificação	Características encontradas
GRAU 1	Presença de fibrilação articular superficial, sulcos verticais, edema focal ou generalizado da cartilagem, hipertrofia de condrócitos, com formação de aglomerados denominados <i>clusters</i> ² , perda da orientação normal das células, podendo haver necrose e apoptose dos condrócitos
GRAU 2	Esfoliação, ou destacamento de fragmentos de cartilagem da camada superficial, redução da coloração pela Safranina-O, refletindo a perda de proteoglicanos nas regiões mais superficiais da cartilagem.
GRAU 3	As alterações nos condrócitos são mais evidentes, com maior proliferação e desorientação celular e as fissuras verticais se estendem até a zona de transição.
GRAU 4	Áreas de delaminação e escavação da cartilagem, com erosões profundas, associadas à proliferação e morte dos condrócitos
GRAU 5	Apresenta áreas de desnudamento da superfície cartilaginosa, com exposição do osso subcondral
GRAU 6	Evidencia intenso remodelamento e deformidade do osso subcondral.

Fonte: PRITZKER *et al.* (2006)

² *Clusters* ou clones de condrócitos são evidências de replicação local dos condrócitos em resposta à agressão (MCGAVIN, 2009).

Assim, acredita-se que o estudo da cartilagem, em seu aspecto mais detalhado por meio de uma magnificância superior à permitida pela tradicional microscopia óptica, possa contribuir no entendimento das alterações histopatológicas e clínicas em intervalos precoces de OA.

1.4 Métodos ultraestruturais de análise da cartilagem

Hunter (1743) foi um dos primeiros a descrever a estrutura da cartilagem em camadas, formadas por fibras paralelas, orientadas perpendicularmente ao osso e capazes de tolerar carga. Desde então, o estudo e a compreensão da cartilagem articular têm passado por inúmeras transformações.

Nesse âmbito, o estudo da OA vem consolidar a necessidade de se compreender a cartilagem articular e suas alterações nessa patologia por ser essa uma doença frequente e responsável por 30 a 40% das consultas ambulatoriais de Reumatologia segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia (2016).

Além do estudo de Hunter (1743), outros envolvendo a cartilagem articular foram realizados por meio de técnicas de microscopia óptica (FAWNS, LANDELLS, 1953; HYLLESTED VEJE, OSTERGAARD, 2002), luz polarizada (BENNINGHOFF, 1925; OLIVIER *et al.*, 2001), microscopia confocal a laser (GIRKIN, MCCONNELL, 2005) microscopia eletrônica de transmissão (ANDERSON, 1964, JURVELIN *et al.*, 1996), microscopia eletrônica de varredura (INOUE *et al.*, 1969, CLARK *et al.*, 1999), microscopia por geração de segundo harmônico³ (CAMPAGNOLA, 2011), dentre outras.

As técnicas de aquisição de imagens são amplamente utilizadas para obter dados topográficos da superfície da cartilagem. Essas técnicas permitem investigações qualitativas e quantitativas das características de desgaste da superfície articular em níveis de micron e nano-metro. Algumas técnicas também podem ser usadas para avaliar as características mecânicas e biológicas das cartilagens (BHUSHAN, POON, 1995; KUMAR *et al.*, 2001).

³ A microscopia por geração de segundo harmônico (SHG) é um processo óptico não linear de segunda ordem utilizado em tecidos biológicos, em especial para observação da rede fibrilar de colágeno. O sinal SHG é originário de dois fótons de excitação que interagem com o material e são "reconvertidos" para formar um novo fóton emitido com metade do comprimento de onda (BUENO, ÁVILA, ARTAL, 2016).

Técnicas de imagens ultraestruturais de alta resolução têm a capacidade de revelar características patológicas da OA antes mesmo das análises bioquímicas (PEARLE, WARREN, RODEO, 2005).

Em combinação com técnicas de coloração, a análise ultraestrutural possibilita o desenvolvimento de ferramentas não-invasivas para o diagnóstico e prognóstico da OA (HE *et al.*, 2014).

Segundo HE *et al.* (2014), microscópios eletrônicos são ferramentas importantes para compreender a ultraestrutura articular seja em condições híidas ou em situações de desgaste, exibindo especialmente células e componentes fibrilares.

A cartilagem articular, especificamente de camundongos, parece ser uma boa escolha para investigações envolvendo microscopia eletrônica visto que seu pequeno tamanho permite boa fixação de toda amostra, preservando o tecido em sua máxima integridade estrutural, além de seu curto período para criação e amadurecimento (HUGHES, ARCHER, 2005).

1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

É sabido que microscópios ópticos convencionais utilizam um feixe de luz e ficam limitados a um aumento máximo de 2.000 vezes, porque acima deste valor, detalhes menores são imperceptíveis. Ao passo que os aparelhos de microscopia eletrônica, ao utilizarem um feixe de elétrons, permitem aumentos de 300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas (KESRENBACHK, 1994).

De acordo com Nagatani *et al.* (1987), a MEV é uma das mais versáteis técnicas disponíveis para a observação e a análise de características microestruturais de objetos sólidos. Outra característica importante da MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras. Permite também o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica.

O primeiro trabalho reconhecido descrevendo o conceito de um microscópio eletrônico de varredura foi o de Knoll (KNOLL, 1935). O princípio da MEV consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas e transmitir o sinal do

detector a uma tela catódica cuja varredura está perfeitamente sincronizada com aquela do feixe incidente.

Remonta a muitas décadas a utilização do MEV como um método especialmente importante no estudo das superfícies articulares de acordo com Redler, Zimny (1970).

Em escala nanoscópica, a superfície articular fisiológica é formada por uma densa e organizada rede de fibras colágenas, suavemente ondulada, com o arranjo regular de pequenas depressões formando figuras (CLARKE, 1971, COTTA, 1973, REDLER, 1974, INOUE *et al.*, 1969). Nas superfícies com OA, além da irregularidade, há fibras nodulares e microcrateras (REDLER, 1974).

Não são raros os estudos envolvendo a análise da ultraestrutura da cartilagem como método complementar de outros achados. Dentre esses, Korkala *et al.* (1984) estudou a superfície articular de coelhos submetidos a meniscectomia após 2, 4 e 12 semanas após a indução da OA. Fujie, Imade (2015) analisaram o efeito da baixa permeabilidade tangencial na propriedade friccional da camada mais superficial da cartilagem articular. Candolin, Videman (1980) induziram a OA por imobilização dos joelhos de coelhos por 8 semanas e analisaram a superfície articular do fêmur, tíbia e patela por meio de MEV. Teshima *et al.* (1995) estudaram a camada mais superficial da cartilagem articular obtidas, por artroplastia, em cabeças femurais humanas por meio de luz polarizada e MEV.

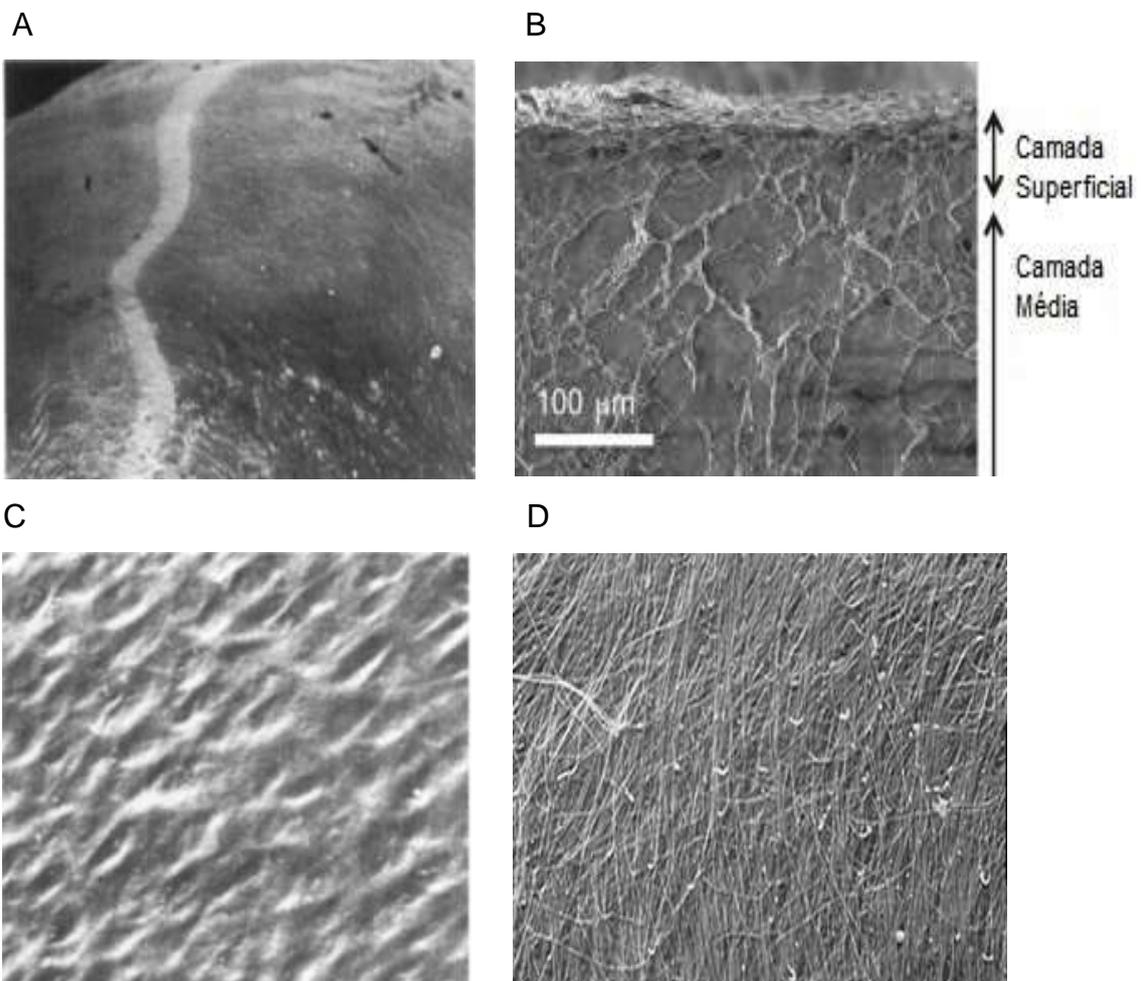
A Figura 5 reúne imagens desses estudos, considerando a morfologia da cartilagem articular normal em diferentes aumentos.

A progressão da OA está associada a mudanças na morfologia e na organização dos componentes da cartilagem (BUSH, HALL, 2003). Por meio da MEV, é possível estudar a localização de um composto ou molécula específica, a alteração da morfologia dos condrócitos e a alteração arquitetônica dos componentes fibrilares na cartilagem articular (HE *et al.*, 2014).

Todavia, a característica mais notável dos microscópios eletrônicos é a capacidade de gerar melhor imagem dos proteoglicanos comparativamente ao microscópio óptico. Isso possibilita a avaliação da cartilagem em condições patológicas e investiga sua propriedade compressiva por meio da morfologia dos proteoglicanos, assim como a densidade, o comprimento e a magnitude da agregação. Ou seja, a alta ampliação e a capacidade de resolução de imagem

superior explicam o motivo pelo qual os microscópios eletrônicos superam os microscópios de luz disponíveis ao fornecer informações estruturais detalhadas sobre a cartilagem articular (HE *et al.*, 2014).

Figura 5- Aspecto da cartilagem articular normal por MEV. (A) A imagem representa a superfície articular femoral de coelhos, com a linha epifisária mais clara entre os côndilos numa visão panorâmica (Aumento de 80x). (B) A imagem revela, num corte transversal, a superfície da cartilagem articular femoral de porco em suas camadas superficial e média. (C) Superfície articular do côndilo femoral de coelho em condições normais (Aumento de 700x). (D) Imagem por MEV da cabeça femoral de humanos, composta por fibras colágenas predominantemente no sentido longitudinal (Aumento de 2.200x).



Fonte: KORKALA *et al.* (1984); FUJIE, IMADE (2015); CANDOLIN, VIDEMAN (1980); TESHIMA *et al.* (1995).

No âmbito clínico, a evolução da OA também pode ser avaliada por biomarcadores funcionais de imagem. Sabe-se que a curto prazo, danos induzidos mecanicamente por ruptura de tecidos podem ser visualizados direta ou indiretamente, como defeitos estruturais (por meio do exame de ressonância magnética) ou pela quantificação da tensão da carga passiva na articulação. Mudanças a longo prazo no processo de degeneração da matriz extracelular da cartilagem e estruturas circundantes podem ser igualmente detectadas por mudanças estruturais grosseiras, incluindo aumento do defeito, além de incremento no tamanho ou volume, observadas nos exames radiográficos e ultrasonografias (NEU, HULL, WALTON, 2005).

Dessa maneira, o estudo das alterações precoces na superfície da cartilagem articular de camundongos poderá contribuir na elucidação das vias fisiopatológicas da OA, esclarecendo como mudanças ao nível tecidual relacionam-se a mudanças estruturais e funcionais.

2 JUSTIFICATIVA

A OA é uma doença articular crônica degenerativa muito comum em pessoas idosas, decorrente do uso e do desgaste da articulação, embora possa acometer jovens, após lesões articulares (WOOLF, PFLEGER, 2000, American College of Reumathology, 2012).

A Organização das Nações Unidas (2012) estima que, em 2050, 130 milhões de pessoas sofrerão com OA em todo mundo e que 40 milhões de pessoas serão grave e funcionalmente afetados por essa doença.

A ideia de que a OA seja uma doença progressiva de evolução lenta, sem perspectiva de tratamento, encarada por muitos como um processo natural do envelhecimento vem sendo questionada, em boa parte pela descrição de componentes inflamatórios que participam nos mecanismos de lesão da articulação acometida por OA.

Destaca-se, especificamente, a proposta de que a OA seja parte de um acometimento sistêmico, com componentes inflamatórios, associada a outros eventos como obesidade, síndrome metabólica e doença aterosclerótica (BERENBAUM, 2012; BIJSMA, KNAHR, 2007).

Essa mudança de paradigma tem contribuído para elucidação de mecanismos de lesão na OA. De sorte que, recentemente, alterações do menisco vêm sendo propostas como fundamentais no desencadeamento de lesão nessa doença. A contribuição singular do menisco está associada à demonstração da liberação de mediadores inflamatórios no ambiente articular. Ainda, foi sugerido que há uma repercussão sistêmica pela elevação de proteína C reativa no soro de indivíduos jovens acometidos de lesão do menisco que desenvolveram OA (MCALINDON *et al.*, 2015).

As alterações estruturais vistas à microscopia óptica estão bem estabelecidas em modelos animais de OA. Entretanto, alterações ultraestruturais, que podem ocorrer em intervalos mais precoces, carecem de documentação e padronização.

É importante caracterizar essa evolução, uma vez que pode permitir intervenções com vistas a modular a evolução da doença de forma mais precoce. Além disso, a possibilidade de definir alterações nas células e componentes da matriz

extracelular pode representar avanço relevante na compreensão do desenvolvimento de lesões para se tentar deter esse avanço com benefícios ao tratamento.

Métodos sensíveis para detectar mudanças estruturais no início do desenvolvimento dessa patologia são cruciais na descoberta de agentes-chave no desencadeamento e na progressão da doença, além da análise da eficácia terapêutica em novos tratamentos (MARTEL-PELLETIER, PELLETIER, 2010; BIJLSMA, BERENBAUM, LAFEBER, 2011).

Não custa reiterar que o tratamento da OA, doença ósteo-articular mais prevalente em indivíduos de meia-idade e idosos e com tendência de aumento na prevalência, ainda é uma necessidade não-atendida, sendo, portanto, urgentes estudos que avancem na compreensão da fisiopatologia e subseqüentes ganhos no tratamento desses pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar as lesões ultraestruturais precoces na cartilagem articular desenvolvidas em dois modelos cirúrgicos de indução de OA em camundongos nos tempos de 3, 7 e 14 dias pós-cirurgia.

3.2 Objetivos Específicos

- Classificar as alterações histológicas na sinóvia de camundongos submetidos à TLCA e DMM,
- Classificar as alterações na cartilagem articular de camundongos submetidos à TLCA e DMM,
- Analisar a espessura da cartilagem articular de camundongos submetidos à TLCA e DMM,
- Detectar alterações em relação ao número de camadas de condrócitos da cartilagem articular em camundongos submetidos à TLCA e DMM,
- Observar o coeficiente de rugosidade da cartilagem articular em camundongos submetidos à TLCA e DMM,
- Classificar a degradação articular em camundongos submetidos à TLCA e DMM.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Este foi um estudo prospectivo, randomizado, controlado e cego, utilizando modelos animais de camundongos induzidos cirurgicamente a OA. Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações apresentadas no artigo 14 da Lei Arouca (BRASIL, 2008) que visam garantir atenção ao bem-estar animal durante todo o protocolo experimental de intervenções científicas, obedecendo a ideia dos “3Rs” (Redução, Reposição e Refinamento) de Russel e Burch (MENEZES, 2002). O referente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal – CEPA da UFC com aprovação em 01 de Junho de 2016 sob o protocolo nº 07/2016 (ANEXO A).

4.2 Seleção dos animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (20-25 g) machos fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará - UFC. Os animais permaneceram em caixas de prolipropileno, recebendo água e alimentação *ad libitum* e foram submetidos a condições controladas de temperatura (21° C), com 12h de ciclo claro/escuro. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados seguindo a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA (CONCEA, 2013) preconizada pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL), buscando minimizar o número e o sofrimento dos animais.

4.3 Drogas

As drogas utilizadas foram cloridrato de ketamina (Cetamin®, Syntec) e cloridrato de xilazina (Xilazin®, Syntec).

4.4 Grupos Experimentais e procedimento cirúrgico

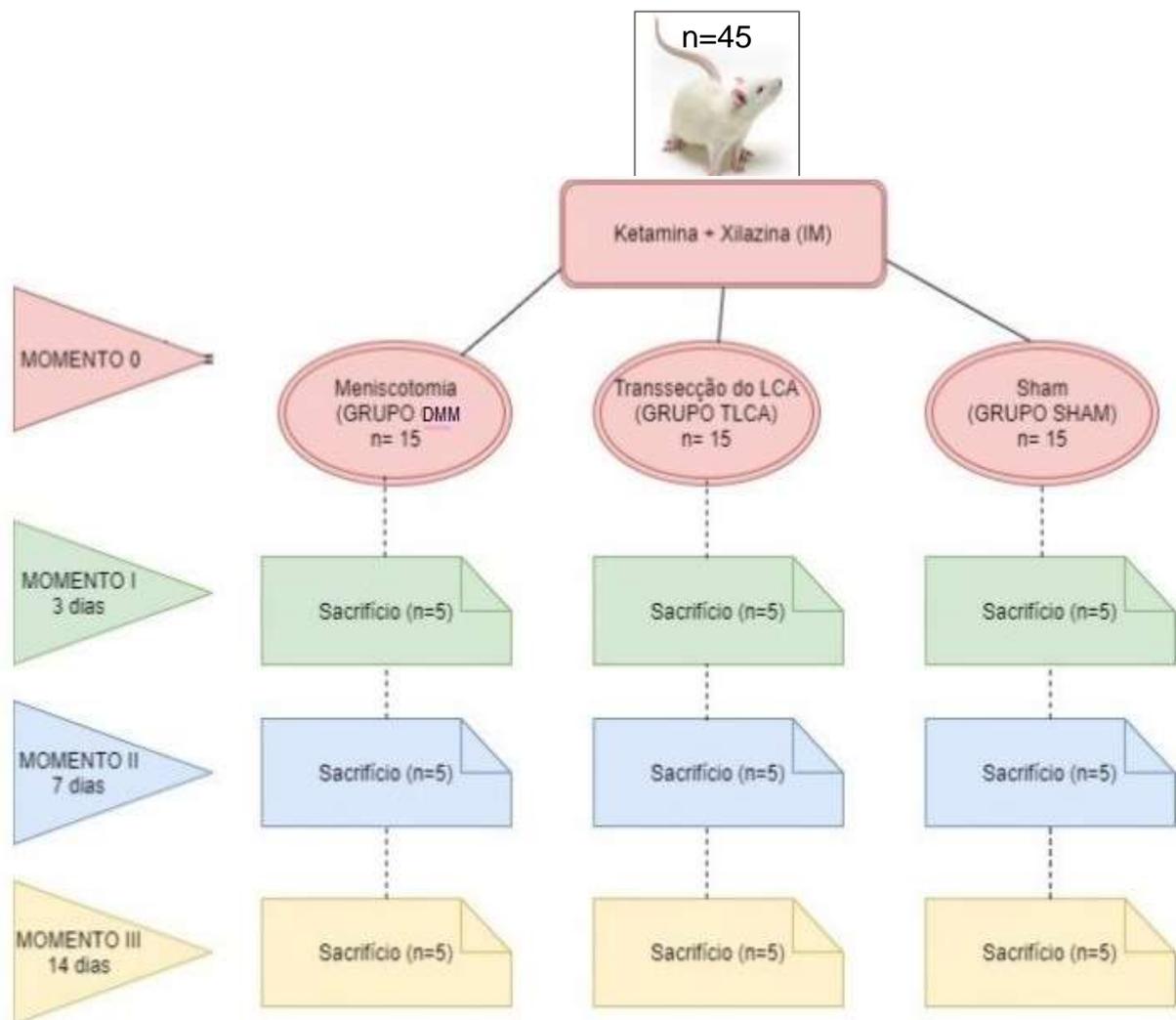
Um total de 45 animais foram utilizados no presente estudo. Camundongos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), por via intramuscular (i.m.). O joelho direito foi submetido à assepsia, seguida por uma incisão longitudinal da pele.

Os animais foram randomicamente divididos em três grupos experimentais:

- GRUPO DMM: Esse grupo foi constituído por 15 animais submetidos a cirurgia e eutanasiados sob anestesia nos tempos de 3, 7 e 14 dias. A cápsula articular medial foi exposta e o ligamento cruzado anterior, seccionado. Em seguida, o menisco medial foi transecionado. Depois da transecção do menisco medial, a cápsula articular e a pele foram suturadas com Vycril 5-0 e Nylon 4-0, respectivamente.
- GRUPO TLCA: Esse grupo foi constituído por 15 animais submetidos a cirurgia e eutanasiados sob anestesia nos tempos de 3, 7 e 14 dias. A cápsula articular medial foi exposta e o ligamento cruzado anterior, seccionado. Em seguida, a cápsula articular e a pele foram suturadas com Vycril 5-0 e Nylon 4-0, respectivamente.
- GRUPO SHAM: Esse grupo foi constituído por 15 animais submetidos a cirurgia e eutanasiados sob anestesia nos tempos de 3, 7 e 14 dias. O grupo sham (falso-operado) foi submetido apenas à incisão da pele e ruptura da cápsula articular medial, seguidas por sutura dos tecidos.

O delineamento experimental obedeceu ao esquema de estudo a seguir representado pela Figura 6.

Figura 6- Delineamento experimental do estudo. No total, 45 animais foram utilizados, divididos em três grupos DMM, TLCA e sham. Cada grupo foi composto por 15 animais. Cada subgrupo de 05 animais foi sacrificado em três momentos distintos, a saber: 3, 7 ou 14 dias. LCA- ligamento cruzado anterior; IM- intramuscular; sham - falso operado.



Fonte: elaborada pela autora (2018).

4.5 Sacrifício dos animais

Subgrupos de animais (n=5) foram sacrificados aos 3, 7 ou 14 dias do ato cirúrgico, sob anestesia seguida por deslocamento cervical.

Esses momentos foram escolhidos por se tratarem de estágios precoces pós indução de OA, até então pouco investigados.

Três articulações foram utilizadas para o preparo de material para análise por MEV e duas, para o preparo de material para análise por MO.

4.6 Preparo do material histológico

Após o sacrifício dos animais, as articulações fêmur-tibiais foram retiradas cirurgicamente.

As articulações foram fixadas em formol 10%, descalcificadas em solução de EDTA 10% e incluídas em parafina. Cortes histológicos seriados (5µm), da porção mais externa para a porção mais interna, foram realizados em triplicata e corados por HE ou Safranina O.

4.7 Análise histológica da sinóvia

Lâminas contendo cortes histológicos de 5µm foram coradas por hematoxilina - eosina (HE). Foram avaliadas por microscopia óptica, seguindo uma classificação semi-quantitativa realizada por um patologista cego para os grupos experimentais.

A análise da membrana sinovial na articulação retirada baseou-se em um grau de escores para cada grupo, de acordo com a proliferação sinovial, infiltração de células, fibrose e estágio da doença, variando de 0 a 3 (0- ausente, 1- suave, 2- moderado e 3- grave) para cada parâmetro. A pontuação máxima dos escores totais foi de 12 (ROCHA *et al.*, 2008).

4.8 Análise histológica da cartilagem

A análise das lâminas coradas por Safranina-O foi feita utilizando-se Microscópio da marca Olympus com objetiva de 40X. As secções histológicas foram analisadas de forma cega por patologista experiente.

Os critérios padronizados pela OARSI foram utilizados para a avaliação da cartilagem articular (PRITZKER *et al.*, 2006). As articulações foram analisadas, atribuindo-se escores do fêmur e da tíbia. Segundo esse sistema, grau, variando de 0 a 6, avalia a gravidade da lesão da cartilagem articular, enquanto estágio, variando de 1 a 4, avalia a extensão das lesões compatíveis com OA. O grau é fornecido pela lesão mais grave observada na lâmina, independente da extensão da lesão. O estágio é definido pela extensão horizontal do acometimento da cartilagem, independente da

gravidade das lesões. Ao final, um escore é calculado pelo grau X estágio, o qual fornece uma avaliação combinada de gravidade e extensão do dano estrutural articular. O escore poderá variar de 0 a 24 (ROCHA, 1999; PRITZKER, 2006).

4.9 Preparo do material para MEV

Após o sacrifício, articulações dos joelhos (n=3) foram dissecadas e desarticuladas. Em seguida, fixadas por 8 horas a 4° C em uma solução de Karnovsky. Tal fixação química visa tornar as amostras condutoras e íntegras (CASTRO, 2002).

Após a fixação, as amostras foram desidratadas em soluções seriadas de álcool (70 a 100%) e submetidas a cortes de 1mm com Disco de corte diamantado High Concentration 4" x 0,012" x ½" LAPMASTER® em cortadeira Struers®. Três a quatro fatias foram feitas sagitalmente do fragmento de cada osso (fêmur e tibia) de três animais por grupo, nos diferentes tempos. Foram descartados os dois fragmentos externos de cada lado da amostra.

Procedeu-se à etapa do lixamento, importante para a remoção de danos mecânicos introduzidos pelo seccionamento, com o uso sucessivo de lixas com granulação mínima, sob lubrificação de água corrente. A seguir, foi realizado o banho ultra-sônico para limpeza da amostra.

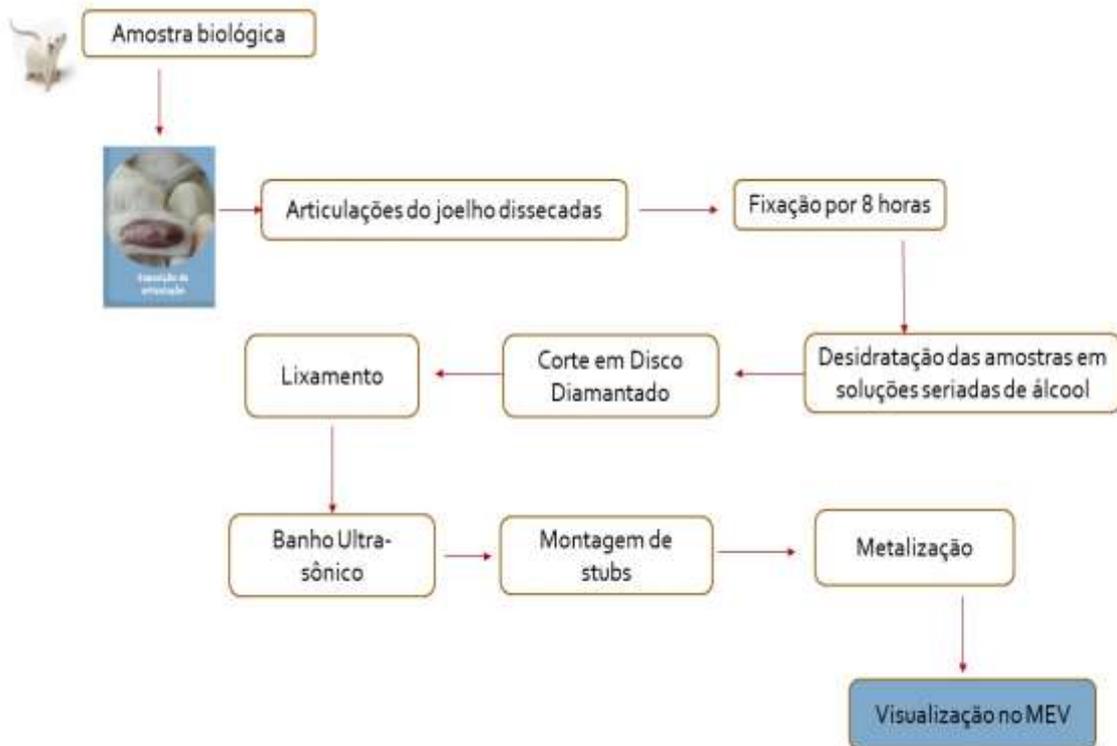
As amostras foram analisadas macroscopicamente com o auxílio de uma lupa e as fatias mais representativas foram dissecadas e mantidas em recipiente com pedras de sílica para evitar a umidade.

As amostras foram montadas em "stubs"⁴ na Central Analítica da UFC com auxílio do técnico em microscopia, com cuidados para evitar a contaminação e garantir perfeita aderência dos fragmentos por meio de fita de carbono ou cola de prata.

Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para metalização para serem recobertas por uma fina camada de ouro em pó (Metalizador Quorum QT150ES®, Quorum Technologies, Laughton, Inglaterra) para a análise por Microscopia Eletrônica por Varredura (FEI Inspect-F50®, Hillsboro, Oregon, USA), como ilustrado na Figura 7.

⁴ A amostra para MEV precisa ser montada no suporte porta-amostras do microscópio ("stub"), considerando a melhor orientação em relação ao feixe de varredura e o coletor de elétrons secundários. Conforme as dimensões do espécime, podem ser usados vários tipos de adesivos, representados por colas condutoras de prata ou carbono coloidal; esmalte de unha em quantidade mínima e fitas adesivas (CASTRO, 2002).

Figura 7- Principais etapas do processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

4.10 Autorização e obtenção das imagens por MEV

A pesquisa foi submetida e aprovada pela Central Analítica sob o código 2016PP187.

As amostras metalizadas foram então submetidas à análise por MEV em sessões pré-agendadas na Central Analítica da UFC.

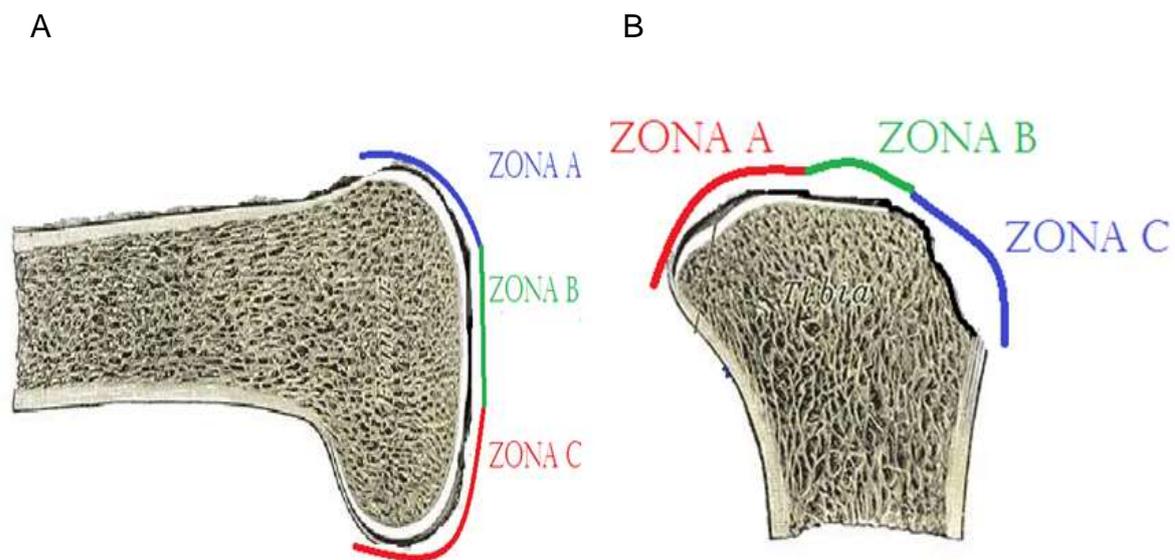
4.11 Análise das imagens por MEV

Cada articulação resultou em duas amostras: fêmur e tíbia. Cada uma das estruturas foi dividida em três zonas cada (A, B e C), para fins de análise, de acordo com a Figura 8. As imagens foram analisadas com auxílio do software ImageJ®, versão 1.51j, disponível em <https://imagej.nih.gov/ij/>. As imagens de MEV foram organizadas e combinadas com auxílio do software PhotoScape, versão 3.7, para melhor visualização das diferenças estruturais entre os grupos e seus diferentes

tempos. A superfície da cartilagem foi examinada, seguindo uma descrição predominantemente qualitativa, acrescida da observação de parâmetros quantitativos.

O joelho foi desarticulado com a finalidade de permitir a perfeita aderência da amostra ao stub, bem como garantir a melhor visualização da cartilagem articular em ambas extremidades ósseas.

Figura 8- Divisão em zonas A, B e C de fêmur (A) e de tíbia (B) de camundongos.



Fonte: Adaptado de <http://teachmeanatomy.info/lower-limb/joints/the-knee-joint/>

4.11.1 Medida de espessura da cartilagem

Após a devida calibração da escala, realizou-se a medida da espessura da cartilagem articular em nove pontos selecionados aleatoriamente. Três medições foram feitas em zonas específicas (A, B e C) de cada amostra, no aumento de 80x (CAMARGO FILHO, 2006).

4.11.2 Contagem das camadas de condrócitos

Procedeu-se à contagem do número de camadas de condrócitos nos nove pontos selecionados para medição da espessura da cartilagem. Três valores foram feitos em cada zona específica da amostra (A, B e C), no aumento de 350x.

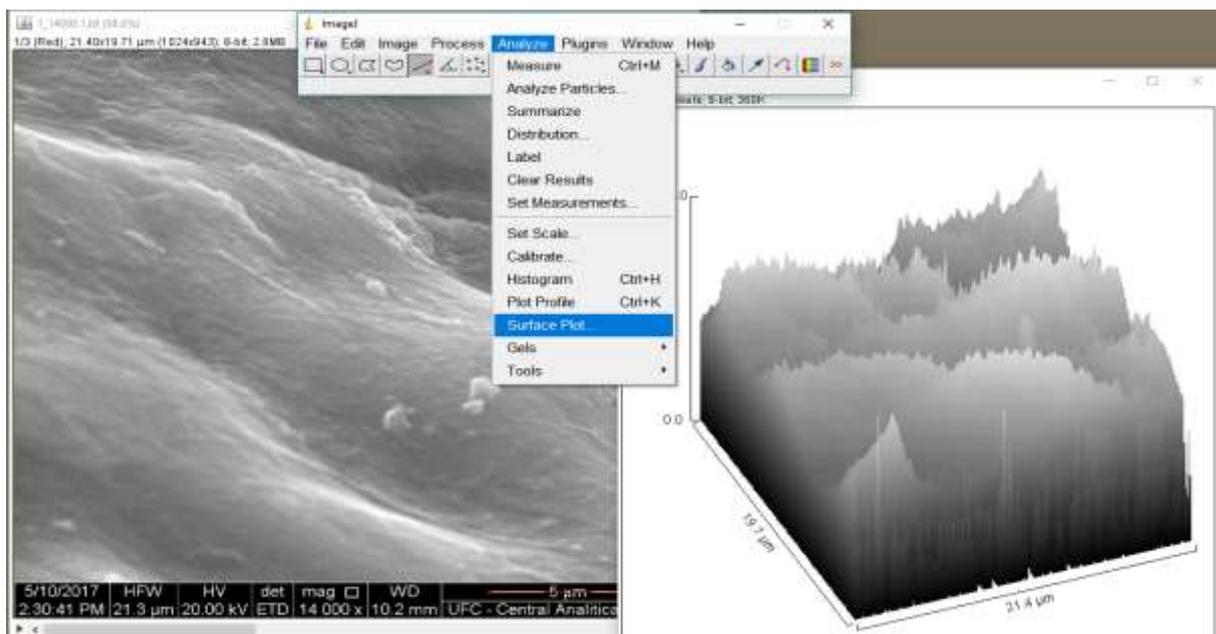
4.11.3 Surface plot 3D

A superfície efetiva é avaliada por técnicas de medição de picos e vales, com forma aproximada da superfície real de uma peça. No presente estudo, tratou-se da superfície apresentada e analisada pelo instrumento de medição do software ImageJ. É importante esclarecer que existem diferentes sistemas e condições de medição que apresentam diferentes superfícies efetivas (SOUZA, 2011).

Foram feitas imagens microtopográficas representativas da superfície da cartilagem articular em 0,1 x 0,1 mm por meio do plugin *Surface plot 3D* do ImageJ para cada grupo em diferentes tempos. Este plugin cria imagens de superfície interativos de todos os tipos de imagens como apresentado na Figura 9. Foram escolhidas cores a partir da escala de cinza e em tonalidades variadas.

O *Surface Plot* permite a representação interativa de toda a superfície da imagem por MEV por meio das mudanças nos níveis de cinza da imagem, possibilitando ajustes de ângulo de visão, perspectiva, escala, iluminação e suavização (DIAS, 2008).

Figura 9- Ilustração da ferramenta Surface Plot 3D. Esse recurso permite criar imagens microtopográficas, permitindo a visualização de detalhes da superfície articular.



Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Tal ferramenta de processamento de imagens visa a extração de informações, na qual o programa fornece parâmetros da imagem que possibilitarão a descrição, interpretação ou entendimento da cena fornecida pelo computador (DIAS, 2008).

4.11.4 Coeficiente *Ra* de rugosidade

De acordo com Ghosh *et al.* (2013), a rugosidade da superfície pode ser caracterizada por uma variedade de parâmetros de rugosidade. A mais utilizada é a média aritmética *Ra* obtida por meio de um *plugin* do ImageJ chamado *Roughness calculation*.

Segundo as normas técnicas, rugosidade média ou *Ra* é definida como a média aritmética de todos os desvios do perfil de rugosidade da linha média dentro do comprimento de medição. Observa-se que os riscos superficiais inerentes ao processo não alteram muito seu valor, para a maioria das superfícies (ALVES, 2011).

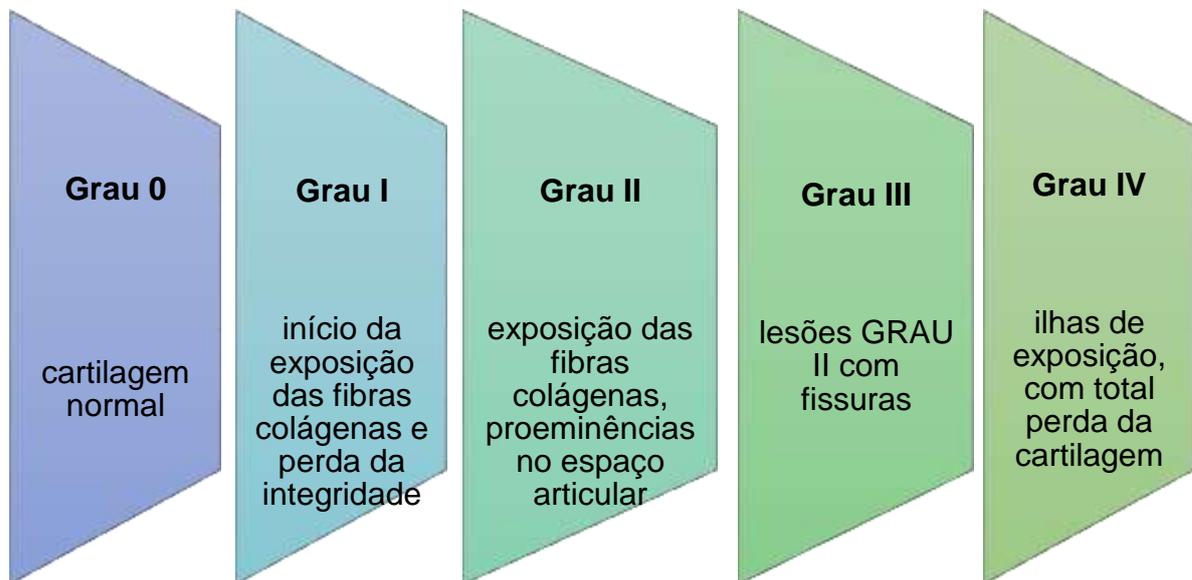
Para essa medição, foram utilizadas imagens da superfície da cartilagem articular das três zonas de cada amostra (A, B e C), no aumento de 14.000x, resultando num total de três valores de *Ra* por amostra.

4.11.5 Classificação da degradação articular

Foi utilizada a Classificação de Degradação da Cartilagem Articular preconizada por Korkala *et al.* (1984). A classificação foi realizada de forma cega, utilizando aumento de 80x. Cada amostra foi observada quanto à presença de fissuras, perda da integridade articular, exposição das fibras colágenas, além da presença de proeminências no espaço articular, como indicado na Figura 10.

Cada amostra foi analisada individualmente, em zonas específicas do osso (A, B e C), totalizando três resultados.

Figura 10- Classificação de Degradação da Cartilagem Articular para MEV



Fonte: Adaptado de Korkala *et al.* (1984).

4.12 Análise Estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para confirmação da normalidade da distribuição dos resíduos e homocedasticidade, respectivamente. Confirmado o atendimento aos requerimentos para realização da análise de variância (ANOVA), esta foi realizada considerando um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x3x2 (correspondente a três tratamentos, três tempos e duas estruturas ósseas avaliadas), empregando-se o procedimento General Linear Models (GLM) do Programa Estatístico SAS (2002).

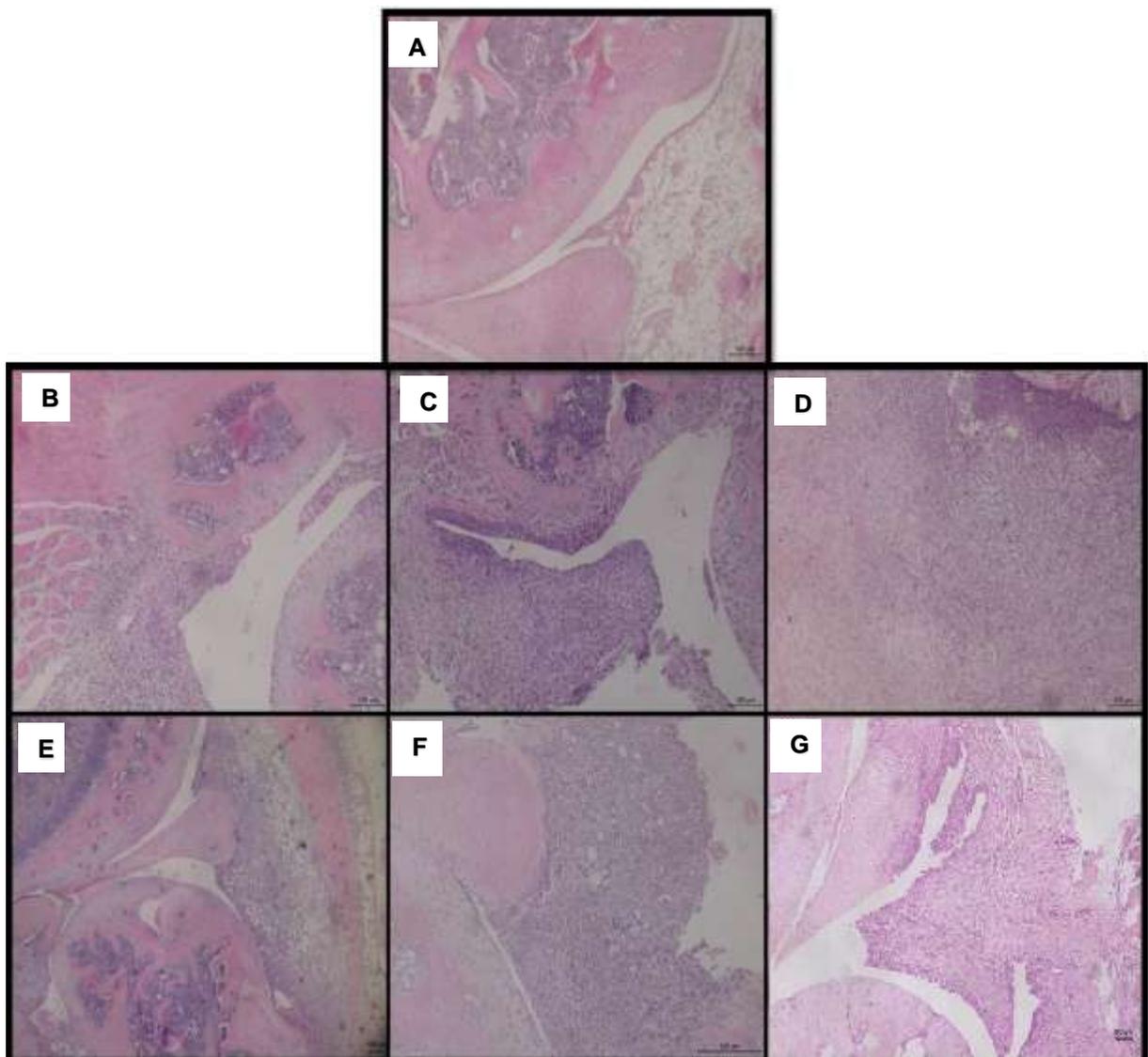
Quando qualquer dos efeitos principais avaliados ou suas interações demonstraram ser significativos, o teste de Bonferroni foi aplicado para comparação das médias. O teste Kruskal-Wallis foi usado na análise histopatológica, com resultados expressos em mediana. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão das médias e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histopatológica da sinóvia

A figura 11 ilustra a histopatologia da sinóvia de camundongos submetidos à OA por TLCA e DMM. Pode-se observar que o grupo TLCA (B-D) e DMM (E-G) apresentaram intensa proliferação de camadas de sinoviócitos.

Figura 11- Ilustração representativa da histopatologia sinovial de camundongos submetidos à OA pelos métodos de TLCA e DMM. A membrana sinovial do grupo sham (A) apresenta padrão de normalidade histológica, diferentemente das imagens do grupo TLCA 3 dias (B), 7 dias (C), 14 dias (D) e do grupo DMM 3 dias (E), 7 dias (F), 14 dias (G). Coloração por HE. (Ampliação original 100x).



Na tabela 1 foram apresentados os dados obtidos na análise morfológica das sinóvias dos animais dos grupos sham, TLCA e DMM, nos diferentes dias, de acordo com os escores histológicos da sinóvia.

Tabela 2- Efeito da indução da OA sobre as sinóvias de camundongos submetidos à TLCA ou DMM.

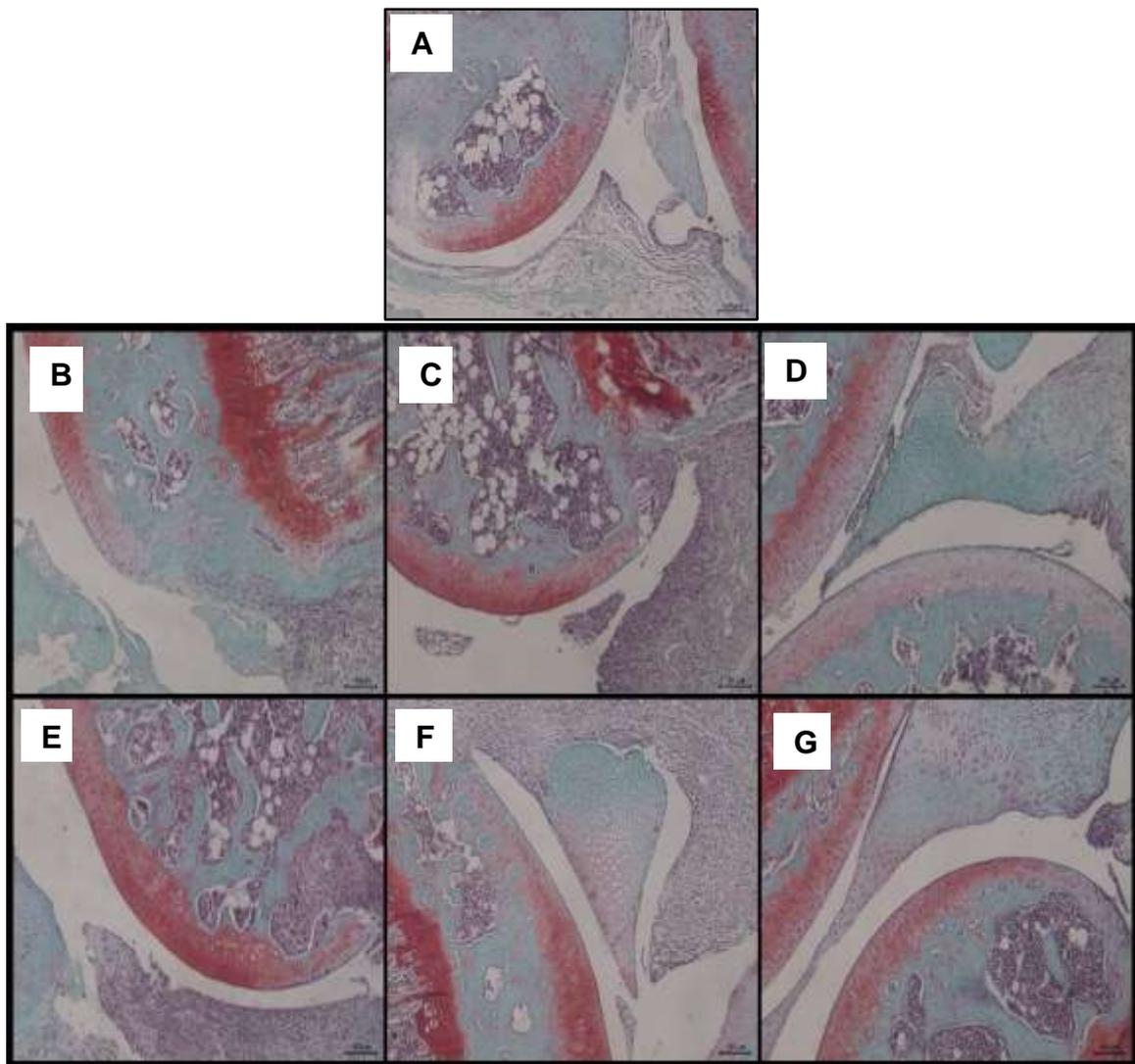
	Infiltrado	Estágio da doença	Proliferação da camada sinovial	Fibrose	Escores totais
sham	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-1,0)	0
TLCA 3d	2,5 (2,0-3,0)	2,0 (2,0-2,0)	1,0 (1,0-1,0)	0,0 (0,0-0,0)	5,5
TLCA 7d	2,5 (2,0-3,0)	2,5 (2,0-3,0)	2,0 (1,0-3,0)	2,5 (2,0-3,0)	9,5
TLCA 14d	2,5 (2,0-3,0)	2,5 (2,0-3,0)	2,0 (1,0-3,0)	2,5 (2,0-3,0)	9,5
DMM 3d	3,0 (3,0-3,0)	2,0 (2,0-3,0)	1,0 (1,0-2,0)	2,5 (2,0-3,0)	8,5
DMM 7d	2,0 (2,0-2,0)	2,5 (2,0-3,0)	2,5 (2,0-3,0)	3,0 (3,0-3,0)	10
DMM 14d	2,0 (2,0-2,0)	3,0 (3,0-3,0)	1,5 (1,0-2,0)	3,0 (3,0-3,0)	9,5

5.2 Análise histológica da cartilagem articular

5.2.1 Coloração por HE e safranina O

Na microscopia óptica, todos os grupos sham, TLCA e DMM mostraram integridade das cartilagens articulares femorais e tibiais (Figura 12).

Figura 12- Ilustração representativa da histopatologia das articulações em intervalos precoces de OA induzidas por dois métodos cirúrgicos: TLCA e meniscotomia. (A) Grupo sham, (B) Grupo TLCA 3 dias, (C), 7 dias, (D), 14 dias, (E) Grupo DMM 3 dias, (F) 7 dias, (G) 14 dias. Coloração por HE e safranina-O. (Ampliação original 100 x).



A classificação de desgaste da cartilagem articular de acordo com os parâmetros preconizados pela *OARSI* não foi executada, visto que grupos sham e experimentais em intervalos precoces de indução de OA apresentaram as mesmas características histológicas.

A superfície articular, à luz da microscopia óptica, através da coloração por safranina-O encontrou-se livre de irregularidades, com afinidade tintorial preservada em todos os grupos e tempos de experimento. Na análise das imagens, parâmetros de grau e extensão foram nulos, totalizando um escore histológico indicativo de cartilagem articular completamente preservada inclusive nos grupos TLCA e DMM.

5.3 Análise de imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura

Foram obtidas 661 imagens em doze sessões na Central Analítica da UFC, totalizando uma carga horária de 36 horas de obtenção de imagens, nos aumentos de 80, 350, 1.400 e 14.000x, com tensão aceleradora de 20 kV⁵.

As figuras 13 e 14 mostram, respectivamente, imagens de fêmur e de tíbia de camundongos no aumento de 80x, nos grupos sham, TLCA e DMM distribuídas em diferentes tempos de 3, 7 e 14 dias. Todas as amostras foram posicionadas de forma semelhante, de maneira a permitir uma visão global das amostras. Pode-se visualizar a superfície articular e suas zonas A, B e C, bem como linha epifisária e ossos esponjoso e compacto.

As figuras 15 e 16 mostram imagens de fêmur e de tíbia de camundongos no aumento de 350x, nos grupos sham, TLCA e DMM distribuídas em diferentes tempos de 3, 7 e 14 dias. Nos grupos experimentais, as alterações da cartilagem articular puderam ser melhor observadas nessa maior magnificância, especialmente no período de 14 dias. No grupo TLCA foram observados fissura e destacamento da camada superficial articular, ao passo que, no grupo DMM, destacaram-se as características de perda da continuidade e presença de irregularidades na superfície articular.

⁵ A tensão de aceleração do feixe de elétrons incidente é um dos parâmetros importantes para a microanálise. Os elétrons incidentes não poderão ejetar elétrons de uma energia superior à sua. O espectro irá, portanto, parar sobre o eixo das abscissas, em um valor de energia que corresponde à tensão de aceleração (DEDAVID, GOMES, MACHADO, 2007).

A figura 17 revela amostras de fêmur e de tíbia de camundongos no aumento de 14.000x. Neste aumento, pode-se observar um aspecto mais uniforme e liso no grupo sham. No grupo TLCA, áreas com maior relevo e heterogeneidade, com arranjos relativamente irregulares. No grupo DMM, com a progressão da OA, observou-se que a textura da superfície se tornou mais áspera, aparentemente com morfologia mais rugosa.

Figura 13- Imagens obtidas por MEV do fêmur de camundongos. (A) Fêmur do grupo sham 3 dias, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) Fêmur do grupo TLCA 3 dias, (E) 7 dias, (F) 14 dias, (G) Fêmur do grupo DMM 3 dias, (H) 7 dias, (I) 14 dias. Seta vermelha- Superfície articular, Seta amarela- Linha epifisária, Seta verde- osso compacto, Seta azul- osso esponjoso. (Aumento de 80x).

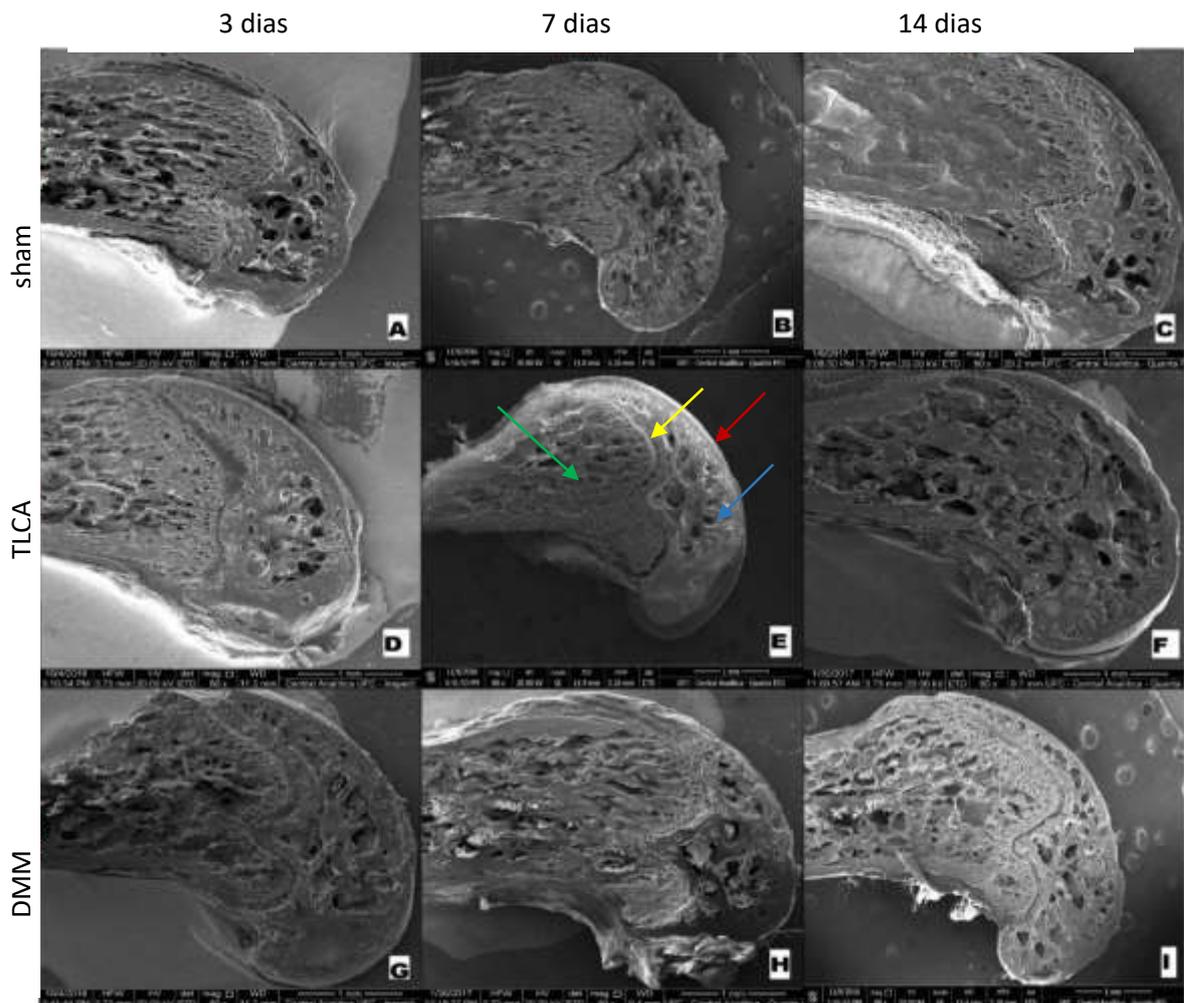


Figura 14- Imagens obtidas por MEV da tíbia de camundongos. (A) Tíbia do grupo sham 3 dias, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) Tíbia do grupo TLCA 3 dias, (E) 7 dias, (F) 14 dias, (G) Tíbia do grupo DMM 3 dias, (H) 7 dias, (I) 14 dias. Seta vermelha- Superfície articular, Seta amarela- Linha epifisária, Seta verde- osso compacto, Seta azul- osso esponjoso. (Aumento de 80x).

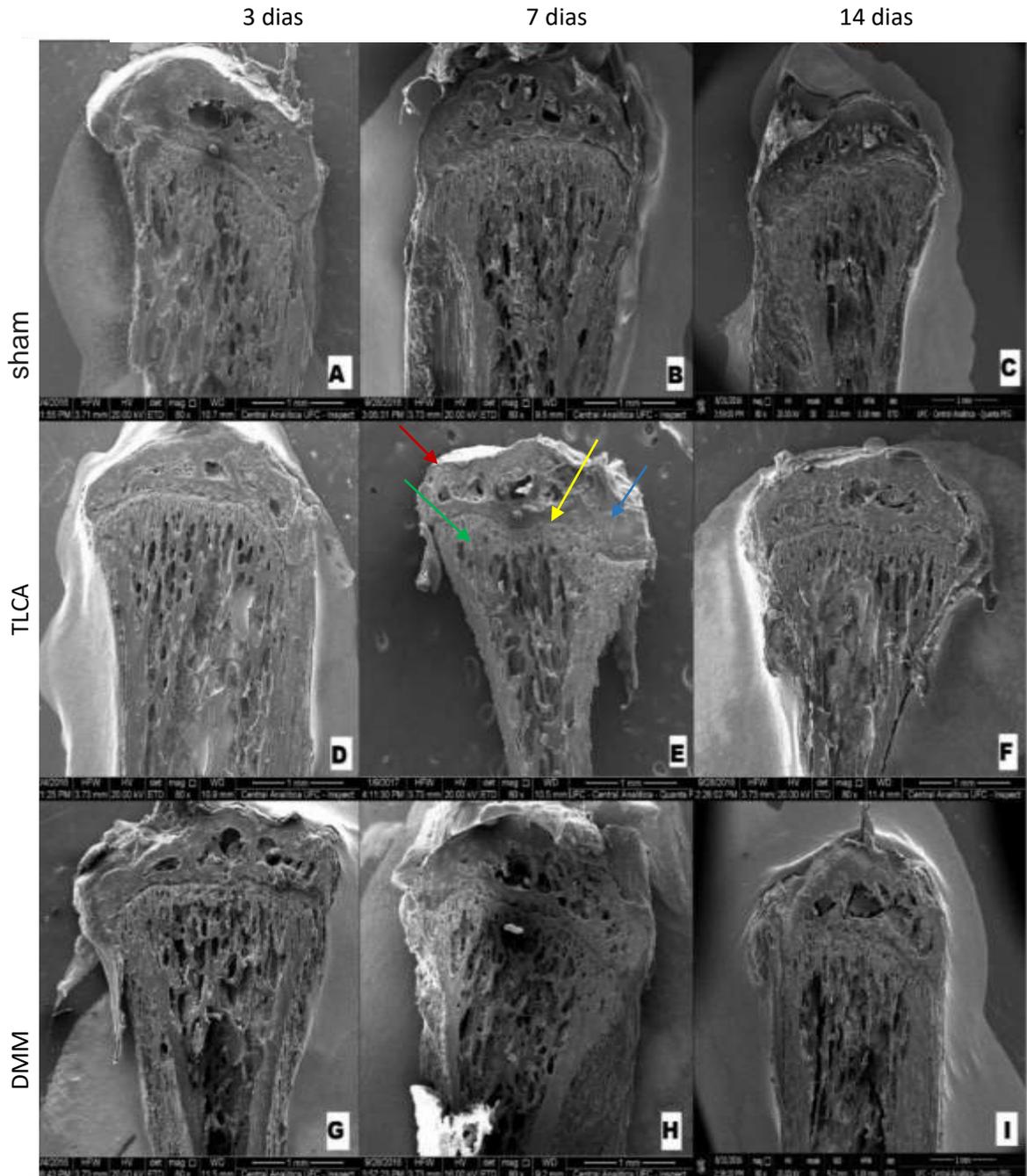


Figura 15- Imagens obtidas por MEV do fêmur de camundongos. (A) Fêmur do grupo sham 3 dias, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) Fêmur do grupo TLCA 3 dias, (E) 7 dias, (F) 14 dias, (G) Fêmur do grupo DMM 3 dias, (H) 7 dias, (I) 14 dias. Seta vermelha - presença de fissura, setas amarelas- perda da continuidade articular, seta azul- presença de irregularidade na superfície articular. (Aumento de 350x).

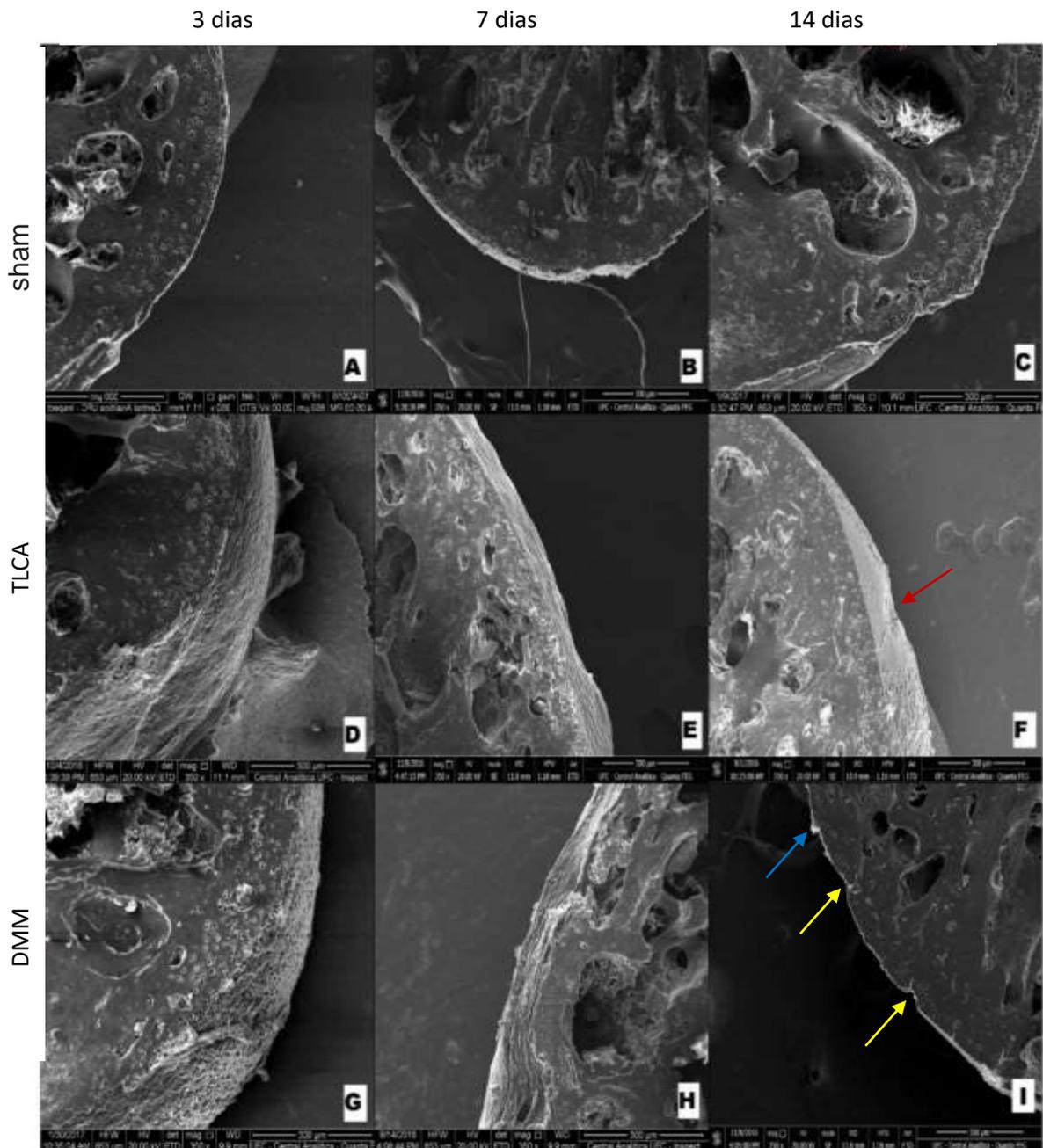


Figura 16- Imagens obtidas por MEV da tíbia de camundongos. (A) Tíbia do grupo sham 3 dias, (B) 7 dias, (C) 14 dias, (D) Tíbia do grupo TLCA 3 dias, (E) 7 dias, (F) 14 dias, (G) Tíbia do grupo DMM 3 dias, (H) 7 dias, (I) 14 dias. Seta vermelha indica destacamento da superfície articular, seta amarela- presença de irregularidade na superfície articular. (Aumento de 350x).

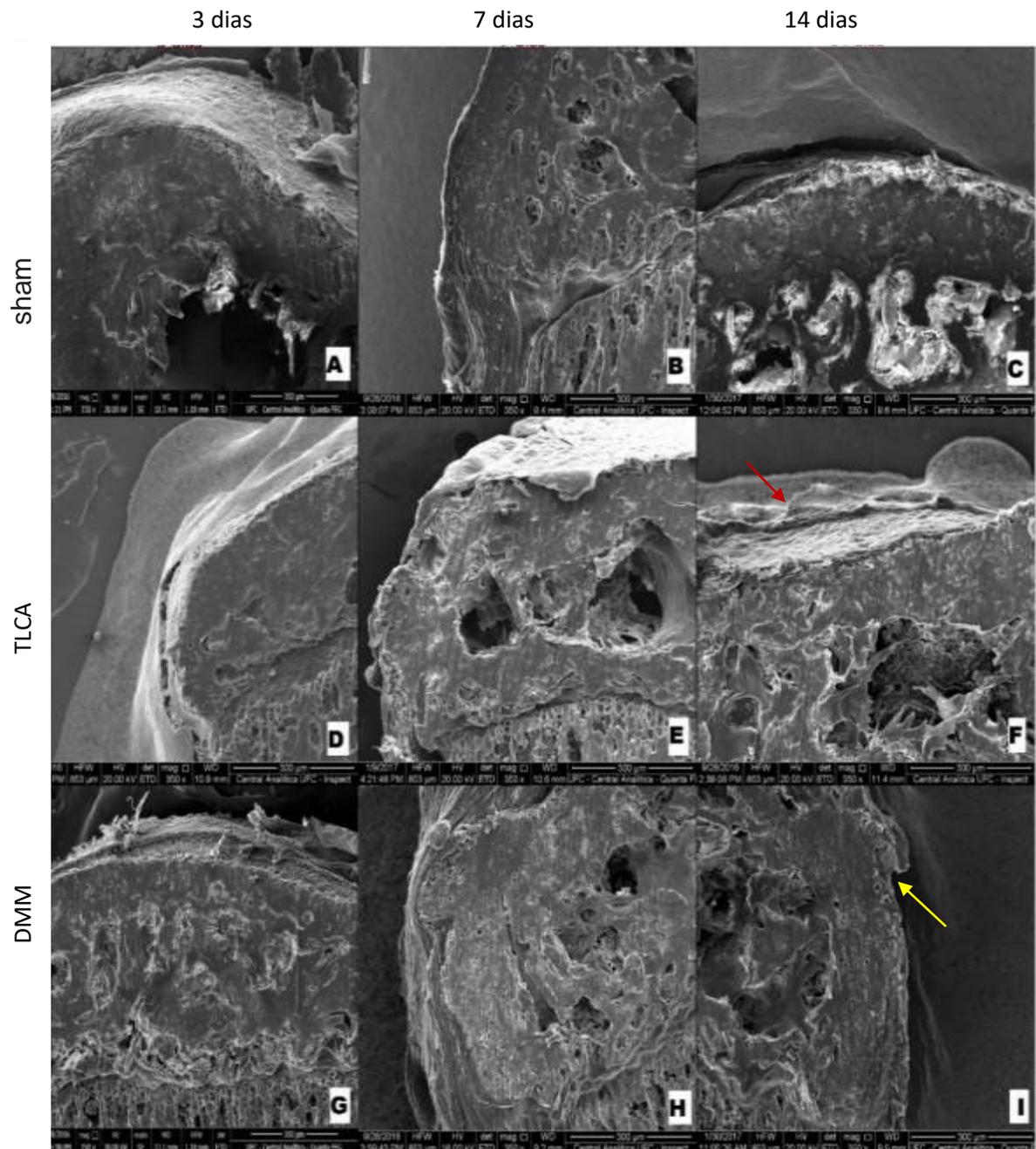
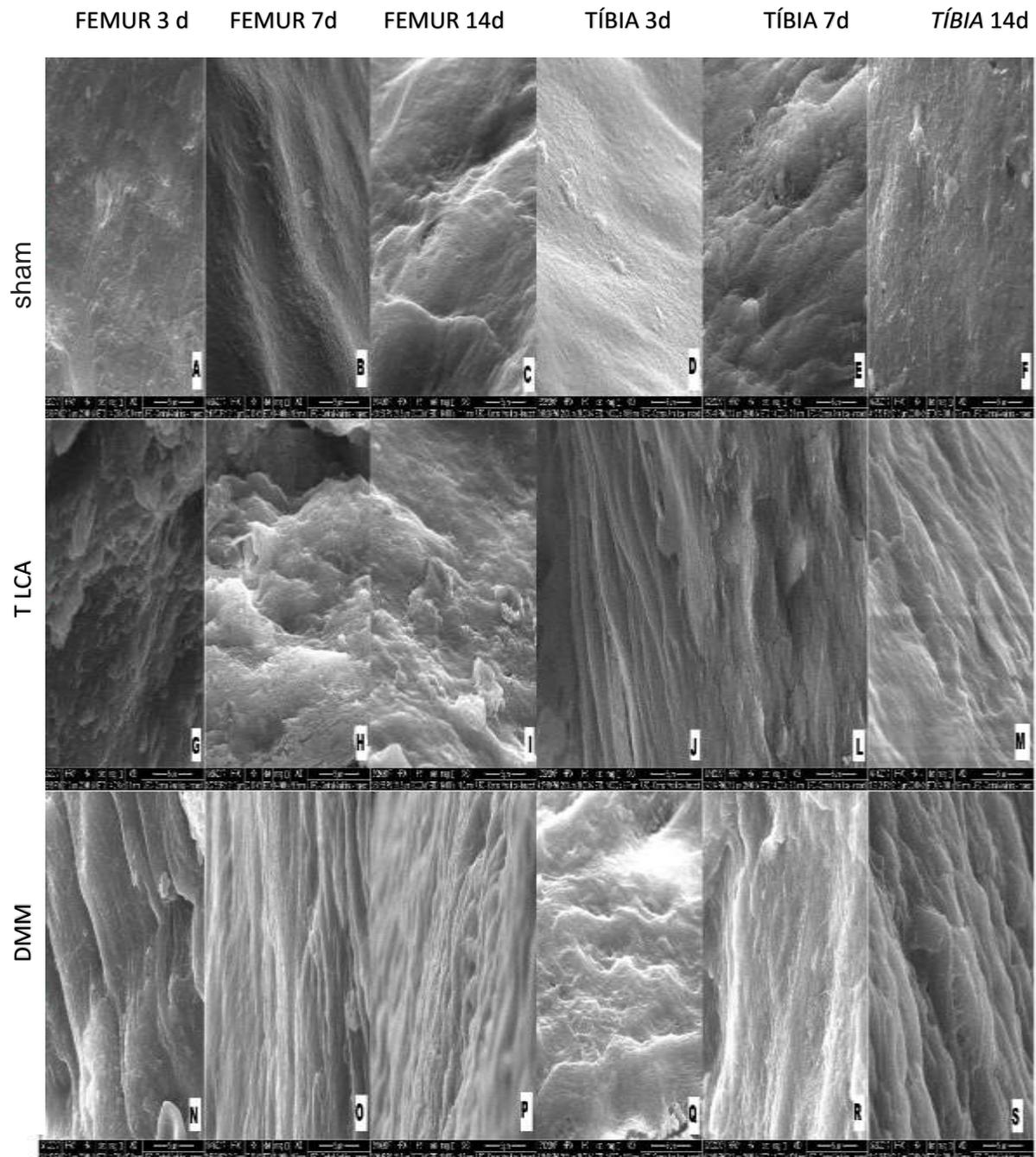


Figura 17- Imagens obtidas por MEV da superfície articular do fêmur e da tíbia de camundongos de 3 a 14 dias pós-cirurgia. Superfície com textura relativa lisa no grupo sham de fêmur e tíbia (A-F). Nos grupos TLCA (G-M) e DMM (N-S) houve uma mudança gradativa na textura e rugosidade da superfície. (Aumento de 14.000x).

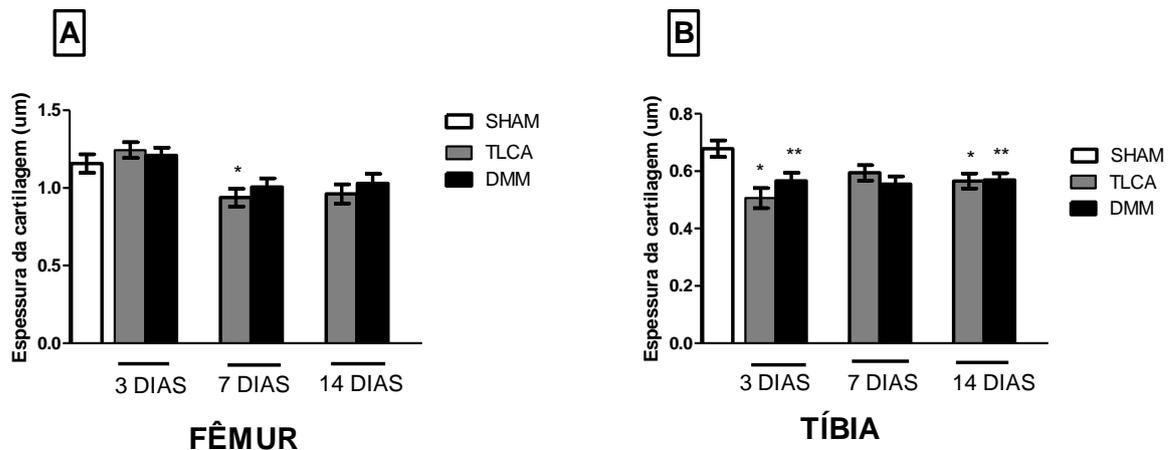


5.3.1 Espessura da cartilagem

Os resultados das medidas da espessura da cartilagem articular de cada um dos grupos experimentais, em seus respectivos tempos, são apresentados no gráfico 1.

Foi encontrada diferença significativa no grupo TLCA 7 dias no fêmur quando comparado ao grupo sham. Já na tíbia foram significativas as variações de medida de espessura da cartilagem nos grupos TLCA e DMM com 3 e 14 dias quando comparados ao grupo sham.

Gráfico 1- Espessura da cartilagem articular nos diferentes grupos de OA. A espessura da cartilagem articular no fêmur (A) e na tíbia (B) foi avaliada nos modelos de TLCA e DMM em diferentes tempos. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M da medida de espessura da cartilagem. *, ** $P < 0,05$ comparado ao grupo sham (ANOVA seguida de teste de Bonferroni).

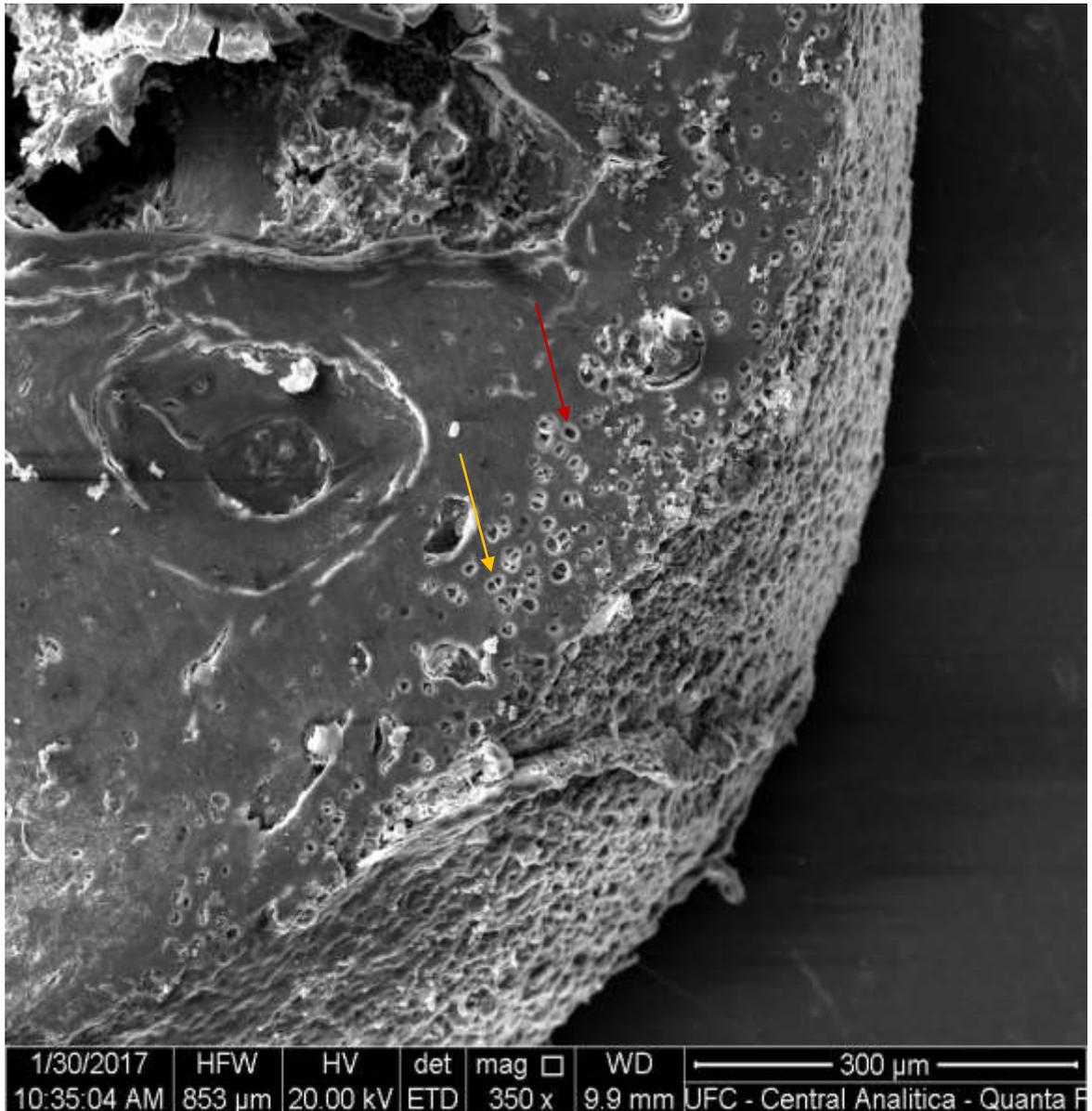


5.3.2 Camadas de condrócitos

A Figura 18 ilustra as camadas de condrócitos observadas no aumento de 350x por MEV.

Os resultados da contagem do número de camadas de condrócitos da cartilagem articular de cada um dos grupos de animais são apresentados no gráfico 2.

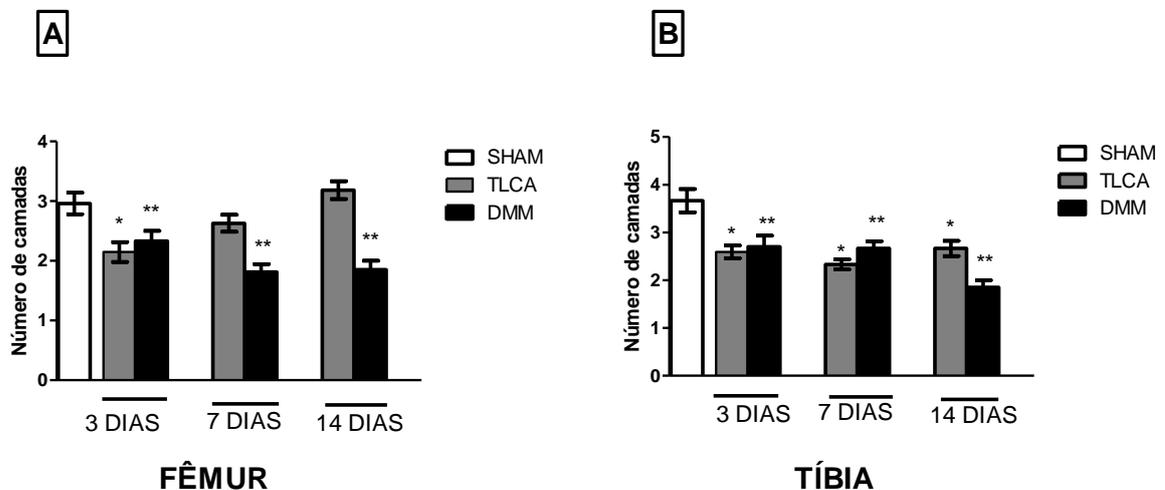
Figura 18- Imagem por MEV das camadas de condrócitos no fêmur. A seta vermelha indica lacuna de condrócito e a seta amarela, grupo isógeno. HFW- largura da imagem, HV-tensão de aceleração, det- ETD (dissociação de transferência de elétron), mag- magnificância, WD- distância de trabalho. (Aumento de 350x).



No fêmur, houve decréscimo significativo no número de camadas de condrócitos nos grupos TLCA 3 dias e no grupo DMM 3, 7 e 14 dias comparativamente ao grupo sham.

Na tíbia, houve diminuição do número de camadas de condrócitos em todos os grupos submetidos a indução cirúrgica de OA, independentemente do modelo, em todos os intervalos de tempo quando comparados ao grupo sham.

Gráfico 2- Número de camadas de condrócitos nos diferentes grupos. No fêmur (A) e na tíbia (B) foi comparado o número de camadas de condrócitos em ambos modelos de OA nos diferentes tempos. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M do número de camadas de condrócitos. *, ** $P < 0,05$ comparado ao grupo sham (ANOVA seguida de teste de Bonferroni).



5.3.3 Surface plot 3D

Nas figuras 19, 20 e 21 observam-se as características de perfis de superfície nos diferentes grupos de OA, nos tempos de 3, 7 e 14 dias, respectivamente, tanto em escala de cinza quanto em tonalidades variadas.

Vale destacar que as características da microtopografia de superfície da cartilagem articular resultam da variação de cor nas imagens, sugerindo maior ou menor homogeneidade e lisura da superfície, pela visualização de reentrâncias e grau de relevo da amostra. Isso equivale a informação de que quanto maior a variação de cor numa imagem, mais irregular está a superfície.

Tais resultados da inspeção visual inferiram que a superfície da cartilagem se tornou mais áspera quando o grau de OA aumentou seja no modelo TLCA seja na DMM. Isso aconteceu de forma diretamente proporcional ao tempo, ou seja, a progressão da OA levou a observação de plotagens mais coloridas (tonalidades amarela, laranja e roxa) no tempo de 14 dias.

Figura 19- Plotagem bidimensional da superfície articular (0,1x0,1mm) e surface plot em 3D (3 dias). Obtidos por meio do plugin *Surface Plot 3D* do *ImageJ*, em que podem ser observadas as características da rugosidade superficial da amostra no grupo sham 3 dias fêmur e tibia (A e B), grupo TLCA 3 dias (C e D) e grupo DMM 3 dias (E e F).

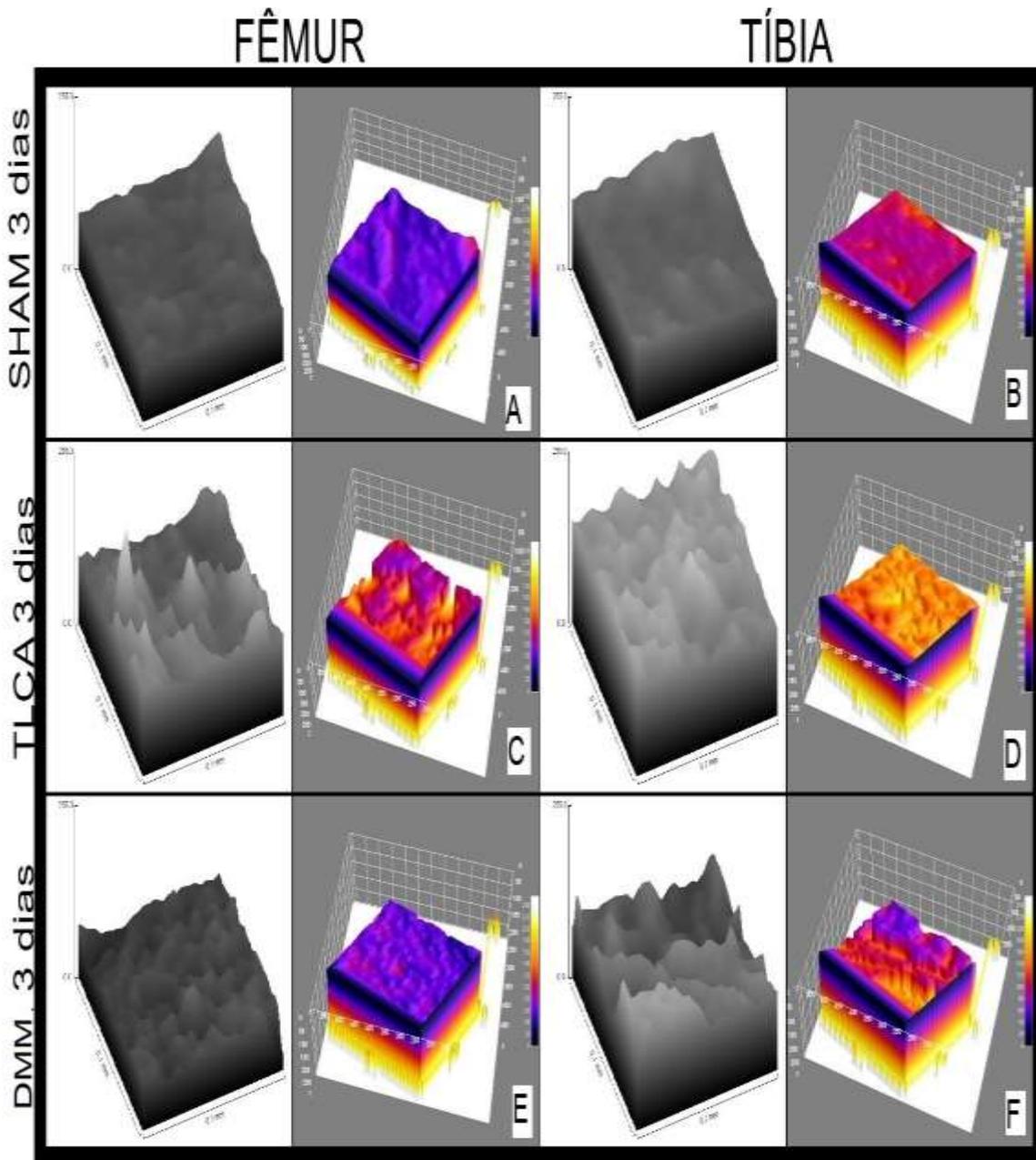


Figura 20- Plotagem bidimensional da superfície articular (0,1x0,1mm) e surface plot em 3D (7 dias). Obtidos por meio do plugin *Surface Plot 3D* do *ImageJ*, em que podem ser observadas as características da rugosidade superficial da amostra no grupo sham 7 dias fêmur e tibia (A e B), grupo TLCA 7 dias (C e D) e grupo DMM 7 dias (E e F).

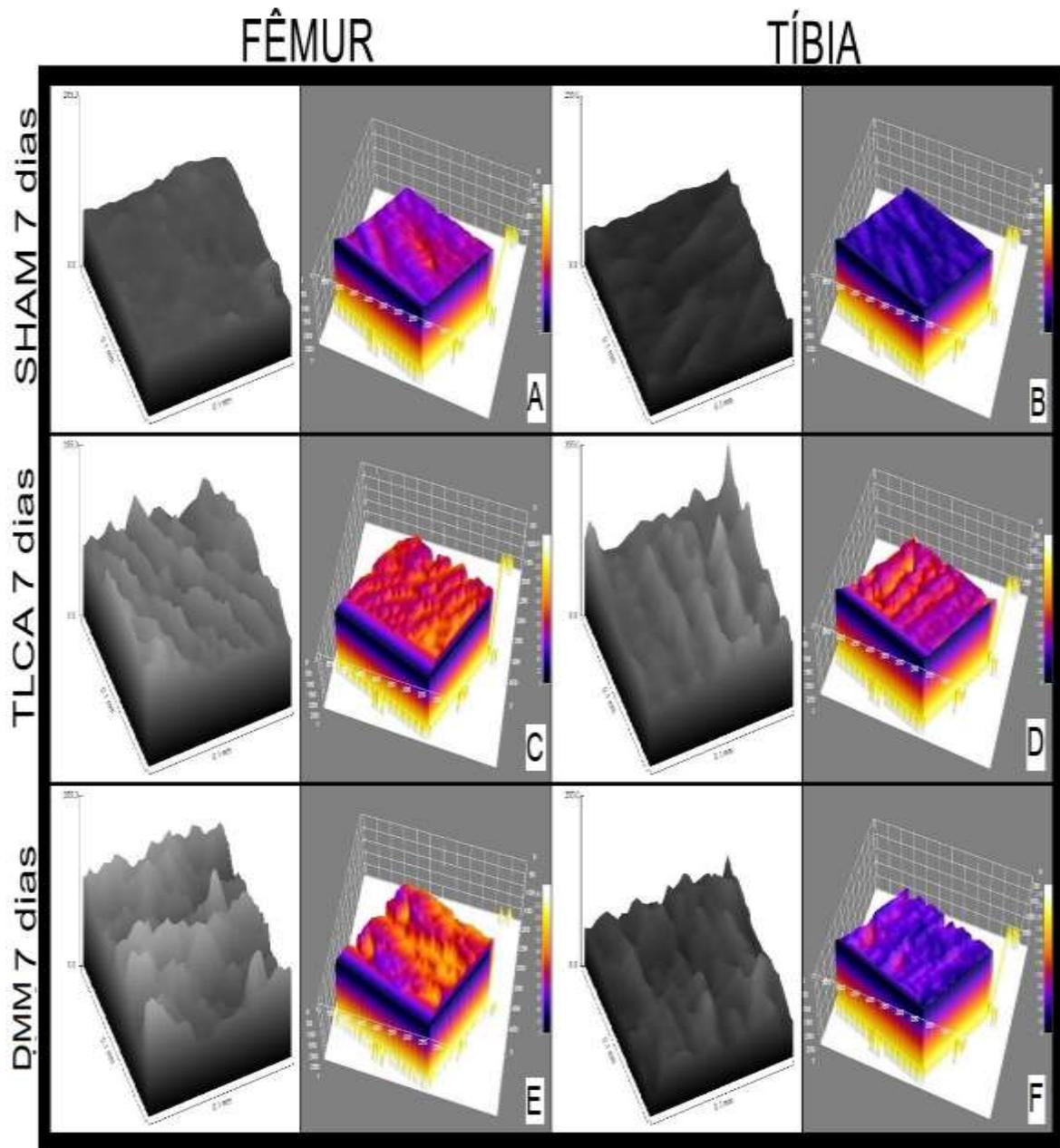
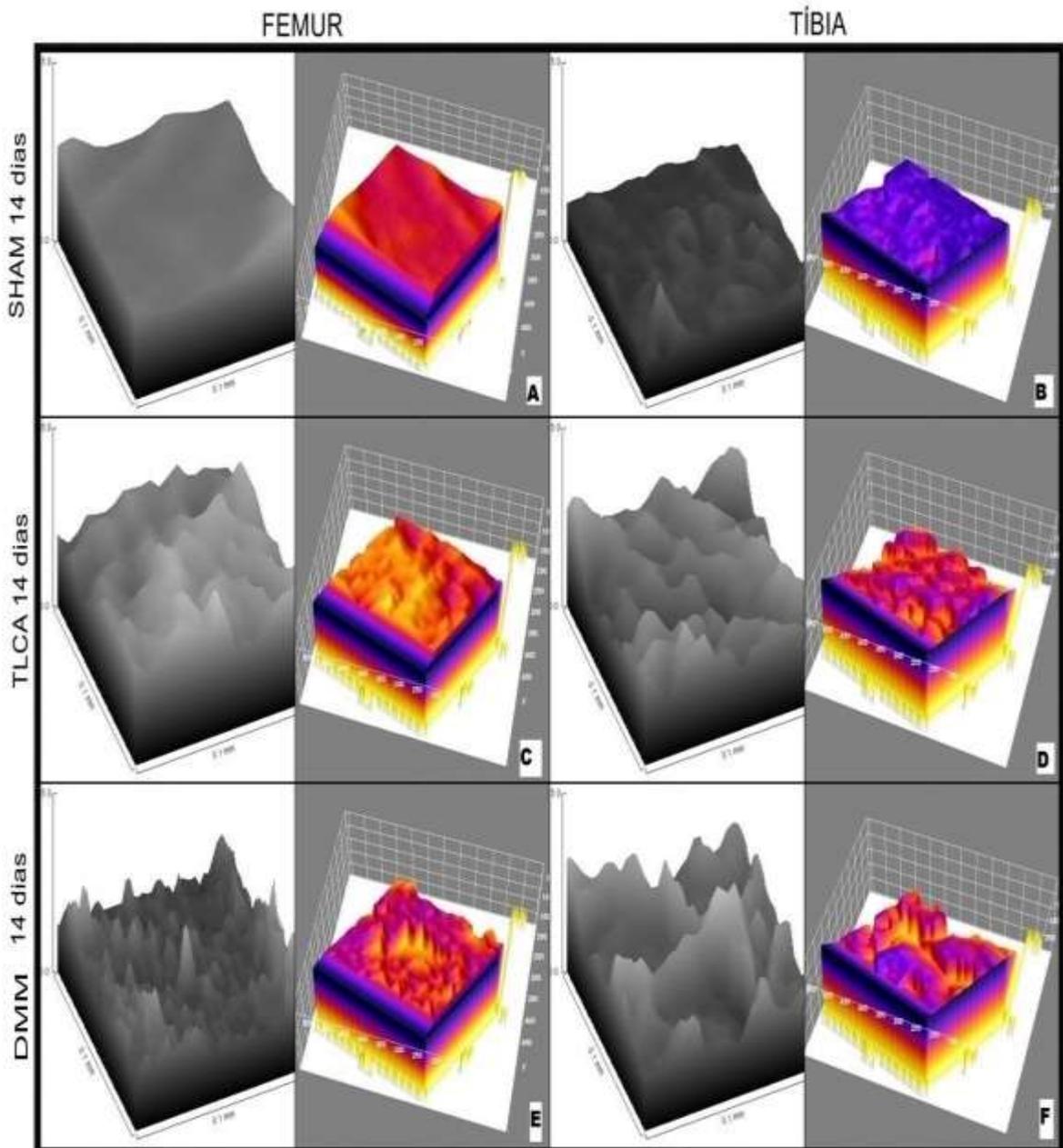


Figura 21- Plotagem bidimensional da superfície articular (0,1x0,1mm) e surface plot em 3D (14 dias). Obtidos por meio do plugin *Surface Plot 3D* do *ImageJ*, em que podem ser observadas as características da rugosidade superficial da amostra no grupo sham 14 dias fêmur e tibia (A e B), grupo TLCA 14 dias (C e D) e grupo DMM 14 dias (E e F).



5.3.4 Coeficiente de rugosidade

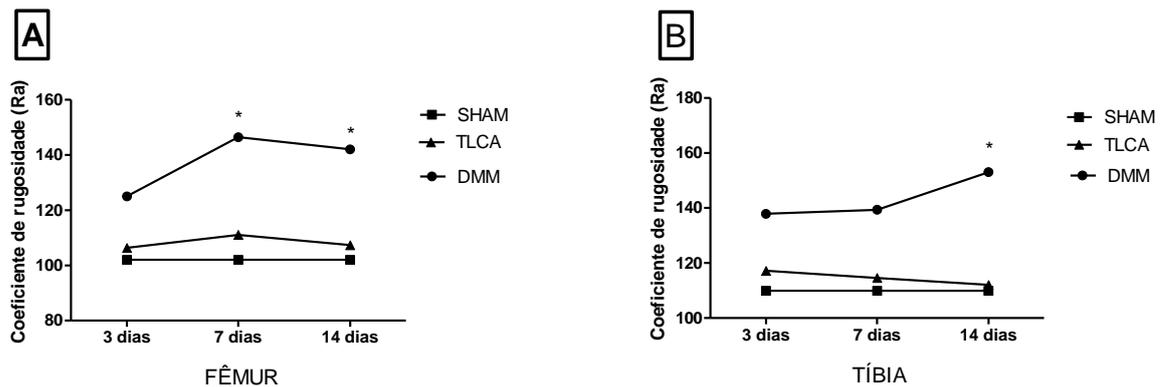
Os gráficos 3A e B revelam, respectivamente, o coeficiente de rugosidade do fêmur e da tíbia de camundongos ao longo dos 14 dias de experimento.

No fêmur, houve aumento significativo no coeficiente de rugosidade entre 7 e 14 dias no grupo DMM, comparativamente ao grupo sham. Ao passo que, na tíbia, o aumento do coeficiente de rugosidade foi significativo no grupo DMM aos 14 dias. O grupo TLCA não apresentou diferença estatística em relação ao grupo sham.

Gráfico 3- Cinética do coeficiente de rugosidade nos diferentes grupos de OA.

(A) Coeficiente de rugosidade do fêmur, (B) Coeficiente de rugosidade da tíbia. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M do coeficiente Ra de rugosidade.

* $P < 0,05$ comparado ao grupo sham (ANOVA seguida de teste de Bonferroni).



5.3.5 Classificação de degradação articular

Os gráficos 4A e B mostram, respectivamente, a classificação do fêmur e da tíbia de camundongos de acordo com a classificação preconizada por Korkala *et al.* (1984).

Pode-se observar que houve um aumento no grau de desgaste da cartilagem no tempo de 14 dias nos grupos TLCA e DMM, tanto no fêmur quanto na tíbia, quando comparados ao grupo sham ($p < 0,05$).

As superfícies articulares do grupo sham, no fêmur e na tíbia, apresentaram predominantemente grau de desgaste mínimo, ou seja, grau 0. Ao passo que, com a progressão da OA nos grupos experimentais, em ambas extremidades ósseas, houve aumento gradual do grau de desgaste articular comparativamente ao grupo sham.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar as lesões ultraestruturais da cartilagem articular em dois modelos de OA: TLCA e DMM. Em ambos métodos, alterações perceptíveis da superfície articular por MEV coexistiram com um aparente padrão de normalidade da cartilagem em termos histológicos convencionais, considerando intervalos precoces de observação.

Considerando a osteoartrite uma doença progressiva desencadeada por múltiplos fatores, incluindo aspectos genéticos, metabólicos e traumáticos, são muitas suas repercussões. Podem ser citadas alterações morfológicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas tanto nas células quanto na matriz extracelular (SHARMA, KAPPOR, ISSA, 2006).

Para o estudo desta doença, tem sido bem descrito na literatura, o uso de modelos animais, com destaque para as induções cirúrgicas. Esses modelos desempenham um papel fundamental na compreensão dos eventos iniciais da OA. O dano articular, nesses casos, se desenvolve de forma rápida e previsível e são mais compatíveis com OA secundária (CASTRO, 2008).

Atualmente, alguns modelos murinos cirúrgicos de OA são estudados, incluindo a desestabilização do menisco medial ou meniscotomia (DMM), transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA), além da remoção (meniscectomia) do menisco medial com ou sem transecção de ligamentos. Modelos cirúrgicos geram instabilidade mecânica e isso leva ao desenvolvimento das lesões na cartilagem e na remodelação óssea (HAYAMI, PICKARSKI, ZHOU, 2006).

Vargas (2014) considera que a heterogeneidade da textura superficial articular ainda não é claramente compreendida e pode estar relacionada à alteração estrutural da cartilagem e/ou condição inicial da OA. A condição de irregularidade e rugosidade das texturas de superfície da cartilagem, entretanto, precisa ser estudada.

Assim, considerando a relevância de se compreender os aspectos fisiopatológicos dessa complexa artropatia, em especial sob o ponto de vista da identificação de lesões precoces, o presente trabalho procurou demonstrar as características ultraestruturais da cartilagem articular, em intervalos precoces na TLCA e DMM em camundongos.

O modelo de TLCA tem sido proposta como um modelo para estudo de alterações articulares semelhantes às ocorridas na OA humana (BRANDT *et al.*, 1991), que incluem fibrilação superficial, desorganização da rede de colágeno e proteoglicanos, espessamento da cápsula articular e osteofitose (SETTON, ELLIOTT, MOW, 1999).

Preconiza-se que a sinóvia normal apresenta uma camada externa (ou subíntima) com tecidos conjuntivos fibroso, adiposo ou areolar e poucas células e uma camada íntima formada de uma a quatro camadas de sinoviócitos. O padrão histopatológico de sinóvia na OA é caracterizada por hiperplasia do revestimento sinovial, fibrose e vascularização do estroma (SMITH, 2011).

É sabido que sinovite pode ocorrer mesmo nos estágios iniciais da OA de forma subclínica. A inflamação sinovial na OA geralmente é encontrada próxima a áreas com osso e cartilagem patologicamente danificados. Esta sinóvia hiperreativa pode liberar proteinases e citocinas capazes de acelerar a destruição articular (KRASNOKUTSKY *et al.*, 2008).

Esse estudo demonstrou que a sinóvia do grupo sham apresentou-se histologicamente normal com sinoviócitos dispostos em camadas apoiadas sobre tecido conjuntivo, ricamente vascularizado associado a células adiposas, sendo este o padrão de normalidade. Os grupos TLCA e DMM apresentaram discreta hiperplasia de sinoviócitos, além de infiltrado inflamatório e áreas multifocais de desorganização de fibras colágenas.

As primeiras alterações histológicas da OA são o desgaste e fibrilação da zona superficial da cartilagem articular, a redução da afinidade tintorial dos proteoglicanos, invasão da tidemark por vasos sanguíneos e nervos, além da remodelação óssea subcondral (POLLARD, GWILYM, CARR, 2008; BONDE, TALMAN, KOFOED, 2005).

Em estudos anteriores de nosso grupo, 7 semanas após a indução da OA por DMM houve um aumento significativo dos escores totais de desgaste da cartilagem femoral, comparado ao grupo sham. Na avaliação das tíbias, animais meniscotomizados mostraram aumento significativo nos escores totais quando comparado ao grupo sham. Nos animais submetidos à meniscotomia, houve uma perda extensa e profunda de ambas as cartilagens (TEOTONIO, 2013). Os achados

desse estudo corroboram com a literatura, visto que as alterações histológicas não foram observadas em intervalos precoces de indução de OA.

Sabe-se ainda que a integridade do ligamento cruzado anterior é essencial à estabilidade articular do joelho, por reduzir a intensidade de translação anterior e rotação tibiais (LI, SUGGS, GILL, 2002). Ademais, a lesão do menisco por injúria, degeneração e retirada dos meniscos promove igualmente a desestabilização articular associada à dor. Tal lesão frequentemente está associada ao desenvolvimento e progressão da OA em seres humanos (POEHLING *et al.*, 1990; BHATTACHARYYA *et al.*, 2003).

Alguns autores fizeram tentativas de explorações preliminares. O'Connor *et al.* (1976) descreveram alterações convencionais sugestivas de degeneração precoce no côndilo femoral após o corte do ligamento cruzado anterior de cão, usando técnicas convencionais de microscopia eletrônica de varredura.

Jurvelin *et al.* (1983) usaram uma patela de coelho da Nova Zelândia para descrever um padrão morfológico de avaliação da superfície articular, por microscopia eletrônica de varredura ambiental. Hong e Henderson *et al.* (1996) melhoraram esses critérios ao estudarem mudanças na superfície da cartilagem patelar, após a frenagem da articulação do joelho, em ratos.

Entretanto, apesar dos diferentes estudos realizados, a metodologia empregada tem tornado a análise por microscopia eletrônica de varredura um método subjetivo e basicamente descritivo. Korkala *et al.* (1984) propuseram uma classificação para a análise de imagens em MEV da cartilagem articular, considerando o grau de desgaste articular, variando entre Grau 0 (indicando cartilagem normal) a Grau IV (máxima degradação). Tal escala foi utilizada no presente trabalho com o intuito de agrupar e categorizar as imagens das articulações de acordo com características semelhantes.

Pode-se inferir que o fator tempo foi determinante nos grupos TLCA e DMM ao aumentar o grau de desgaste articular das amostras. De fato, no fêmur e na tibia, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) aos 14 dias em relação ao grupo sham.

Na tentativa de fornecer dados quantitativos na análise de imagens de MEV deste trabalho, foram utilizadas as variáveis espessura da cartilagem e número de camadas de condrócitos, além do coeficiente de rugosidade (Ra) e análise de imagens em 3D.

A espessura da cartilagem articular foi investigada nesse estudo, considerando a distância perpendicular entre a superfície da cartilagem articular e a superfície do osso subcondral. Os ossos fêmur e tíbia foram analisados separadamente, considerando suas diferenças morfológicas. A cartilagem do fêmur apresentou diminuição de sua espessura apenas no tempo de 7 dias no grupo TLCA. Ao passo que a tíbia teve redução de sua espessura, de forma significativa, nos tempos 3 e 14 dias, nos grupos TLCA e DMM quando comparados ao grupo sham. Isso permite confirmar estudos anteriores que demonstram que o platô tibial sofre mais desgaste articular e, conseqüentemente, maior variação de espessura, que os côndilos femurais (GLASSON *et al.*,2007).

O número de camadas de condrócitos também foi observado como parâmetro nesse estudo. No grupo DMM, tanto no fêmur como na tíbia, houve diminuição significativa do número de camadas de condrócitos quando comparado ao grupo sham nos tempos 3 e 14 dias. Segundo Stoop *et al.* (2001), é compreensível que a sobrecarga transmitida às regiões mais profundas da cartilagem torne-se maior com a expansão da extensão e da profundidade nas áreas fibriladas, comprometendo a homeostase dos condrócitos residentes em regiões profundas.

Ainda de acordo Stoop *et al.* (2000, 2001), a TLCA produz edema de matriz e perda de condrócitos, em associação a fibrilação da cartilagem, já aos sete dias de indução. Os dados encontrados nesse estudo revelam, que no grupo TLCA, houve diminuição no número de camadas de condrócitos no fêmur com 3 dias e na tíbia com 3 e 7 dias.

Em relação à observação das imagens de MEV, houve uma mudança na aparência da superfície articular observado no aumento de 14.000x entre os grupos sham e os demais grupos. As imagens do grupo sham se mostraram com aspecto mais liso e homogêneo, quando comparados aos grupos submetidos à TLCA ou DMM, com textura irregular e aparência rugosa de caráter progressivo com o decorrer dos dias do experimento.

Acredita-se que essa mudança de aspecto esteja diretamente relacionada ao precoce processo de desestabilização do joelho nos grupos operados. Estudos revelam que a perda da integridade e da organização colágena na camada superficial articular parece ser ainda mais relevante do que o comprometimento dos

proteoglicanos no aparecimento das alterações no estágio inicial da OA (DESROCHERS, AMREIN, MATYAS, 2012).

A análise de textura é uma área de pesquisa importante com aplicações em bibliotecas digitais, bancos de dados multimídia, imagens médicas, robótica, sensoriamento remoto, controle de qualidade, dentre outras (YANG, LIU, 2002; BASHAR, TSUMOTO, OHNISHI, 2003). A textura da superfície é definida como um conjunto de todas as irregularidades da superfície real, isto é, contempla variáveis como forma, ondulação e rugosidade. Dentre uma das inúmeras formas de se determinar quantitativa e qualitativamente a rugosidade de uma superfície em estudo, destaca-se o método da microscopia que, há a algum tempo, vem dando uma grande contribuição na medição desta grandeza (KOTANI *et al.*, 1975).

A rugosidade é um conjunto de informações, conhecidas como irregularidades, presentes na superfície real de um objeto. A classificação da rugosidade de superfície, a partir da avaliação de sua textura, utiliza imagens de topo das superfícies obtidas em microscópios (como o MEV), em diferentes ampliações (ALVES, 2011). No presente estudo, houve aumento do coeficiente de rugosidade (R_a) no fêmur nos modelos DMM e TLCA, com 7 e 14 dias. Na tíbia, essa mudança aconteceu mais precocemente com 3 e 7 dias pós indução da OA. Os achados corroboram com outro estudo anterior que detectou aumento da rugosidade na superfície, de forma proporcional ao grau de degradação da cartilagem e ao desgaste superficial articular (KOTANI *et al.*, 1975). Adler (1992) e Saarakkala (2006) comprovaram também que o aumento da rugosidade, ou seja, a microfibrilação da superfície articular, é característica da OA precoce.

A morfologia superficial de uma cartilagem degradada é o resultado da resposta biomecânica, que está ligada à estrutura da cartilagem (VARGAS, 2014).

Um aumento na rugosidade da superfície pode afetar também a lubrificação sinovial, uma vez que essas rugas têm influência nas propriedades hidrodinâmicas da película fluida. Ao aumentar a rugosidade, a área de contato é reduzida e a pressão de contato local em torno da área do pico é aumentada consideravelmente, resultando em uma redução significativa na capacidade de lubrificação pelo líquido sinovial (KUMAR *et al.*, 2001). O presente trabalho não utilizou coleta de exsudato articular, nem da membrana sinovial por se tratar de uma pesquisa com enfoque nos achados

da microscopia óptica e eletrônica. Baseado na informação acima relatada, surge assim uma perspectiva para trabalhos futuros na caracterização de modelos de OA.

Por meio da ferramenta *surface plot 3D* (ImageJ), em intervalos precoces, 14 dias após indução de OA, observou-se uma mudança na homogeneidade do padrão da superfície, com presença de picos e vales nos grupos que foram operados quando comparados ao grupo sham. Vale dizer que essas alterações apresentam um caráter progressivo de irregularidade com o avançar dos tempos do experimento. Isso permite concluir que, nos modelos cirúrgicos de indução de OA por TLCA e DMM, existe uma correlação qualitativa entre as áreas de pico e o grau de fibrilação superficial.

A imagem 3D pode fornecer informações mais qualitativas sobre a intensidade de picos e de vales do que a imagem 2D, permitindo uma compreensão mais clara sobre a condição de morfologia da superfície da cartilagem degradada. A imagem tridimensional revela que uma superfície heterogênea compõe-se de picos e de vales, com variação de intensidade de cor entre eles, fornecendo uma importante contribuição para a compreensão da topografia superficial da cartilagem degradada. Assim, ela se torna base para a avaliação quantitativa da caracterização da superfície (VARGAS, 2014).

Pode-se afirmar que sua conformação por picos e vales, bem como a intensidade dessas características específicas, aumenta com o estágio de OA. Entretanto, não está claro qual dessas duas características é mais predominante na evolução da OA. A superfície de cartilagem com OA avançada parece ter um aspecto de superfície não periódico (VARGAS, 2014).

Esse estudo forneceu informações úteis sobre a condição superficial da cartilagem degradada em intervalos de tempo precoces, permitindo uma melhor compreensão sobre a evolução da morfologia da superfície da cartilagem articular, em modelos de indução de OA.

7 CONCLUSÃO

Com base nos achados deste estudo, as seguintes considerações foram obtidas:

- Ambos modelos apresentaram quadro de sinovite importante durante o experimento.
- As cartilagens articulares, nos modelos TLCA e DMM, não apresentaram indícios de OA nas duas primeiras semanas após a indução da doença.
- Imagens obtidas por MEV nesses modelos apresentaram perda da continuidade articular e presença de fissuras, bem como destacamento da superfície articular 2 semanas após a indução de OA.
- Em ambos os modelos, a espessura da cartilagem da tíbia apresentou redução 2 semanas após a indução de OA.
- No modelo de DMM, houve decréscimo no número de camadas de condrócitos no fêmur e na tíbia 14 dias após a indução de OA.
- Os coeficientes de rugosidade do fêmur e da tíbia aumentaram no grupo DMM com 14 dias e a microtopografia da superfície tornou-se mais heterogênea em ambos modelos de OA.
- A cartilagem apresentou aumento no grau de degradação articular com 14 dias após indução de OA, em ambos modelos estudados, por MEV.

Portanto, modelos de TLCA e DMM, apesar de não cursarem com sinais de degradação da cartilagem articular em termos de MO, apresentam lesões ultraestruturais detectáveis por MEV nos tempos de 7 e 14 dias pós-indução da OA.

REFERÊNCIAS

- ADLER, R. S. *et al.* Quantitative assessment of cartilage surface roughness in osteoarthritis using high frequency ultrasound. **Ultrasound Med Biol.** v. 18, p. 51-58, 1992.
- ALBERTS, B. *et al.* The extracellular matrix of animals. **Molecular biology of the cell.** 3.ed. New York & London: Garland, p. 971-984, 1994.
- ALVES, M. L. 2011. 197 f. **Reconhecimento da rugosidade em imagens monocromáticas por meio de análise de textura.** Tese (Doutorado em Engenharia mecânica) – Universidade Federal Fluminense, Niterói- RJ, 2011.
- American College of Rheumatology. **Osteoarthritis.** Lake Boulevard NE, Atlanta. 2012.
- ANDERSON, C. E. The structure and function of cartilage. **J Bone Joint Surg Am** v. 44, p. 777-786, 1964.
- BANK, R.A *et al.* The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. **Arthritis Rheum.** v. 43, p. 2202–2210, 2000.
- BASHAR, M. K.; TSUMOTO, T. M. Y.; OHNISHI, N. Wavelet Transform-Based Locally Orderless Images For Texture Segmentation, **Pattern Recognition Letters**, v. 24, p. 2633-2650, 2003.
- BHATTACHARYYA, T. *et al.* The clinical importance of meniscal tears demonstrated by magnetic resonance imaging in osteoarthritis of the knee. **J Bone Joint Surg Am.** v. 85-A, p. 4-9, 2003.
- BENDELE, A. M. Animal models of osteoarthritis. **J. Musculoskelet. Neuron. Interact.** v. 1, p. 363-376, 2001.
- BERENBAUM, F. Diabetes-induced osteoarthritis: from a new paradigm to a new phenotype. **Postgrad Med J.** v. 88, n. 1038, p. 240 -242, 2012.
- BHUSHAN, B.; POON, C.Y. Comparison of surface roughness measurements by stylus profiler, AFM and non-contact optical profiler. **Wear.** v. 190, n. 1, p. 76-88, nov.1995.
- BIJLSMA, J. W.; BERENBAUM, F.; LAFEBER, F. P. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. **Lancet.** v. 377, p.2115-26, 2011.
- BIJLSMA, J.W.; KNAHR, K.. Strategies for the prevention and management of osteoarthritis of the hip and knee. **Best Pract Res Clin Rheumatol.** v. 21, n.1, p. 59-76, fev.2007.

BONDE, H.V.; TALMAN, M.L.M.; KOFOE, H. The area of the tidemark in osteoarthritis – a three-dimensional stereological study in 21 patients. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**. v. 113, e.5, mai. 2005.

BOVE, S.E. *et al.* Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia **Osteoarthritis Cartilage**. v. 14, n. 10, p. 1041–1048, 2006.

BRANDT, K. D. *et al.* Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. **J Rheumatol**. v.18, n. 3, p. 436-46, mar.1991.

BRANDT, K. D.; PAUL, D.; ERIC, R. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. **Med. Clin. North Am**. v. 93, p. 1-24, 2009.

BRANDT, K.D.; MANKIN, H.J. Pathogenesis of osteoarthritis. In: KELLEY, W.N.; HARRIS, E.D.; RUDDY, S.; SLEDGE, C.B. 4. ed. **Textbook of rheumatology**. Philadelphia, Saunders, p.1355-1365, 1993.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. [Internet]. **Diário Oficial da União**. 2008 [acesso 20 maio 2016]. Seção 1. Disponível: <http://bit.ly/1WV52wP>

BRONNER, F.; FARACH-CARSON, M.C. **Bone and Osteoarthritis**; Springer-Verlag: London, UK, v.4, 2007.

BUCKWALTER, J.A.; MANKIN, H. J. Articular cartilage II. Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration and transplantation. **J Bone Joint Surg Am** v. 79, p. 612-632, 1997.

BUENO, J. M., ÁVILA, F. J.; ARTAL, P. Second Harmonic Generation Microscopy: A Tool for Quantitative Analysis of Tissues. **Microscopy and Analysis**, Dr. Stefan G. Stanciu (Ed.), InTech, set. 2016.

BURR, D.B. The importance of subchondral bone in osteoarthrosis. **Curr Opin Rheumatol**. v. 10, p. 256-262, 1998.

BURRAND, D. B.; GALLANT, M. A. Bone remodelling in osteoarthritis. **Nature Review Rheumatology**. v.8, n. 11, p. 665–673, 2012.

BUSH, P.G.; HALL, A.C. The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. **Osteoarthritis Cartilage**. v.11, p.242–251, 2003.

CADOLIN, T.; VIDEMAN, T. Surface changes in the articular cartilage of rabbit knee during immobilization. A SEM study of experimental osteoarthritis. **Acta path. microbiol. scand**. v.80, p. 291-297, 1980.

CAMARGO FILHO, J. C. S. 2006. 99f. **Caracterização da cartilagem articular do joelho de ratos submetidos a esforços de repetição em esteira rolante**. Tese (Doutorado em Ciências Médicas)- Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP, 2006.

CARR, A.J. The genetic basis of severe osteoarthritis. **Ann R Coll Surg Engl**. v.85, p. 263–268, 2003.

CASTRO, R. R. 2002. 142 f. **Hiperalgisia articular no modelo de osteoartrite em ratos – Efeitos de inibidores da síntese de óxido nítrico e de polissacarídeos de elevado peso molecular**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002

CASTRO, R. R. 2008. 114 f. **Efeitos da galactomanana de *Cyamopsis tetragonolobus* na osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior em ratos**. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza ,2008

CAMPAGNOLA, P. Second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics. **Anal Chem**. v. 83, p. 3224–3231, 2011.

CHANCIE, B. K. A.; CLIVE, G. A; STUART, B. Partial medial meniscectomy produces osteoarthritis pain-related behavior in female C57BL/6 mice. **Pain**. v.153, p.281–292, 2012.

CLARK, J. M. *et al*. The surface contour of articular cartilage in an intact, loaded joint. **J Anat** .v.95, p.45-56, 1999.

CLARKE, I.C. Articular cartilage. A review and scanning electron microscope study. I. The interterritorial fibrillar architecture. **J Bone Jt Surg** v.53, n.13, p.732–750, 1971.

CONCEA. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos** – DBCA. Portaria nº 465, de 23 de maio de 2013. Disponível em http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf

COOPER, C. “Osteoarthritis and related conditions.” In: DIEPPE, P.A., KLIPPEL, J.H. **Rheumatology**. 2ed. Londres: Mosby, 1998.

COTTA, H. Die Pathogenese der gonarthrose. **Z. Orthop**. v.111, p.490-494, 1973.

COTTA-PEREIRA, G; DEL-CARO, L.M.; MONTES, G.S. Distribution of elastic system fibers in hyaline and fibrous cartilages of the rat. **Acta Anat**. v.119, p.80–85, 1984.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras- materiais poliméricos, metálicos e semicondutores** [recurso eletrônico] . Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DESROCHERS, J.; AMREIN, M.W.; MATYAS, J.R. Viscoelasticity of the articular cartilage surface in early osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 20, n. 5, p.413-421, mai. 2012.

DIAS, F. C. 2008. 145 f. **Uso do software ImageJ para análise quantitativa de imagens de microestruturas de materiais**. Dissertação (Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores)- Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2008.

DIEPPE, P. Subchondral bone should be the main target for the treatment of pain and disease progression in osteoarthritis, **Osteoarthritis and Cartilage**. v. 7, p. 325–326, 1999.

ESPANHA, M.M. Articular cartilage: structure and histochemical composition. **Acta Reumatologica Portuguesa** .v.35, n.5, p.424-433, 2010.

EUBANKS, J.D. *et al.* Prevalence of Lumbar Facet Arthrosis and Its Relationship to Age, Sex, and Race: An Anatomic Study of Cadaveric Specimens. **Spine** v. 32, p. 2058-62, 2007.

EYRE, D. Articular cartilage and changes in arthritis: collagen of articular cartilage. **Arthritis Res**. v.4, p. 30–35, 2002.

FAWNS, H.T.; LANDELLS, J.W. Histochemical studies of rheumatic conditions. I. Observations on the fine structures of the matrix of normal bone and cartilage. **Ann Rheum Dis**. v.12, p. 105-113, 1953.

FUJIE, H.; IMADE, K. Effects of low tangential permeability in the superficial layer on the frictional property of articular cartilage. **Biosurface and Biotribology**. v.1, p.124-129, 2015.

GHADIALLY, F. N.; LALONDE, J.M.; WEDGE, J.H. Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. **J Anat**. v.136, n. 4, p.773–791, 1983.

GHADIALLY, F.N. Structure and function of articular cartilage. In: Hasselbacher, P. **Clinics in Rheumatic Diseases** v.7, London: W.B. Saunders Company Ltd, p. 3-28, 1981.

GIRKIN, J.M.; MCCONNELL, G. Advances in laser sources for confocal and multiphoton microscopy. **Microsc Res Tech**. v.67, p.8–14, 2005.

GLASSON, S.S.; BLANCHET, T.J.; MORRIS, E.A. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. **Osteoarthritis Cartilage**. v.15, n. 9, p. 1061-1069, 2007.

GLASSON, S.S. *et al.* The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 18, suppl. 3, p. 17-23, out.2010.

GHOSH, A. *et al.* Investigation of techniques for the measurement of articular cartilage surface roughness. **Micron**. v.44, p.179–184, 2013.

GRAZIO, S., BALEN, D. Obesity: Risk factor and predictors of osteoarthritis. **Lijec Vjesn**. v. 131, p. 22-26, 2009.

HAARA, M.M. *et al.* Osteoarthritis of finger joints in Finns aged 30 or over: prevalence, determinants, and association with mortality. **Ann Rheum Dis** v.62, p.151–58, 2003.

HASSELBACHER, P. "Joint Physiology." In: Dieppe PA, Klippel DH. **Rheumatology**. Londres: Mosby, 1998.

HAY, E.D. Matrix assembly. In: HAY, E.D. **Cell biology of extracellular matrix**. 2. Ed, New York, Plenum Press, p. 221-249, 1991.

HAYAMI, T. *et al.* The Role of subchondral Bone Remodeling in Osteoarthritis: Reduction of cartilage Degeneration and Prevention of Osteophyte Formation by Aledronate in the Rat Anterior Cruciate Ligament Transaction Model. **Arthritis Rheum**. v. 50, p.1193-1206, 2004.

HAYAMI, T.; PICKARSKI, M.; ZHUO, Y. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone**. v.15, p. 234–243, 2006.

HE, B. *et al.* High-resolution measurements of the multilayer ultra-structure of articular cartilage and their translational potential **Arthritis Research & Therapy**. v. 16, n. 205, p. 3-16, 2014.

HE, B. *et al.* Microstructural analysis of collagen and elastin fibres in the kangaroo articular cartilage reveals a structural divergence depending on its local mechanical environment. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 21, p. 237–245, 2013.

HONG, S. P.; HENDERSON, C. N. Articular cartilage surface changes following immobilization of the rat knee joint. A semiquantitative scanning electron-microscopic study. **Acta Anat (Basel)**. v. 157, p. 27-40, 1996.

HUGHES, C.; ARCHER, C. W. The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. **European Cells and Materials**, v. 9, p.68-84, 2005.

HYLLESTED, J.L.; VEJE, K.; OSTERGAARD, K. Histochemical studies of the extracellular matrix of human articular cartilage – a review. **Osteoarthritis and Cartilage** v.10, p.333-343, 2002.

INOUE, H.; KODAMA, T.; FUJITA, T. Scanning electron microscopy of normal and rheumatoid articular cartilages. **Arch Histol Jap**. v. 30, p. 425-435, 1969.

JURVELIN *et al.* Investigation of articular cartilage surface morphology with a semiquantitative scanning electron microscopic method **Acta Anat (Basel)**. v. 116, p. 302-311, 1983.

JURVELIN, J.S. *et al.* Surface and subsurface morphology of bovine humeral articular cartilage as assessed by atomic force and transmission electron microscopy. **J Structural Biol** v. 117, p.45-54, 1996.

KESRENBACHK, H.J.; BOTA FILHO W.J. **Microscopia eletrônica transmissão e varredura**. São Paulo: ABM, 1994.

KIDD, B.L.; PHOTIOU, A.; INGLIS, J.J. The role of inflammatory mediators on nociception and pain in arthritis. **Novartis Found Symp** v. 260, p.122–33; discussion 133–38, 277–79, 2004.

KNOLL, M. Aufladepotential und Sekundäremission elektronenbestrahlter Körper. **Z Tech. Phys.** v.16, p. 467-475, 1935.

KOHN, D.; MORENO, B. Meniscus insertion anatomy as a basic for meniscus replacement : a morphological cadaveric study. **Arthroscopy**. v.11, p.96-103, 1995.

KORKALA *et al.* Articular cartilage after meniscectomy: rabbit knees studied with scanning electron microscopy. **Acta Orthopaedica Scandinavica**. v.55, n.3, p.273-277, 1984.

KOTANI, P. T. *et al.* Study on the surface shape and contours of the femoral head and acetabulum of the human joint. **Bull Hosp Joint Dis**. v.36, n. 2, p. 81-108, out. 1975.

KRASNOKUTSKY *et al.* Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**. v.16, Suppl 3:S1-3, 2008.

KUMAR, P. *et al.* Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. **J Anat**. v.199, p.241–250, 2001.

KUYINU *et al.* Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. **J Orthop Surg Res**. v.2, p.11-19, fev.2016

LEITE, A.C.R.M. *et al.* Meniscal transection rather than excision increases pain behavior and structural damage in experimental osteoarthritis in mice. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.22, p. 1878-1885, 2014.

LI, G.; SUGGS, J.; GILL, T. The effect of anterior cruciate ligament injury on knee joint function under a simulated muscle load: a three-dimensional computational simulation. **Annals of Biomedical Engineering**. v.30, p. 713-720, 2002.

LINSENMAYER, T.F. Collagen. In: HAY, E.D. **Cell biology of extracellular matrix**. e. 2. New York: Plenum Press, p. 7-43, 1991.

LITTLE C.B, ZAKI S. What Constitutes an “animal model of osteoarthritis” – The Need for Consensus? **Osteoarthritis and cartilage**., v.20, p. 261-267, 2012.

- MANSFIELD, J. *et al.* The elastin network: its relationship with collagen and cells in articular cartilage as visualized by multiphoton microscopy. **J Anat**, v. 215, p. 682–691, 2009.
- MARTEL-PELLETIER, J. *et al.* Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. **Best Pract Res Clin Rheumatol**. v. 22, p. 351-384, 2008.
- MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J.P. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? **Eklem Hastalik Cerrahisi** v. 21, p. 2-14, 2010.
- MARTIN, E. M. D. The Role of the Meniscus in Osteoarthritis Genesis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v.34, p.573-579, 2008.
- MASTBERGEN, S. C.; LAFEBER, F. P. J. G. Changes in subchondral bone early in the development of osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatology**. V.63, n.9, set. 2011.
- MATZAT, S. J. *et al.* Quantitative MRI techniques of cartilage composition. **Quant Imaging Med Surg**. v.3, n.3, p.162-174, 2013.
- MAZZUCA, A.S. *et al.* Development of radiographic changes of osteoarthritis in the Chingford knee reflects progression of disease or non-standardised positioning of the joint rather than incident disease. **Ann Rheum Dis** v.62, p.1061-1065, 2003.
- MCALINDON, T. *et al.* OARSI Clinical Trials Recommendations: Design, conduct, and reporting of clinical trials for knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**. v. 23, n. 5, p. 747–760, mai.2015.
- MCGAVIN, D. **Bases da patologia em veterinária**. 4 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2009.
- MCLLWRAITH, C.W. From arthroscopy to gene therapy: 30 years of looking in joints. **Am. Assoc. Equine Pract.** v. 51, p. 65-113, 2005.
- MCLLWRAITH, C.W. *et al.* Evaluation of intra articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. **Arthroscopy** v.27, n. 11, p.1552-1561, 2011.
- MCLLWRAITH, C.W.; TROTTER, G.W. Clinical features and diagnosis of equine joint disease,. In: *Ibid.* (Eds), **Joint Disease in the Horse**. W.B. Saunders, Philadelphia, p.120-144, 1996.
- MEACHIM, G., STOCKWELL, R. A. The matrix. In: FREEMAN, M.A.R., ed. **Adult Articular Cartilage**. London: Pitman Medical, p. 1-68, 1979.
- MENEZES, H.S. Ética e pesquisa em animais. **Rev Amrigs**. v. 46, n. 3,4, p. 105-108, 2002.
- MILANO, G. *et al.* The effect of platelet rich plasma combined with microfractures on the treatment of chondral defects: an experimental study in a sheep model. **Osteoarthritis and Cartilage**. v.8, p. 971-980, 2010.

MILANO, G. *et al.* Repeated platelet concentrate injections enhance reparative response of microfractures in the treatment of chondral defects of the knee: an experimental study in an animal model. **Arthroscopy**. v.28, n.5, p.688-701, 2012.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in neurobiology**. v.66, n.6, p.355-474, 2002.

MOISIO, K. *et al.* Varus-valgus alignment: reduced risk of subsequent cartilage loss in the less loaded compartment. **Arthritis Rheum**. v.63, n.4, p.1002–1009, 2011.

MURATOVIC, D. *et al.* Bone marrow lesions detected by specific combination of MRI sequences are associated with severity of osteochondral degeneration. **Arthritis Res Ther**. v.18, n.54, 2016.

NAGATANI, T.; SAITO S.; SATO, M.; YAMADA, M. Development of an ultra high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system. **Scanning Microscopy**. v.11, p. 901-909, 1987.

NEOGI, T. *et al.* Association of joint inflammation with pain sensitization in knee osteoarthritis: the Multicenter Osteoarthritis Study. **Arthritis Rheumatol**. v.68, n.3, p.654- 661, 2006.

NEU, C.P.; HULL, M.L.; WALTON, J.H. Heterogeneous threedimensional strain fields during unconfined cyclic compression in bovine articular cartilage explants. **J Orthop Res**. v.23, p.1390- 1398, 2005.

O'CONNOR BL. The histological structure of dog knee menisci with comments on its possible significance. **Am J Anat**. v.147, n. 4, p. 407-417, dez.1976.

ONU. Organização das Nações Unidas. "Chronic Rheumatic Conditions". Chronic diseases and health promotion. 2012. Disponível em <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>. Acesso em 10/10/2017.

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L. Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease. **Equine Vet. J**. v. 26, n. 4, p. 263-277, 1994.

PEARLE, A.D.; WARREN, R.F.; RODEO, S. A. Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. **Clin Sports Med**. v. 24, p. 1-12, 2005.

PELLETIER, J.P.; MARTEL-PELLETIER, J.; ABRAMSON, S.B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. **Arthritis Rheum**. v.44, n. 6, p.1237-47, 2001.

POEHLING, G.G.; RUCH, D.S.; CHABON, S.J. The landscape of meniscal injuries. **Clin Sports Med**. v. 9, n. 3, p. 539-549, 1990.

POLLARD, T.C.; GWILYM, S.E.; CARR, A.J. The assessment of early osteoarthritis. **J Bone Joint Surg Br**. v. 90, n. 4, p.411-421, abr. 2008.

POOLE, R.; GUILAK, F.; ABRAMSON, S. Etiopathogenesis of Osteoarthritis. In: MOSKOWITZ, R. W. *et al.* ed. **Osteoarthritis - diagnosis and medical/surgical management**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 27-49, 2007.

PORFIRIO, E.; FANARO, G.B. Suplementação com colágeno como terapia complementar na prevenção e tratamento de osteoporose e osteoartrite: uma revisão sistemática. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.** Rio de Janeiro, v.19, n. 1, p.153-164, 2016.

PRITZKER, K. P.H. *et al.* Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis and cartilage**. v. 14, n. 1, p. 13-29, jan.2006.

REDLER, I. A scanning electron microscopic study of human normal and osteoarthritic articular cartilage. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v.103, p.262-268,1974.

REDLEY, I.; ZIMNY, M. L. Scanning electron microscopy of normal and abnormal articular cartilage and synovium. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 52-A, p. 1395-1404, 1970.

REIFE, R.A.; STUART, J.M.; HASTY, K.A. Pathological cartilage degradation in human arthritides. In: WOESSNER, J.F.; HOWELL, D.S.; DEKKER, M. **Joint cartilage degradation**, Nova Iorque, p. 230-252, 1995.

ROCHA, F.A.C. *et al.* Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm. res.** v.48, p.485–490, 1999.

ROCHA, F.A.C. *et al.* Protective Effect of an Extract from *Ascaris suum* in Experimental Arthritis Models. **Infection and Immunity**. v.76, n.6, p. 2736–2745, 2008.

SAADAT, E. *et al.* Diagnostic performance of in vivo 3-T MRI for articular cartilage abnormalities in human osteoarthritic knees using histology as standard of reference. **Eur Radiol**. v.18, p.2292–2302, 2008.

SAARAKKALA, A. *et al.* Quantitative ultrasound imaging detects degenerative changes in articular cartilage surface and subchondral bone. **Phys Med Biol**. v. 51, p. 5333-5346, 2006.

SEDA, AC. Orientações ao Paciente. Sociedade Brasileira de Reumatologia. 2001. Disponível em: <http://www.reumatologia.com.br/>. Acesso em 12/10/2017.

SETTON, L. A.; ELLIOTT, D.M.; MOW, V.C. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. **Osteoarthritis Cartilage**. v. 7, p. 2–14, 1999.

SHARMA, L.; KAPOOR, D.; ISSA, S. Epidemiology of Osteoarthritis: na update. **Curr. Opin. Rheumatol**. v. 18, n. 2, p. 147-156, mar.2006.

SIMON, W. Scale effects in animal joints. I. Articular cartilage thickness and compressive stress. **Arthritis Rheum** v. 13, p. 244-255, 1970.

SMITH, M.D. The normal synovium. **Open Rheumatol J**. v.5, p.100–106, 2011.

SOUZA, M. M. 2011. 129 f. **Estudo da forma e da rugosidade em próteses ortopédicas de quadril**. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

STOOP, R. et al. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. **Arthritis Rheum.** v.43, p.2121–31, 2000.

STOOP et al. Expression of type X collagen in young and old C57Bl/6 and Balb/c mice. Relation with articular cartilage degeneration. **Osteoarthritis Cartilage.** v. 9, n. 2, p.92-100, fev.2001.

SUMIHISA, O. *et al.* Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee **BMC Musculoskeletal Disorders.** v. 12, n. 144, 2011.

TADASHI, H. *et al.* Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone.** v.38, p.234–243, 2006.

TEEPLE, E. *et al.* Animal models of osteoarthritis: challenges of model selection and analysis. **AAPS Journal.** v.15, p.438–446, 2013.

TEOTÔNIO, M. A. A. 2013. 119 f. **Transecção meniscal mais que a ressecção promove dor articular e lesão em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

TESHIMA, R., *et al.* Structure of the most superficial layer of articular cartilage. **J Bone Joint Surg.** v. 77, p. 460-464, 1995.

VARGAS, J. C. B. 2014. 200 f. **3D Characterization of Human Knee Cartilage Affected by Osteoarthritis Using Laser Scanning Microscopy**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). University of New South Wales, Sydney, Australia.2014.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W.R.; YOSHINARI, N. H. 2003. Colágeno na cartilagem osteoartrotica(*) Collagen in osteoarthrotic cartilage. **Rev Bras Reumatol,** v. 43, n. 3, p. 160-166, mai/jun.2003

VERRI, J. R. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics.** v.112, p.116-138, 2006.

WHITE, A.G. *et al.* Direct and Indirect Costs of Pain Therapy for Osteoarthritis in an Insured Population in the United States. **J Occup Environ Med.** v.50, p.998-1005, 2008.

WOJTYS, E.M.; CHAN, D.B. Meniscus structure and function. **Instr Course Lect.,** v.54, p.323-330, 2005.

WOOLF, A. D.; PFLEGER, B. Burden of major musculoskeletal conditions. **Bull World Health Organ.** v.81, n.9, p.646-56, 2000.

YAMADA, A.L.M. 2011. 145 f. **Efeito do implante autólogo de plasma rico em plaquetas e células tronco mesenquimais na reparação de lesões condrais articulares induzidas experimentalmente em equinos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu- SP, 2011.

YANG, X.; LIU, J. Maximum entropy random fields for texture analysis, **Pattern Recognition Letters**, v. 23, p. 93-101, 2002.

ZANETTI, M. *et al.* Bone marrow edema pattern in osteoarthritic knees: correlation between MR imaging and histologic findings. **Radiology**. V. 215, p. 835-840, 2000.

ZHANG, W. *et al.* EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). **Ann Rheum Dis** v.64, p.669-81, 2005.

ZHANG, W. *et al.* EULAR evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). **Ann Rheum Dis** v.66, p.377-88, 2007.

ZHANG, W. *et al.* OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. **Osteoarthritis Cartilage** v.16, p.137-62, 2008.

**ANEXO A- APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (CEPA-UFC)**



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "CARACTERIZAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DA CARTILAGEM ARTICULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTRITE EM CAMUNDONGOS", protocolo nº 07/2016, sob responsabilidade da Profa. Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 01 de junho de 2016

Vigência do projeto	15/03/2016 a 15/10/2017
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de Animais	88
Peso/Idade	20-25g / 2 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 01 de junho de 2016


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sisepe: 1520734