



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE FORMAÇÃO DE PROFESSORES – CFP  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA VIDA – UACV  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**ANDERSON AMARO DOS SANTOS**

**A EVOLUÇÃO DA OSTEOARTRITE EM RELAÇÃO AO CONTEÚDO DE  
PROTEOGLICANOS E DENSIDADE DAS FIBRAS COLÁGENAS EM JOELHOS  
DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO  
ANTERIOR.**

**CAJAZEIRA – PB  
DEZEMBRO DE 2018**

ANDERSON AMARO DOS SANTOS

**A EVOLUÇÃO DA OSTEOARTRITE EM RELAÇÃO AO CONTEÚDO DE  
PROTEOGLICANOS E DENSIDADE DAS FIBRAS COLÁGENAS EM JOELHOS  
DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO  
ANTERIOR.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCC do curso de graduação em Medicina da Unidade Acadêmica de Ciências da Vida do Centro de Formação de Professores da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para a conclusão do curso.

ORIENTADOR: Prof. Ms. LUIZ JARDELINO DE LACERDA NETO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO VASILCEAC

**CAJAZEIRAS – PB  
DEZEMBRO DE 2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação - (CIP)  
Josivan Coêlho dos Santos Vasconcelos - Bibliotecário CRB/15-764  
Cajazeiras - Paraíba

S237e Santos, Anderson Amaro dos.

A evolução da osteoartrite em relação ao conteúdo de proteoglicanos e densidade das fibras colágenas em joelhos de ratos submetidos à transecção do ligamento cruzado anterior / Anderson Amaro dos Santos. - Cajazeiras, 2018.

45f.: il.

Bibliografia.

Orientador: Prof.Me. Luiz Jardelino de Lacerda Neto.

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac.

Monografia (Bacharelado em Medicina) UFCG/CFP, 2018.

1. Cartilagem articular. 2. Osteoartrite. 3. Proteoglicanos. 4. Fibras colágenas. I. Lacerda Neto, Luiz Jardelino de. II. Vasilceac, Fernando Augusto. III. Universidade Federal de Campina Grande. IV. Centro de Formação de Professores. V. Título.

UFCG/CFP

CDU -

ANDERSON AMARO DOS SANTOS

**A EVOLUÇÃO DA OSTEOARTRITE EM RELAÇÃO AO CONTEÚDO DE  
PROTEOGLICANOS E DENSIDADE DAS FIBRAS COLÁGENAS EM JOELHOS  
DE RATOS SUBMETIDOS À TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO  
ANTERIOR.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCC do curso de graduação em Medicina da Unidade Acadêmica de Ciências da Vida do Centro de Formação de Professores da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para a conclusão do curso.

Aprovado em: 06/12/2018

**BANCA EXAMINADORA**



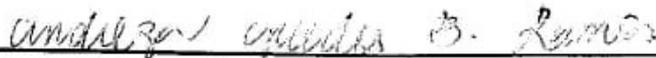
---

Prof. Ms. Luiz Jardelino de Lacerda Neto  
Unidade Acadêmica de Ciências da Vida (UACV/CFP/UFCG)  
Orientador



---

Profa. Dra. Rafaelle Cavalcante de Lira  
Unidade Acadêmica de Enfermagem (UAENF/CFP/UFCG)  
Examinadora



---

Profa. Dra. Andreza Guedes Barbosa Ramos  
Unidade Acadêmica de Ciências da Vida (UACV/CFP/UFCG)  
Examinador

**CAJAZEIRAS – PB**

**DEZEMBRO DE 2018.**

### ***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais Silvio e Fátima, exemplos de pessoas dignas, pelo apoio incondicional dado em todas as etapas de minha vida.*

*E ao meu filho Eduardo que um dia possa entender a distância em função desta etapa de minha vida.*

*AMO e ADMIRO muito vocês!*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*Ao meu orientador e amigo Prof. Ms. Luiz Jardelino de Lacerda Neto, pessoa de extrema sabedoria e competência, os meus sinceros agradecimentos por ter aceitado participar da orientação deste trabalho e principalmente pela convivência, paciência, compreensão e amizade construída ao longo desta minha jornada. Farei de tudo para preservar nossa amizade. MUITO OBRIGADO!*

*Ao Co-orientador e grande amigo Prof. Dr. Fernando Vasilceac, companheiro desde os tempos de graduação em Fisioterapia e do Mestrado, além de ser meu afilhado de casamento, agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório e por ter me convidado a compor seu grupo de pesquisa e assim ter propiciado acesso aos resultados deste trabalho. Sua amizade e apoio foram fundamentais para que eu conseguisse chegar até a conclusão do curso de medicina. Conte comigo sempre. MUITO OBRIGADO!*

*Por fim, um agradecimento especial à cidade de Cajazeiras-PB, que me acolheu como a um filho, me ensinou a ser um nordestino de coração e me proporcionou inúmeros momentos de alegrias, os quais jamais esquecerei em minhas lembranças. MUITO OBRIGADO!*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a Deus por ter me proporcionado saúde para que eu pudesse realizar mais este projeto de vida.*

*Agradeço aos professores participantes da banca examinadora, Profa. Dra. Rafaelle Cavalcante de Lira e Prof. Dr. Eder Almeida Freire, que aceitaram participar da avaliação deste trabalho proporcionando suas contribuições científicas.*

*Ao grande amigo Rafael (Patos Boy), pela amizade sincera e principalmente pelos momentos de descontração. Você foi muito importante para minha formação médica, como também para minha vida pessoal. Saiba que o considero como a um irmão. Estarei sempre ao seu lado, mesmo que fisicamente possa estar longe.*

*Ao outro grande amigo Geyson, pela companheirismo e amizade, pessoa que convivi durante alguns anos da graduação e me ensinou a ser uma pessoa melhor e mais responsável. Me espelho em sua dedicação e responsabilidade para com os afazeres. Farei de tudo para preservar nossa amizade.*

*Ao Prof. Dr. Antônio Fernandes Filho, que não mediu esforços para que a turma 10 pudesse ter um internato de qualidade no Hospital Universitário Lauro Wanderlei da Universidade Federal da Paraíba.*

*Aos colegas da turma 10, que acabaram por se tornar minha família durante esses anos de curso. Foram muitas risadas, gestos de companheirismo, noites e noites de estudos/revisões no CAMECA e inúmeras brigas, mas afinal, a gente só brinca e briga com as pessoas de quem se gosta.*

*À todos os professores da Unidade Acadêmica de Ciências da Vida, que me ensinaram não apenas um pouco de medicina, mas também a como ser um médico ético, técnico e principalmente humano.*

*Aos funcionários do CFP, que foram extremamente prestativos e puderam tornar mais simples a burocratização que permeia os bastidores da UFCG.*

*Ao Hospital Universitário Lauro Wanderlei da Universidade Federal da Paraíba, médicos preceptores e médicos residentes, que acolheram os alunos da turma 10 da UFCG de Cajazeiras sem qualquer distinção e assim contribuíram para a complementação técnica e humana de nossa formação médica.*

*Aos amigos de infância: Leandro, Alexandre, André, Ricardo e Ullysses, pelas muitas cervejas compartilhadas.*

*À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste sonho.*

**MUITO OBRIGADO!!!**

*“O sertanejo é, antes de tudo, um forte. Não tem o raquitismo exaustivo dos mestiços  
neurastênicos do litoral.”  
(Os Sertões – Euclides da Cunha)*

## RESUMO

A osteoartrite é uma doença crônica que atinge as articulações sinoviais causando degeneração da cartilagem articular e como consequência, acarreta prejuízos na qualidade de vida dos acometidos. Nesse contexto, estudos com modelos experimentais de osteoartrite são de fundamental importância tanto para o melhor entendimento da fisiopatologia articular, como para verificar a eficácia de novos métodos de tratamento. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a evolução do processo degenerativo na cartilagem articular de joelhos de ratos, quanto à perda do conteúdo de proteoglicanos e alteração na densidade das fibras de colágenos, em modelo experimental de osteoartrite por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) em quatro momentos pós lesão (3, 6, 9 e 12 meses). Para tanto, foram utilizados 25 ratos machos (*Wistar*) com 3 meses de idade, que foram distribuídos em 5 grupos: Grupo Controle (C), Grupo Osteoartrite 3 meses (OA3), Grupo Osteoartrite 6 meses (OA6), Grupo Osteoartrite 9 meses (OA9) e Grupo Osteoartrite 12 meses (OA12). Os animais do grupo controle não sofreram qualquer intervenção e foram eutanasiados aos 9 meses de idade. Os animais dos grupos osteoartrite foram eutanasiados nos respectivos tempos pós transecção do ligamento cruzado anterior. Para avaliar a progressão do processo degenerativo, foram realizadas análises do conteúdo de proteoglicanos e quantificação da densidade das fibras totais de colágeno. Quanto à análise estatística, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro Wilks. Nos dados considerados paramétricos foi aplicado o pós-teste ANOVA com Post Hoc Tukey ( $p \leq 0,05$ ) e nos dados considerados não paramétricos foi aplicado o pós-teste Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). Os resultados demonstraram uma redução gradual do conteúdo de proteoglicanos ao longo da evolução da osteoartrite. Os grupos OA3 e OA6 apresentaram menor quantidade de proteoglicanos em relação ao grupo C, porém não apresentaram diferença entre si. O grupo OA9 apresentou menor quantidade de proteoglicanos em comparação aos grupos C, OA3 e OA6. Por fim, o grupo OA12 apresentou maior redução do conteúdo de proteoglicanos em relação a todos os grupos. Além do mais, a análise da densidade das fibras de colágenos, revelou uma redução gradual da densidade de fibras colágenas ao longo da evolução do processo degenerativo, porém sem diferença significativa entre o grupo OA9 e OA12. Os grupos OA3 e OA6 apresentaram diferença em relação ao C, porém não apresentaram diferença entre si. Já o grupo OA9 apresentou diferença entre todos os grupos, com exceção do grupo OA12. Portanto, concluiu-se que a OA evoluiu de forma lenta e gradual no modelo experimental por TLCA, demonstrado através da diminuição tanto no conteúdo de proteoglicanos, como na densidade das fibras de colágeno logo no grupo OA3, sendo maiores nos grupos com maior tempo de exposição ao estímulo lesivo.

**Palavras-chave:** Cartilagem articular. Osteoartrite. Proteoglicanos. Fibras Colágenas.

## **ABSTRACT**

*Osteoarthritis is a chronic disease that affects the synovial joints causing degeneration of the articular cartilage and, as a consequence, causes losses in the quality of life of the affected ones. In this context, studies with experimental models of osteoarthritis are of fundamental importance both for a better understanding of joint pathophysiology and to verify the efficacy of new treatment methods. Thus, the objective of this study was to evaluate the evolution of the degenerative process in the cartilage of the knees of rats, regarding loss of proteoglycan content and alteration in the density of collagen fibers, in an experimental model of osteoarthritis by transection of the anterior cruciate ligament (TACL) in four moments after injury (3, 6, 9 and 12 months). For this purpose, 25 male rats (Wistar) at 3 months of age were divided into 5 groups: Control Group (C), Group Osteoarthritis 3 months (OA3), Group Osteoarthritis 6 months (OA6), Group Osteoarthritis 9 months (OA9) and Group Osteoarthritis 12 months (OA12). The animals in the control group did not undergo any intervention and were euthanized at 9 months of age. The animals of the osteoarthritis groups were euthanized in their respective times after transection of the anterior cruciate ligament. To evaluate the progression of the degenerative process, analyzes of the proteoglycan content and quantification of the density of the total collagen fibers were performed. As for the statistical analysis, the normality test of Shapiro Wilks was applied, in which in the data considered parametric the post-test ANOVA with Post Hoc Tukey ( $p \leq 0.05$ ) was applied and in the data considered non-parametric the post- Kruskal-Wallis test ( $p \leq 0.05$ ). The results demonstrated a gradual reduction in the content of proteoglycans throughout the evolution of osteoarthritis. The groups OA3 and OA6 presented lower amount of proteoglycans in relation to group C, but did not present any difference between them. The OA9 group had a lower amount of proteoglycans compared to groups C, AO3 and OA6. Finally, the OA12 group showed a greater reduction of the proteoglycan content in relation to all groups. Moreover, the analysis of the density of the collagen fibers showed a gradual reduction of the density of collagen fibers throughout the evolution of the degenerative process, but without significant difference between the OA9 and OA12 groups. The groups OA3 and OA6 showed a difference between group C, but did not present any difference between them. On the other hand, the OA9 group presented a difference between all groups, except for the OA12 group. Therefore, it was concluded that OA evolved slowly and gradually in the experimental model by TLCA, demonstrated by the decrease in both the proteoglycan content and the density of the collagen fibers in the OA3 group, being higher in the groups with longer exposure to the stimulus.*

**Keywords:** *Joint cartilage. Osteoarthritis. Proteoglycans. Collagen fibers.*

## LISTA DE ABREVEATURAS E SÍMBOLOS

<b>ABNT</b>	<b>Associação Brasileira de Normas Técnicas</b>
<b>ANOVA</b>	<b>Análise de Variância</b>
<b>C</b>	<b>Grupo Controle sem lesão</b>
<b>CFP</b>	<b>Centro de Formação de Professores</b>
<b>cm</b>	<b>Centímetro</b>
<b>DMDOA</b>	<b>Drogas Modificadoras da Doença Osteoartrite</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido Desoxirribonucléico</b>
<b>Dr</b>	<b>Doutor</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ácido Etilenodiaminotetracético</b>
<b>g</b>	<b>Grama</b>
<b>GAG</b>	<b>Glicosaminoglicana</b>
<b>IBGE</b>	<b>Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística</b>
<b>IL1<math>\beta</math></b>	<b>Interleucina-1<math>\beta</math></b>
<b>HE</b>	<b>Hematoxilina-Eosina</b>
<b>MEC</b>	<b>Matriz Extra Celular</b>
<b>mg/Kg</b>	<b>Miligrama por Kilograma de Massa Corporal</b>
<b>MMP</b>	<b>Metaloproteinase</b>
<b>Ms</b>	<b>Mestre</b>
<b>OA</b>	<b>Osteoartrite</b>
<b>OA3</b>	<b>Grupo 3 meses Pós Lesão</b>
<b>OA6</b>	<b>Grupo 6 meses Pós Lesão</b>
<b>OA9</b>	<b>Grupo 9 meses Pós Lesão</b>
<b>OA12</b>	<b>Grupo 12 meses Pós Lesão</b>
<b>OMS</b>	<b>Organização Mundial da Saúde</b>
<b>PB</b>	<b>Paraíba</b>
<b>PBS</b>	<b>Solução Tampão Fosfato</b>
<b>Prof</b>	<b>Professor</b>
<b>Profa</b>	<b>Professora</b>
<b>TCC</b>	<b>Trabalho de Conclusão de Curso</b>
<b>TLCA</b>	<b>Transecção do Ligamento Cruzado Anterior</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>Fator de Necrose Tumoral-<math>\alpha</math></b>
<b>UACV</b>	<b>Unidade Acadêmica de Ciências da Vida</b>

<b>UFCG</b>	<b>Universidade Federal de Campina Grande</b>
<b>UFSCar</b>	<b>Universidade Federal de São Carlos</b>
<b>≤</b>	<b>Menor ou Igual</b>
<b>μm</b>	<b>Micrômetro</b>
<b>%</b>	<b>Porcentagem</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema do complexo agregado de proteoglicanos.....	21
<b>Figura 2</b> - Estrutura da cartilagem articular dividida em quatro camadas.....	22
<b>Figura 3</b> - Procedimento cirúrgico para TLCA.....	30
<b>Figura 4</b> - Representação gráfica da média da pontuação do conteúdo de proteoglicanos.....	33
<b>Figura 5</b> - Fotomicrografia das lâminas coradas com Safranina (vermelho).....	34
<b>Figura 6</b> - Representação gráfica da média da densidade de fibras colágenas dos grupos.....	35
<b>Figura 7</b> - Fotomicrografia das lâminas coradas com Picrosirius Red.....	35

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sistema de graduação – Conteúdo de proteglicanos.....	31
---	----

## **APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Esse trabalho foi estruturado na forma de monografia, redigido de acordo com as normas metodológicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - Normas Brasileiras (NBR) números: 14724, 6027, 6023, 10520, 6024 e 6028; e aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), protocolo CEEA/UFSCar nº 021/2010 (ANEXO A). Vale ressaltar, que os resultados aqui apresentados serão utilizados para a confecção de um artigo científico a ser submetido na revista *Osteoarthritis and Cartilage (OARSI)*.

## SUMÁRIO

**RESUMO**

***ABSTRACT***

**LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS**

**LISTA DE FIGURAS**

**ÍNDICE DE TABELAS**

**APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
3.1 Cartilagem Articular.....	20
3.2 Osteoartrite.....	23
3.3 Modelos Experimentais de Osteoartrite.....	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Animais de Experimentação.....	28
4.2 Grupos experimentais.....	28
4.3 Modelo Experimental de Osteoartrites.....	29
4.4 Eutanásia e Processamento das Articulações.....	30
4.5 Análises dos Cortes.....	31
4.5.1 Análise Semi-Quantitativa do Conteúdo de Proteoglicanos.....	31
4.5.2 Análise Quantitativa da Densidade de Fibras Colágenas.....	32
4.6 Análise Estatística.....	32
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
5.1 Análise Semi-Quantitativa do Conteúdo de Proteoglicanos.....	33
5.2 Análise Quantitativa da Densidade de Fibras Colágenas.....	34
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7 LIMITAÇÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	
<b>ANEXO A</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional, a incidência de doenças crônicas musculoesqueléticas aumentou significativamente, entre essas a osteoartrite (OA) se destaca por ser frequente na população idosa e o aumento da sua prevalência está associada a um elevado custo psicológico, social e econômico devido a sérias restrições de funcionalidade e na qualidade de vida global dos indivíduos com essa condição (WYATT et al., 2017).

O impacto social não se restringe somente aos aspectos físicos, mas também nas manifestações de depressão e ansiedade. Há também o impacto econômico, pois existem os gastos diretos relacionados aos medicamentos responsáveis em amenizar os sintomas (BREEDVELD, 2004). Um estudo realizado nos Estados Unidos em 2003 avaliou, por meio de um questionário (QWB – *Quality of Well Being* – Qualidade de bem estar), a qualidade de vida dos pacientes com OA, em que a pontuação foi semelhante à de pacientes com depressão e câncer avançado (GROESSL et al., 2003).

A OA clinicamente é heterogênea e há poucas associações entre o grau da patologia articular com os sintomas clínicos, como por exemplo, a dor (WYATT et al., 2017). De acordo com Bennell et al. (2013) a OA é uma doença articular crônica, cuja manifestação é inerente à uma combinação de condições patológicas que envolvem: Degeneração progressiva da matriz extracelular (MEC) da cartilagem articular, remodelamento do osso sub-condral e presença de citocinas inflamatórias no líquido sinovial (inflamação de tecidos periarticulares).

Carter et al. (2004) afirmam que as cargas impostas ao tecido cartilaginoso são responsáveis por suas características (estrutura, organização e fisiologia). A cartilagem articular é um tecido de lento *turnover* e remodelamento, e em condições normais há um balanço entre anabolismo e catabolismo, para manter a homeostase do tecido (WYATT et al., 2017). O anabolismo é de vital importância para cartilagem manter sua integridade, já que está constantemente sujeita a *stress* mecânico e proteólise catabólica (AIGNER et al., 2006).

Diversos modelos experimentais de OA em diferentes espécies de animais são amplamente utilizados nos estudos para compreensão dos aspectos fisiopatológicos inerentes à degeneração da cartilagem articular, como também para averiguar o potencial terapêutico de condutas em relação à modulação da doença (APPLETON et al., 2007). Não existe um modelo ideal que englobe de forma precisa todos os aspectos da OA humana, contudo, o modelo que consiste na transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) de joelhos de ratos,

apresenta muitos aspectos patogênicos semelhantes à OA traumática que ocorre em humanos (FERRÁNDIZ et al., 2014).

O tratamento paliativo da osteoartrite normalmente concentra-se no alívio da dor. Drogas anti-inflamatórias não esteroidais são amplamente utilizadas, porém esses medicamentos acarretam sérios efeitos colaterais, o que causa limitação no seu uso. Assim, uma farmacoterapia eficaz para OA, tem que propiciar alívio dos sintomas com menos efeito colateral. Neste sentido tem se investido em pesquisas das chamadas drogas modificadoras da doença de OA (DMDOA). Entre as DMDOA atualmente discute-se sobre os benefícios de suplementos de colágeno, sulfato de condroitina e glicosaminoglicanos (LEONG, 2013). Outras formas terapêuticas relacionadas a poucos efeitos colaterais e exploradas em estudos são: laserterapia e fortalecimento muscular (SANTOS et al., 2014). Embora o momento do surgimento das modificações histológicas relacionadas à OA, como hiper/hipocelularidade, erosões focais e osteófitos marginais, observadas em modelo experimental por TLCA já estejam bem documentadas na literatura (GERWIN et al., 2011), existe uma lacuna quanto à associação destes achados em relação à perda do conteúdo de proteoglicanos e substituição na densidade das fibras colágenas.

Assim, o objetivo deste estudo foi constatar de forma linear a evolução do processo de OA quando à perda do conteúdo de proteoglicanos e alteração na densidade das fibras de colágeno, afim de fornecer informações importantes quanto ao tempo de pós operatório (TLCA) em que se deseja obter um determinado grau de lesão. Espera-se que os achados apresentados possibilitem o desenvolvimento de novas pesquisas experimentais com melhor delineamento metodológico para avaliar tratamentos que possam retardar tanto a diminuição da perda de proteoglicanos, como a alteração do colágeno na MEC. Vale ressaltar a importante colaboração do Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac do Departamento de Gerontologia da Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, no desenvolvimento deste trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem o objetivo de avaliar a evolução da OA na cartilagem articular de joelhos de ratos submetidos ao modelo experimental por TLCA em quatro momentos após o procedimento cirúrgico (3,6, 9 e 12 meses).

### 2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do estudo são:

- Avaliar a evolução do processo degenerativo na cartilagem articular de joelhos de ratos submetidos à TLCA em relação à perda do conteúdo de proteoglicanos;
- Avaliar a evolução do processo degenerativo na cartilagem articular de joelhos de ratos submetidos à TLCA em relação à alteração na densidade das fibras de colágenos;
- Correlacionar ambos os resultados com dados da literatura referentes a outros achados inerentes à evolução da OA.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

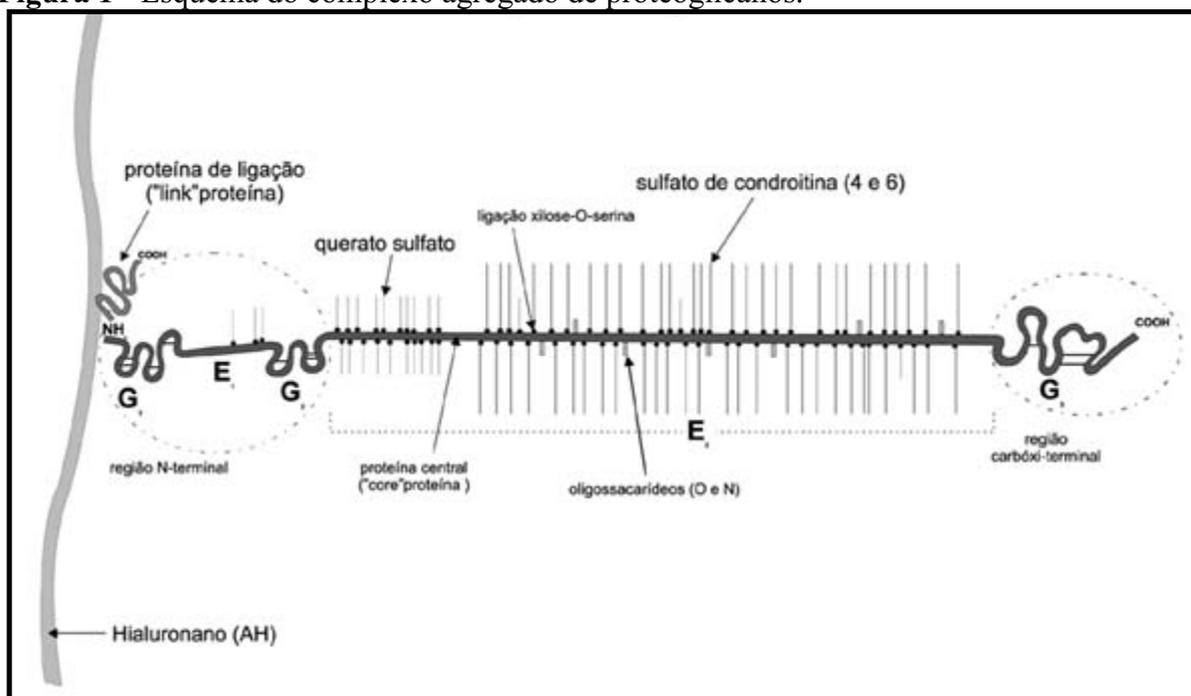
#### 3.1 Estrutura e Organização da Cartilagem Articular

A cartilagem articular é uma forma especializada de tecido conjuntivo, avascular e aneural de lento *turnover* e remodelamento, e em condições normais há um balanço entre anabolismo e catabolismo para manter a homeostase do tecido (WYATT et al., 2017). É especializada em suportar cargas aplicadas à articulação, além de proporcionar a melhor ação biomecânica. Assim, o anabolismo é de vital importância para cartilagem manter sua integridade, já que está constantemente sujeita a estresse mecânico e proteólise catabólica (AIGNER et al., 2006).

Os condrócitos presentes nas lacunas são derivados de células mesenquimais e são as únicas células presentes na cartilagem articular, cuja função principal é a manutenção dos componentes da MEC por meio de citocinas anabólicas e catabólicas. Eles secretam colágeno, principalmente do tipo II, proteoglicanos e glicoproteínas, como a condronectina e glicosaminoglicanos (FLIK et al., 2007). Segundo Thomas et al., (2007) os condrócitos regulam as atividades enzimáticas da matriz e assim mantém a homeostase entre os processos de síntese e degradação. A cartilagem articular não apresenta vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, portanto o aporte nutricional do tecido e a retirada de catabólitos ocorrem através da interação entre a vascularização presente na sinóvia e os condrócitos por meio do líquido sinovial (VASILCEAC et al., 2011).

A MEC é composta predominantemente por uma densa rede de fibras de macromoléculas de colágeno (60%), principalmente do tipo II, entretanto, também estão presentes os tipos V, VI, IX, X, XI, XII e XV (VELOSA et al., 2003). Esses colágenos se encontram embebidos em um firme gel hidratado de proteoglicanos. As proteoglicanos são formadas por um núcleo protéico central e possui glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatadas (formadas por polissacarídeos sulfatado de condroitina e querato sulfato) ligadas a esse núcleo e podem ser encontradas como monômeros ou na forma agregada (RENNER et al., 2006). O agregado de proteoglicanos é composto de uma cadeia de ácido hialurônico central (GAG não sulfatadas) com múltiplos monômeros de proteoglicanos ligadas a ele (ALFORD; COLE, 2005) (Figura 1). Por ser uma molécula hidrofílica, as proteoglicanos conferem resistência à compressão tecidual através de interações de tumefação osmótica, resistindo à perda de fluídos (SZAFRANKI et al, 2004).

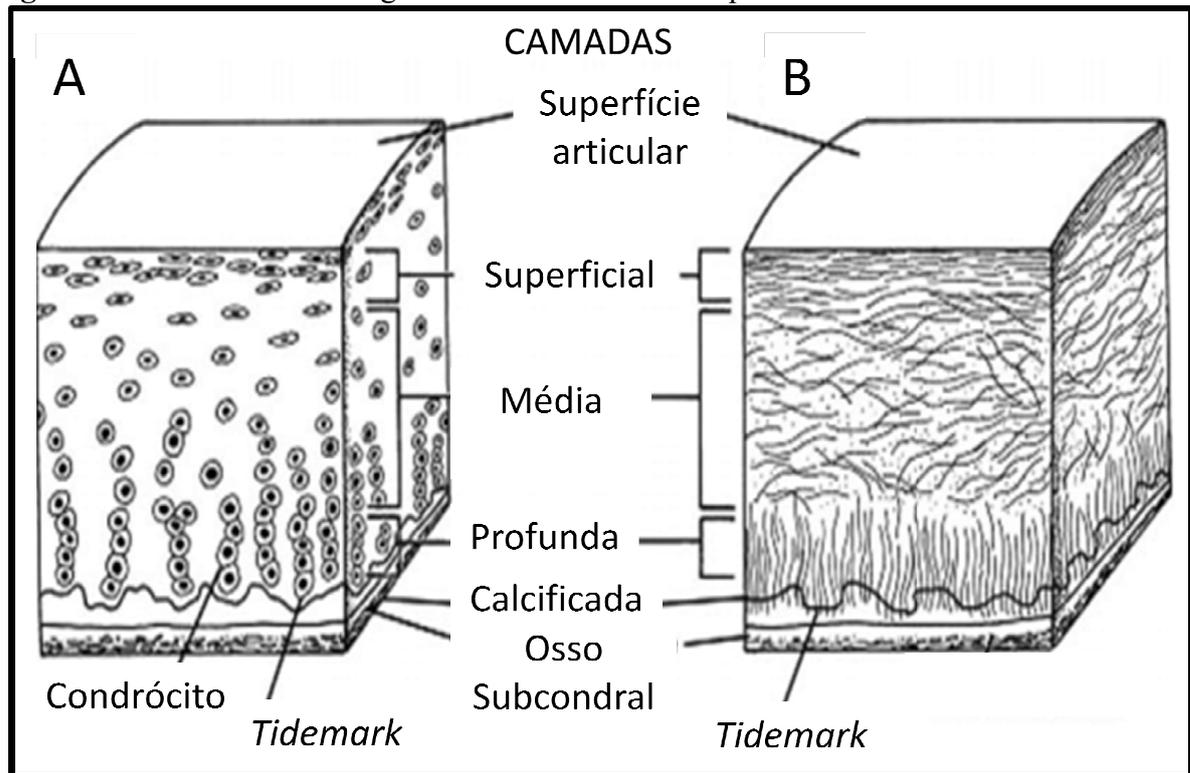
**Figura 1** - Esquema do complexo agregado de proteoglicanos.



Fonte: Renner et al., 2006. Legenda: O complexo agregado de proteoglicanos é formado pelo ácido hialurônico, proteína de ligação e proteoglicanos (glicosaminoglicanos sulfatadas e proteína central).

Como o tecido cartilaginoso reveste as superfícies articulares, além de suportar as cargas às quais as articulações são submetidas, também facilita o deslizamento dos ossos nas articulações. Para o melhor desempenho de suas funções, a estrutura da cartilagem articular muda conforme a profundidade a partir da superfície até o osso subcondral (LYONS et al., 2006). Alguns autores dividem a cartilagem articular em camadas paralelas a superfície (camada superficial, camada média, camada profunda e camada calcificada), em que cada camada apresenta funções específicas relacionadas com suas estruturas (FLIK et al., 2007). A camada superficial corresponde a 10% e possui células achatadas, feixes de colágenos dispostos paralelamente à superfície e baixa concentração de proteoglicanos, o que confere resistência às forças de cisalhamento. Já as camadas média e profunda são maiores que a camada superficial, além de possuírem condrócitos esféricos com altas taxas metabólicas e que se agrupam em colunas na camada profunda; também ocorre maior presença de proteoglicanos e fibras colágenas de maior diâmetro que tendem a se posicionarem perpendicular à superfície conforme a camada se aprofunda e passam a conferir melhor resistência aos efeitos compressivos. Por fim, a camada calcificada, escassa em condrócitos e rica em sais de cálcio. As fibrilas colágenas da camada profunda parecem ancorar nesta região (WYATT et al., 2017) (Figura 2).

**Figura 2** - Estrutura da cartilagem articular dividida em quatro camadas.



Fonte: FLIK, 2007. Em (A) observa-se a variação na morfologia dos condrócitos em cada camada; em (B) observa-se orientação das fibras de colágeno em cada camada (modificado).

Vale ressaltar, que todo o processo de remodelamento da cartilagem articular ocorre por meio das citocinas sintetizadas pelos condrócitos a partir do estímulo mecânico ao qual o tecido é submetido. As proteínas morfogênicas do osso (BMPs), pertencentes à superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), são consideradas os mais potentes fatores anabólicos da cartilagem articular, aumentando a síntese de proteoglicanos e colágeno tipo II (AIGNER et al, 2006). A degradação da cartilagem frente a estímulos lesivos ocorre através da síntese de citocinas pró-inflamatórias pelos condrócitos, incluindo a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que estimulam a produção de uma variedade de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases (MMPs) (YASUDA, 2006).

Portanto, é consenso que as mudanças morfológicas na cartilagem articular são influenciadas pelas demandas funcionais do tecido relacionadas à absorção e redistribuição de cargas compressivas. Dessa maneira, é evidente que quando o tecido é submetido a cargas anormais além da sua capacidade de remodelamento, ocorre um favorecimento das atividades catalíticas, em que o condrócito altera seu estado metabólico e passa a sintetizar enzimas proteolíticas caracterizando o início de um processo degenerativo como a OA (FERRÁNDIZ et al., 2014).

### 3.2 Osteoartrite

A OA é a forma mais comum de artrite, sendo caracterizada como uma patologia crônica que atinge as articulações sinoviais causando degeneração e inflamação da mesma. Constitui-se a principal causa de incapacidade entre os idosos, sendo uma das principais causas de morbidade além de estar associada a elevado custo social (BREEDVELD, 2004).

A doença consiste em uma desordem crônica e degenerativa, caracterizada pela degradação da cartilagem articular e inflamação sinovial de baixo grau (sinovite), além de alterações peri-articulares, como esclerose do osso subcondral e formação de osteófitos (SHARMA, 2016). Dentre as doenças crônicas, a OA de joelho é a mais comum do aparelho locomotor e ocasiona sérias limitações na mobilidade e prejuízo na qualidade de vida da população cometida (FAVERO et al., 2016). Aproximadamente 40% dos idosos acima de 70 anos apresentam OA de joelho, 80% destes apresentam limitações funcionais e 25% não conseguem desempenhar suas principais atividades de vida diária (LEITE et al., 2011).

Os indivíduos portadores de OA comumente apresentam dor, rigidez, crepitações e limitações funcionais relacionadas à mobilidade articular (SHARMA, 2016). Na fisiopatologia da OA estão presentes respostas inflamatórias responsáveis pelos sintomas descritos anteriormente e envolve diversos processos bioquímicos (SANTOS et al., 2014). Na fase inicial da OA observa-se a interrupção da homeostase metabólica, com proliferação dos condrócitos, aumento do catabolismo e da síntese de componentes da MEC em resposta ao estímulo lesivo (RENNER et al., 2006).

A alteração do estado metabólico dos condrócitos faz com que estes sintetizem citocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), que desencadeiam uma cascata proteolítica mediada por collagenases, como a MMP-1 (colagenase intersticial), MMP-8

(colagenase neutrofila) e MMP-13 (colagenase-3), gelatinases (MMP-9 e MMP-2), e estromelisinases, em particular MMP-3 (estromelisinase-3) (AIGNER et al., 2006). Em consequência, ocorre degradação dos colágenos (principalmente do tipo II) e proteoglicanos, além do surgimento de colágeno tipo X (normalmente não encontrado na cartilagem articular) (WODASIEWICZ et al., 2014).

Diante de um processo lesivo já iniciado, a depressão de proteoglicanos é uma das primeiras anormalidades detectáveis e aparece antes mesmo de sinais macroscópicos de deteriorização da superfície articular. Com a perda de proteoglicanos, o tecido perde sua função biomecânica uma vez que tem sua capacidade elástica diminuída, o que proporciona a evolução do processo da OA com perda dos componentes da MEC e deteriorização do tecido. Como os condrócitos aumentam sua taxa metabólica na tentativa de recuperar o tecido lesado,

é possível observar um aumento no número de células, desorganização celular, presença de clones de condrócitos, hipertrofia de condrócitos e o processo culmina na morte celular por apoptose (WYATT et al., 2017).

Outra alteração que ocorre com a cartilagem articular sob processos lesivos mais avançados, é a diminuição de colágeno tipo II, ou até sua substituição por colágeno tipo X. Com o decorrer da lesão, é possível observar fibrilações no tecido, diminuição na espessura da MEC, fissuras no tecido que podem evoluir até as camadas mais profundas, presença de osteófitos marginais e por fim remodelamento do osso subcondral com total deformação do tecido articular (VASILCEAC et al., 2011). Diante do exposto é consenso a dificuldade de se classificar a atividade biológica da doença e sua progressão, até porque os métodos utilizados para classificar os estágios de evolução da OA possuem diferentes parâmetros. Os métodos mais utilizados no meio clínico e na histopatologia são respectivamente: o proposto pela OARSI (*Osteoarthritis Research Society International* – Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrites) e o HHGS (*Histologic Histochemical Grading System* – Sistema de Gradação Histológica e Histoquímica) (PRITZKER et al., 2006).

Embora a necessidade de intervenções e tratamentos da OA sejam evidentes, há obstáculos e questões a serem investigados (GERWIN et al., 2011). Desta forma, para uma melhor compreensão da evolução da doença, modelos animais de OA são ferramentas de pesquisas poderosas para o estudo da fisiopatologia da lesão articular e na comprovação da eficácia de novas propostas terapêuticas. Portanto, estudos experimentais contribuem tanto para a consolidação de conhecimentos, como também para o estabelecimento de novos tratamentos clínicos para a OA (LITTLE; ZAKI, 2012).

### 3.3 Modelo Experimental de Osteoartrite por Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

A OA espontânea é extremamente incomum em ratos de todas as cepas, assim os modelos experimentais mais comumente usados são os de lesão cirúrgica, como a meniscectomia associado à transecção do ligamento cruzado anterior ou TLCA isolada, que podem ou não estarem associados à exercícios de alto impacto pós lesão. Quanto aos modelos quimicamente induzidos (injeção intra-articular de substâncias irritantes - iodoacetato ou papaína), são considerados agressivos e ocasionam danos articulares extremos em curto período (BENDELE, 2001).

São utilizados diversos animais (camundongos, ratos, coelhos, cães, cavalos, porcos, gatos e carneiros) e os modelos quanto ao surgimento da lesão articular podem ser classificados em espontâneos, geneticamente induzidos, induzidos cirurgicamente ou por

injeção intra-articular de substâncias químicas (KUYINU et al, 2016). No entanto, não existe um modelo ideal que englobe de forma precisa todos os aspectos da OA humana e cada um apresenta vantagens e desvantagens (APPLETON et al, 2007). Assim, há necessidade de continuar usando vários modelos animais de OA, com um maior detalhamento dos parâmetros, a fim de estender às condições humanas (LITTLE; ZAKI, 2012).

A utilidade do uso de modelos animais para o estudo da cartilagem articular são as semelhanças fisiológicas e anatômicas notáveis em comparação ao tecido humano. Modelos experimentais de OA possuem a finalidade de promover a compreensão dos aspectos fisiopatológicos da doença, além de propiciar estudos com propostas de tratamentos potencialmente capazes de minimizar a dor e os prejuízos funcionais. Para os modelos de OA induzidos cirurgicamente em ratos, recomenda-se o uso de animais esqueleticamente maduros, com 12 semanas de idade ou mais. Já os ratos envelhecidos (mais de 12 meses de idade) são indicados para estudos de acompanhamento de biomarcadores (GERWIN et al., 2011).

O modelo que consiste na TLCA de joelhos de ratos apresenta muitos aspectos patogênicos semelhantes à OA traumática que ocorre em humanos, uma vez que gera instabilidade articular (SANTOS et al, 2014). Além do mais, a grande vantagem do modelo experimental de TLCA em ratos está no fato de o dano articular se desenvolver de forma progressiva, o que torna possível estabelecer o estágio da lesão em que se deseja desenvolver os estudos (GERWIN et al, 2010). Alguns autores afirmam que os achados após 2 semanas da cirurgia de TLCA em ratos, correspondem aos estágios iniciais da OA com a presença de alterações histológicas no tecido (diminuição de proteoglicanos, presenças de clones de condrócitos, osteófitos e morte celular) e por volta de 12 meses as alterações encontradas correspondem aos estágios mais avançados da doença com a observação de alterações estruturais do tecido e remodelamento das fibras de colágeno (VASILCEA et al., 2010; DIAS et al., 2011; MANKIN et al., 1971).

Santos et al. (2014) encontraram sinais iniciais da OA após 5 semanas da TLCA de joelhos de ratos, evidenciado pelo aumento da espessura do tecido e perdas de proteoglicanos. O primeiro evento indica alteração do estado metabólico dos condrócitos frente ao estímulo lesivo, que passa a produzir mais componentes da MEC numa tentativa de recuperar o tecido já em início de lesão. O segundo evento mostra a presença de citocinas catabólicas decorrentes do processo artrítico de sobrecarga. No período de 8 semanas os autores constataram a progressão da degeneração por meio das presenças de hiper celularidade, citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e da colagenase MMP-13.

Nas pesquisas em modelos animais de AO, destacam-se as avaliações histológicas da cartilagem articular que são consideradas uma das principais ferramentas para compreender o comportamento articular na doença e constatar a eficácia de novos tratamentos (GERWIN et al, 2010). Para tanto, a avaliação histológica semi-quantitativa de MANKIN é uma ferramenta amplamente utilizada nos estudos experimentais e permite graduar a lesão da cartilagem articular por meio da avaliação da celularidade, presença de clones de condrócitos e perda da coloração por Safranina-O (perda de proteoglicanos) (RENNER et al., 2006; MANKIN et al., 1971).

Para um melhor direcionamento dos estudos experimentais, a Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (OARSI), publicou em 2010 seu guia de recomendações para avaliação histológica, “*The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat*” (Iniciativa de Histopatologia da Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrites e Recomendações da Avaliação Histológica da Osteoartrites em Ratos), que descreve recomendações para a avaliação histológica da cartilagem articular de ratos em processo de degeneração e consiste em um sistema eficiente que combina várias características histopatológicas (WYATT et al, 2017; GERWIN et al., 2010).

Segundo Gerwin et al. (2011), a TLCA em ratos maduros leva ao desenvolvimento de degeneração cartilaginosa progressiva, com a presença de erosões focais em torno de 8 semanas principalmente no 1/3 externo do platô tibial medial e no côndilo medial do fêmur. Achados indicativos de lesão mais branda podem ser observados histologicamente por volta de 4 a 6 semanas. Já a perda total do tecido articular ocorre por volta de 12 meses pós cirurgia. Em outro estudo, Ferrándiz et al. (2014) constataram na cartilagem articular de ratos de meia-idade 10 meses após a TLCA, achados compatíveis a um estado avançado de lesão, caracterizado por meio das presenças de hipocelularidade, condrócitos hipetrofiados, degradação do colágeno tipo II, perda de proteoglicanos, erosões e sinovite (justificado pelo aumento de IL-1 $\beta$ ).

Diante da relevância dos estudos da fisiopatologia da OA em modelos experimentais e embora as alterações histológicas no modelo por TLCA estejam amplamente detalhada em relação à evolução do processo degenerativo nos diversos tempos pós lesão, observa-se a ausência de um estudo que contemple de forma linear as alterações relacionadas tanto à perda do conteúdo de proteoglicanos, como alterações na densidade das fibras colágenas na progressão da OA e que possam ser correlacionadas aos achados histológicos da literatura. Neste contexto, os resultados apresentados neste estudo fornecerão informações para novas

pesquisas envolvendo tratamentos com capacidade de atuar no retardo tanto da perda de proteoglicanos, como na alteração na densidade das fibras de colágeno, uma vez que os pesquisadores poderão estabelecer com maior precisão o grau de degeneração articular em que se deseja iniciar as intervenções, além de terem uma comparação para determinar o sucesso ou o fracasso terapêutico.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais de Experimentação

Para a realização deste estudo, foram utilizados 25 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*), da raça *Wistar*, com 3 meses de idade, massa corporal média de 250g, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos e mantidos no biotério do Departamento de Gerontologia da Universidade Federal de São Carlos, onde permaneceram alocados individualmente em gaiolas de polipropileno padrão, alimentados com ração comercial (Primor rações), com água a vontade e mantidos em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura de 22°C ± 2°C e ambiente higienizado). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos, protocolo CEEA/UFSCar nº 021/2010 (ANEXO A).

### 4.2 Grupos Experimentais

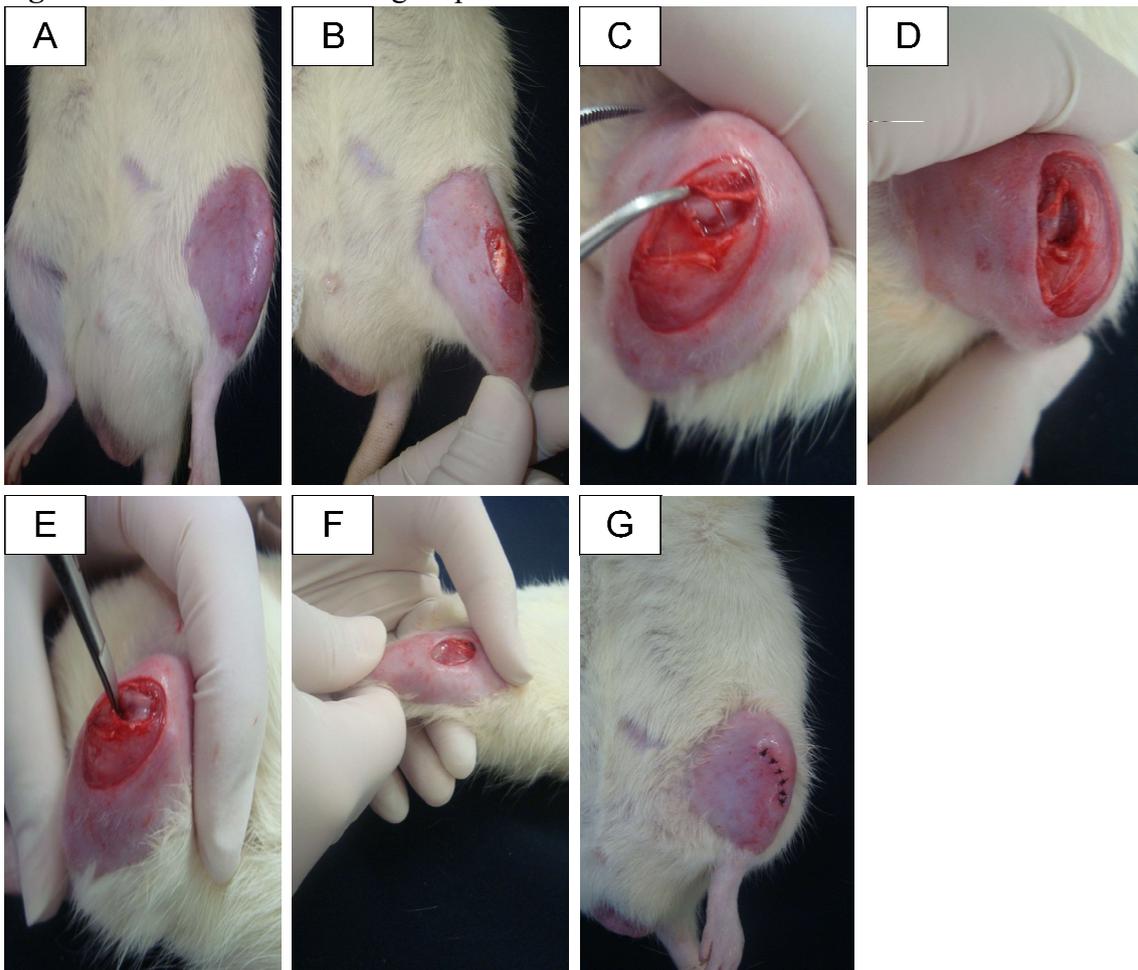
Os animais foram pesados e distribuídos nos seguintes grupos (n=5):

- Grupo controle: Os animais permaneceram em livre deambulação e foram eutanasiados ao completarem 9 meses de idade – (C). O tempo para a eutanásia foi determinado para se obter uma articulação sadia sem influência de fatores relacionados à jovialidade e à senilidade. Vale ressaltar que grupos controles com sacrifícios nos respectivos tempos propostos, só representaria o sacrifício de maior número de animais desnecessariamente;
- Grupo Osteoartrite 3 meses: Os animais foram submetidos à TLCA e eutanasiados 3 meses após o procedimento cirúrgico – (OA3);
- Grupo Osteoartrite 6 meses: Os animais foram submetidos à TLCA e eutanasiados 6 meses após o procedimento cirúrgico – (OA6);
- Grupo Osteoartrite 9 meses: Os animais foram submetidos à TLCA e eutanasiados 9 meses após o procedimento cirúrgico – (OA9);
- Grupo Osteoartrite 12 meses: Os animais foram submetidos à TLCA e eutanasiados 12 meses após o procedimento cirúrgico – (OA12).

#### 4.3 Modelo Experimental de Osteoartrite

Para a realização do procedimento cirúrgico de TLCA no joelho esquerdo, os animais foram anestesiados com injeção de Ketamina (95mg/Kg) e Xilasina (12mg/Kg) e tricotomizados na região do joelho. Foi feita uma incisão longitudinal na região parapatelar. O tendão patelar foi localizado e rebatido medialmente, o que permitiu o acesso à região articular e localização do ligamento cruzado anterior. Uma vez visualizado o ligamento, o mesmo foi cuidadosamente, através de uma tesoura cirúrgica, seccionado. O sucesso da cirurgia foi testado através do teste de gaveta anterior, ou seja, constatação do livre movimento posterior do fêmur sobre a tibia. Em seguida o tendão patelar foi reposicionado e suturado com fio reabsorvível, por fim, foi feita a sutura da incisão (WILLIAM et al., 1982) (Figura 3). Os animais foram mantidos em caixas individuais com livre acesso à água e ração até o momento da eutanásia.

**Figura 3** - Procedimento cirúrgico para TLCA.



Legenda: Em (A) Tricotomia da região do joelho esquerdo; (B) Incisão longitudinal na região parapatelar; (C) O tendão patelar foi localizado e rebatido medialmente; (D) Acesso à região articular e localização do ligamento cruzado anterior; (E) Transecção do ligamento cruzado anterior através de uma tesoura cirúrgica; (F) Teste de gaveta anterior; (G) Tendão patelar foi reposicionado e suturado, por fim, foi feita a sutura da incisão.

#### 4.4 Eutanásia e Processamento das Articulações

Ao término dos respectivos períodos experimentais, os animais foram eutanasiados através de uma dose letal de anestésico (injetado intraperitonealmente) e imediatamente após foi realizada a ressecção cirúrgica das articulações dos joelhos esquerdo para confecção das lâminas. Os tecidos foram fixados em solução de formalina tamponada a 4% por 24 horas e posteriormente foram submetidas ao processo de descalcificação em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 40% por aproximadamente 30 dias. Por fim, o material foi processado em parafina e emblocado. Foi obtido um bloco para cada joelho.

De cada bloco foram realizados cortes seriados com 6  $\mu$ m de espessura através de um micrótomo (Leica RM – 2145, Germany). Os cortes foram realizados no plano sagital e perpendiculares à superfície articular na região do côndilo medial do fêmur. Os 30 primeiros cortes de 6  $\mu$ m foram descartados, e a partir daí cortes também de 6  $\mu$ m foram selecionados

para a montagem das lâminas a cada 5 cortes realizados, dando um total de 6 cortes por articulação (SANTOS et al., 2010).

Dos cortes obtidos, foram confeccionadas duas lâminas com três cortes cada. Uma lâmina de cada articulação foi corada com Safranina-O fast Green para realização da análise semi-quantitativa do conteúdo de proteoglicanos. As outras lâminas foram coradas com *Picro Sirius Red* para realização da quantificação da densidade das fibras totais de colágeno.

#### 4.5 Análises dos Cortes

##### 4.5.1 Análise Semi-Quantitativa do Conteúdo de Proteoglicanos

Para esta análise foram utilizadas as lâminas coradas com Safranina-O fast green, em que os três cortes presentes nas lâminas foram analisados por meio de microscopia de luz (Axiolab Zeiss) por 2 avaliadores cegados e treinados. O sistema de graduação semi-quantitativo para o conteúdo de proteoglicanos utilizado no estudo foi o Sistema de graduação Histopatológico para cartilagem articular proposto por Mankin et al. (1971) e modificado segundo Renner et al. (2006) (Tabela 1). Os cortes foram avaliados ao longo de toda sua extensão com um aumento de (100x). A observação de redução leve do corante em até metade da área total foi considerado *score* 1, quando essa redução foi além da metade da extensão total recebeu *score* 2. Na presença de redução intensa, o *score* 3 foi atribuído para até metade da extensão e *score* 4 quando em toda extensão. Vale ressaltar, que a perda de coloração encontra-se relacionada à perda de proteoglicanos e recebe maior graduação (MAKIN et al., 1971).

**Tabela 1.** Sistema de graduação – Conteúdo de proteoglicanos

<b>Coloração por Safranina</b>	
Normal	0
Redução leve	1
Redução moderada	2
Redução intensa	3
Corante não observado	4

Fonte: Renner et al. (2006)

#### 4.5.2 Análise Quantitativa da Densidade de Fibras Colágenas

As lâminas coradas com Picro Sirius Red foram submetidas à análise do brilho de birrefringência do colágeno por meio de microscopia de luz polarizada para quantificar as densidades totais das fibras colágenas presentes na cartilagem articular. Após a escolha aleatória de um corte por lâmina, este foi fotomicrografado por meio de um microscópio óptico equipado com polarizador de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e com uma câmera digital acoplada (Sony DSCs75, Tokyo, Japão). Foram selecionados três campos distintos do côndilo medial do fêmur, visualizados sob um aumento de 200 vezes. Para garantir que as regiões fotografadas de cada lâminas eram distintas, tomou-se como referência os cornos anterior e posterior do menisco medial do joelho. Assim, um campo foi fotomicrografado na área da cartilagem próxima ao corno anterior, um segundo campo foi fotomicrografado na área da cartilagem entre os cornos anterior e posterior e por fim, um último campo foi fotomicrografado na região localizada na área da cartilagem próxima ao corno posterior. As imagens foram processadas pelo analisador de imagens Image J (Versão 1.45, Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, EUA) que através da seleção de tonalidades birrefringentes avermelhadas (fibras de maior densidade) ou esverdeadas (fibras de menor densidade) dadas pelo Picro Sirius Red sob luz polarizada, reconhece e quantifica a densidade de fibras colágenas. Obteu-se, portanto, a porcentagem da densidade de fibras colágenas na área total da cartilagem articular selecionada para análise (VASILCEAC et al., 2010).

#### 4.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados estatisticamente e os resultados apresentados de forma descritiva e ilustrados em gráficos. Para a verificação da normalidade dos dados em cada análise, foi aplicado o teste de Shapiro Wilk. Nos dados considerados paramétricos foi aplicado o pós-teste paramétrico ANOVA com Post Hoc Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Já nos dados considerados não paramétricos foi aplicado o pós-teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ). Foram utilizados o software estatístico *Statistic 12* e o *software Exel 2013*.

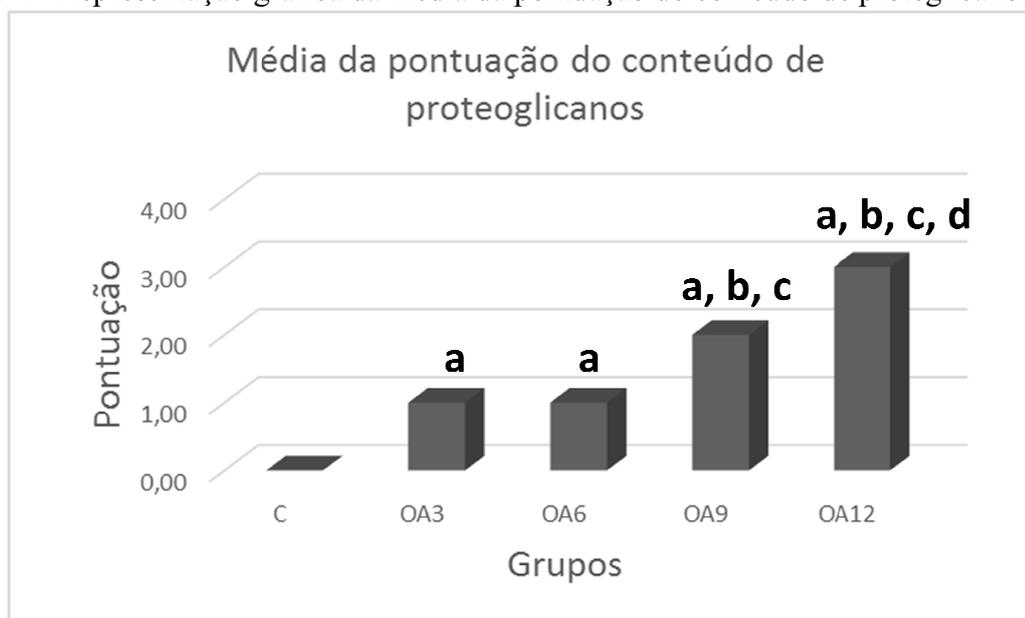
## 5 RESULTADOS

Durante o período experimental, os animais não apresentaram complicações pós-cirurgia. Eles regressaram rapidamente à alimentação normal e não apresentaram perda de massa corporal. No pós-operatório imediato, foi ofertado 500mg de dipirona (20 gotas) diluídos em 500ml de água por 48 horas. Deve-se ressaltar que nenhum animal morreu durante o experimento e não foi observado presença de infecção na área da incisão.

### 5.1 Análise Semi-Quantitativa do Conteúdo de Proteoglicanos

Na avaliação do conteúdo de proteoglicanos, pelo Sistema histológico-histoquímico de Mankin et al. (1971) modificado por Renner et al. (2006), observou-se uma redução gradual do conteúdo de proteoglicanos ao longo da evolução da osteoartrite. Os grupos OA3 e OA6 apresentaram diferença entre o grupo C (OA3 e C,  $p=0.03$ ; OA6 e C,  $p=0.03$ ), porém não apresentaram diferença entre si (OA3 e OA6,  $p=0.61$ ). Já o grupo OA9 apresentou diferença entre todos os grupos (OA9 e C,  $p=0.02$ ; OA9 e OA3,  $p=0.02$ ; OA9 e OA6,  $p=0.02$ ; OA9 e OA12,  $p=0.02$ ). O grupo OA12 também apresentou diferença entre todos os grupos, apresentando maior redução do conteúdo de proteoglicanos (Figura 4).

**Figura 4** - Representação gráfica da média da pontuação do conteúdo de proteoglicanos.

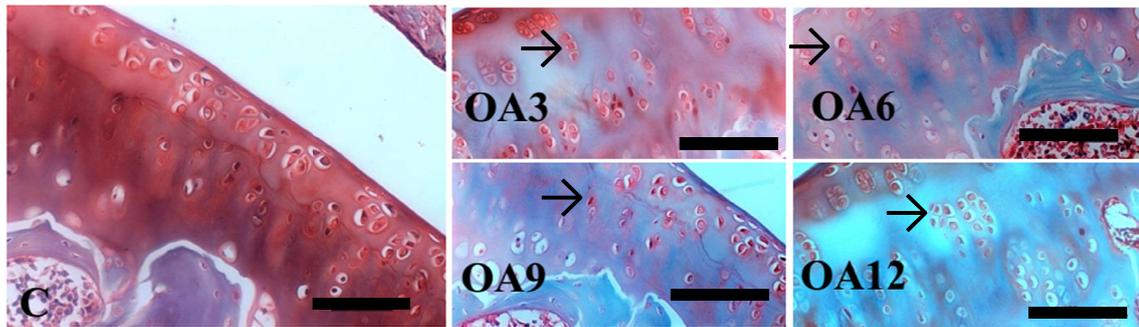


Legenda: a  $p<0,05$  diferem de C; b  $p<0,05$  diferem de AO3; c  $p<0,05$  diferem de AO6; d  $p<0,05$  difere de AO9.

A figura abaixo ilustra a redução do conteúdo de proteoglicanos dos grupos ao longo da evolução da doença. Observa-se que a coloração avermelhada característica da *Safranina* vai

perdendo espaço para uma coloração azulada característica do *Fast Green*. As moléculas dos proteoglicanos, por serem altamente hidrofílicas, atraem-se quimicamente com as moléculas da *Safranina*, atribuindo uma relação diretamente proporcional entre tons avermelhados e conteúdo de proteoglicanos (Figura 5).

**Figura 5** - Fotomicrografia das lâminas coradas com Safranina (vermelho).

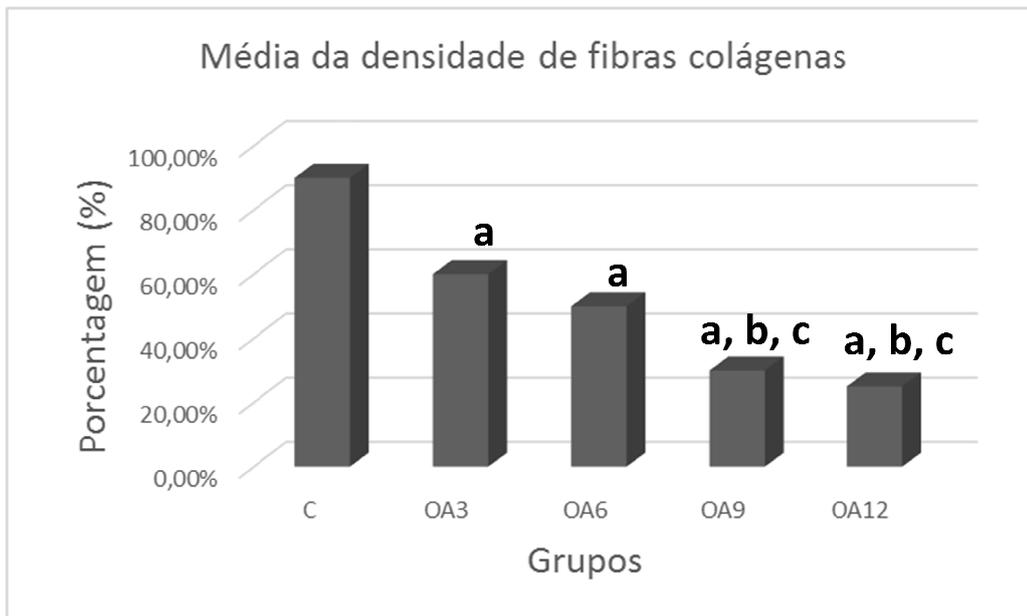


Legenda: Quanto maior a intensidade do corante vermelho, maior a quantidade de proteoglicanos. Na figura pode ser observado a redução da quantidade de proteoglicanos ao longo da evolução da osteoartrite. Observe a coloração intensa dos condrócitos nos grupos pós transecção indicativo de aumento do metabolismo (setas) (Aumento de 200x) (Barra = 100  $\mu$ m).

## 5.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA DENSIDADE DE FIBRAS COLÁGENAS

Na avaliação da densidade de fibras colágenas, observou-se uma redução gradual da densidade de fibras colágenas ao longo da evolução da osteoartrite, porém sem diferença significativa entre o grupo OA9 e OA12. Os grupos OA3 e OA6 apresentaram diferença entre o grupo C (OA3 e C,  $p=0.01$ ; OA6 e C,  $p=0.01$ ), porém não apresentaram diferença entre si (OA3 e OA6,  $p=0.11$ ). Já o grupo OA9 apresentou diferença entre todos os grupos (OA9 e C,  $p=0.01$ ; OA9 e OA3,  $p=0.01$ ; OA9 e OA6,  $p=0.01$ ), com exceção do grupo OA12 (Figura 6).

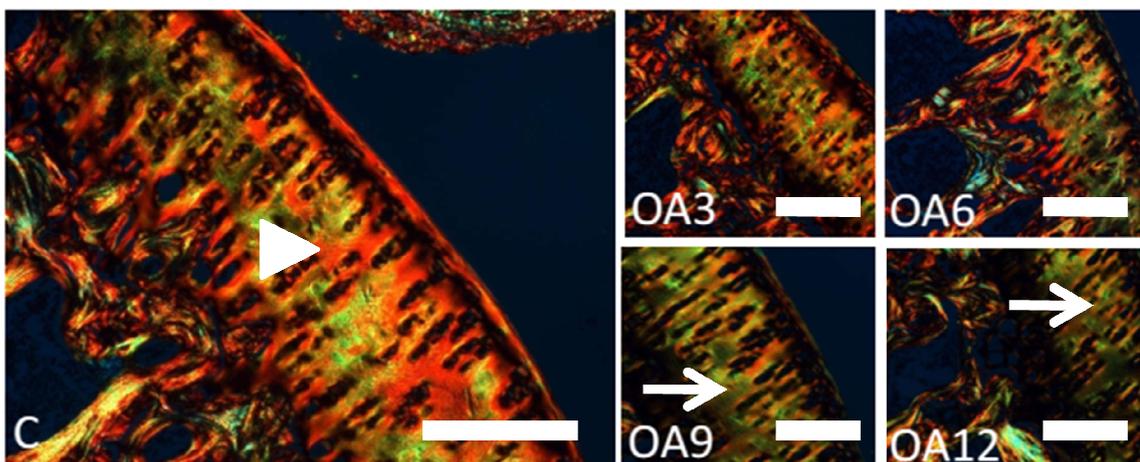
**Figura 6** - Representação gráfica da média da densidade de fibras colágenas dos grupos.



Legenda: a  $p < 0,05$  diferem de C; b  $p < 0,05$  diferem de AO3; c  $p < 0,05$  diferem de AO6.

Segue abaixo figura ilustrando a redução da densidade de fibras colágenas ao longo da evolução da OA. Os tons alaranjados indicam alta densidade de fibras colágenas e os tons esverdeados indicam baixa densidade de fibras colágenas (Figura 7).

**Figura 7** - Fotomicrografia das lâminas coradas com Picrosirius Red.



Legenda: Os tons alaranjados indicam alta densidade de fibras colágenas (cabeça de seta) e os tons esverdeados indicam baixa densidade de fibras colágenas (setas). (Aumneto de 200x) (Barra = 100  $\mu$ m).

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo investigou a evolução da OA em joelhos de ratos submetidos à TLCA em quatro momentos pós-lesão. Como esperado, constatou-se que a lesão articular evoluiu de forma lenta e progressiva, verificado por meio da diminuição tanto no conteúdo de proteoglicanos, quanto na densidade das fibras colágenas. Vale ressaltar, que a gravidade da degeneração articular foi mais proeminente nas articulações dos animais expostos ao maior tempo de estímulo lesivo (OA12).

Gerwin et al. (2011) sugerem que os trabalhos com modelos experimentais de OA por indução cirúrgica, utilizem animais esqueleticamente maduros (12 semanas de idade ou mais) para imitar o desenvolvimento da OA em humanos. Contudo, os ratos aqui descritos encontram-se nessa faixa etária no momento do ato cirúrgico.

Estudos indicam, que diante das cargas anormais impostas às articulações, os condrócitos alteram sua taxa metabólica em resposta ao processo artrótico, assim, inicialmente observa-se clones de condrócitos, condrócitos hipertrofiados, aumento da espessura do tecido articular (maior síntese de componentes da MEC) e desorganização celular (PRITZKER et al., 2007). Além do mais, a presença de fibrilações, osteófitos marginais e perda de proteoglicanos nos joelhos de ratos após 4 a 12 semanas da TLCA, são outros indicativos da fase inicial da lesão (FERRÁNDIZ et al., 2014; GERWIN et al, 2011). Dessa forma, os resultados observados sugerem que 3 e 6 meses pós TLCA, a redução no conteúdo de proteoglicanos encontra-se compatível à um grau de OA inicial, uma vez que esses grupos apresentaram redução leve na coloração por *Safranina*. Já o grupo AO9 apresentou um grau mais avançado de lesão, devido à perda moderada do corante, representando um avanço na diminuição de proteoglicanos.

Outros estudos também corroboram com os achados. Segundo Wyatt et al. (2017), a diminuição do conteúdo de proteoglicanos é uma das primeiras anormalidades detectáveis em um processo degenerativo articular e precede os sinais macroscópicos de deteriorização da superfície articular. Santos et al. (2014), além de observarem diminuição leve do corante Safranina na cartilagem articular de ratos com 5 semanas após TLCA, relataram aumento na espessura da cartilagem articular associado à presença de hiper celularidade, atribuídos ao aumento do metabolismo articular. Desta forma, os resultados deste trabalho (Figura 5) mostraram coloração intensa nas lacunas ocupadas pelos condrócitos, mesmo com redução do corante *Safranina* indicador das proteoglicanos ao longo da MEC, demonstrando o intenso metabolismo destas células.

Quanto aos estágios mais avançados do processo degenerativo, é relatada a presença de hipocelularidade, diminuição da espessura da MEC e substituição da cartilagem articular por fibrocartilagem, achados que estão relacionados ao evento de morte celular (condrócitos) por apoptose, sendo que após 12 meses da TLCA pode ocorrer perda total do tecido cartilaginoso somado a esclerose do osso subcondral (GERWIN et al., 2011; DIAS et al., 2012; RENNERT et al., 2006). Portanto, a intensa perda da coloração por Safranina observada nos animais do grupo OA12 encontra-se relacionada a um grau mais avançado de OA.

Wyatt et al. (2017) ao estudarem 143 joelhos humanos após cirurgia de artroplastia indicada devido a OA em fase terminal, também demonstraram por meio do *score de Mankin* que os estágios avançados de degeneração articular apresentam intensa perda do conteúdo de proteoglicanos, além de inflamação (sinovite) mediada por IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  (citocinas pró-inflamatórias que estimulam o catabolismo), presença de fibrocartilagem e esclerose do osso subcondral.

Como parte da fisiopatologia da OA, o colágeno, um dos principais componentes da MEC sofre ruptura de suas fibras, o que representa um evento crítico para a evolução do processo degenerativo, uma vez que na articulação o remodelamento da rede colágena ocorre de forma muito lenta. Ao se iniciar um estímulo lesivo, tem-se a interrupção do equilíbrio metabólico da cartilagem articular, assim, as alterações referentes à degradação das fibras colágenas ocorreria após o início da perda do conteúdo de proteoglicanos, fato que contribui para maior comprometimento das propriedades biomecânicas do tecido propiciando maior atividade das colagenases e consequente diminuição na densidade da rede colágena (FERRÁNDIZ et al., 2014; VASILCEAC et al., 2010).

Alguns autores correlacionam a densidade das fibras de colágeno com alguns tipos específicos, em que o colágeno tipo II – fibra grossa (mais abundante na MEC saudável) indicaria uma maior densidade, já os tipos X e IX (relacionados a fibrinogênese) – fibras finas, representariam menor densidade e portanto, estariam presentes no remodelamento referente ao dano articular (VELOSA et al., 2003). O remodelamento das fibras colágenas ocorre em função da síntese pelos condrócitos de enzimas catabólicas como a MMP13, após sinalização autócrina decorrente de citocinas pró inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$ , como relatado nos estudos de Santos et al. (2014) e Ferrándiz et al. (2014).

Os resultados aqui apresentados indicam que 3 e 6 meses após a TLCA constatou-se uma diminuição na densidade total das fibras colágenas e ocorreu um avanço dessa perda nos períodos posteriores. Porém, como não houve diferença entre os grupos OA9 e OA12, embora os animais do grupo 12 meses tenham apresentado menor quantidade de proteoglicanos em

comparação aos do grupo 9 meses, é possível que em um tempo pós-operatório superior à 12 meses possa ser observado uma maior diminuição na densidade das fibras colágenas. Santos et al. (2014) não observaram alteração na densidade do colágeno 8 semanas pós lesão, embora tenham observado diminuição na conteúdo de proteoglicanos, o que indica a linearidade de primeiro ocorrer degradação da glicoproteína e posteriormente iniciar as alterações na rede colágena.

É consenso na literatura, que um modelo experimental de OA para ser utilizado em pesquisas de intervenções terapêuticas deve apresentar uma taxa de progressão da lesão de leve a moderada com duração suficiente para o desenvolvimento de lesões robustas, permitindo a diferenciação entre os grupos de tratamento (GERWIN et al., 2011). Logo, o modelo de TLCA se enquadra nestes requisitos, já que 3 e 6 meses pós lesão observa-se uma degeneração leve que evolui para graus moderado e intenso nos respectivos períodos de 9 e 12 meses. Ao mesmo tempo, a avaliação de *Mankin* para proteoglicanos e a avaliação do *Picrosirius Red*, foi sensível para identificar as alterações referentes à diminuição do conteúdo da glicoproteína e alteração na densidade das fibras de colágeno em momentos distintos da evolução da OA no modelo utilizado, inclusive demonstrando a intensificação da degeneração nos grupos tardios.

No entanto, ressalta-se a tendência fisiológica de ratos com idade a partir de 10-12 meses apresentarem uma perda gradativa de condrocitos inerente ao início da senilidade e consequentemente, uma menor expressão dos componentes da MEC. Ainda, é descrito achados referentes ao início do processo degenerativo em grupos controle *shan*, atribuídos ao processo inflamatório gerado pela incisão cirúrgica e violação da cápsula articular sem que ocorra a lesão do ligamento cruzado anterior (FERRÁNDIZ et al., 2014). Desse modo, não podemos garantir que os resultados apresentados estejam relacionados somente à instabilidade articular decorrente da transecção do ligamento, como também não podemos descartar que a perda intensa do conteúdo de proteoglicanos no grupo OA12 esteja relacionada à sobreposição de estímulos decorrentes tanto da senilidade como da instabilidade articular.

Como perspectivas futuras, tendo em vista que a lesão do ligamento cruzado anterior é um fator de risco para a OA do joelho e o modelo experimental de TLCA induz alterações articulares análogas às observadas na OA humana pós-traumática (AMIN et al., 2008), considerando que a ruptura do ligamento cruzado anterior é uma lesão comum entre os atletas, acreditamos que os tempos de 3 a 6 meses pós TLCA seja suficiente para o delineamento experimental de estudos futuros com métodos terapêuticos iniciados logo após a cirurgia objetivando a prevenção da degeneração articular em relação à perda de proteoglicanos. Já o

uso de ratos com evolução de 9 e 12 meses da TLCA estão reservados para estudos que apresentem como variável respectivamente perda moderada e intensa de conteúdo de proteoglicanos característicos de lesões articulares em início de fase avançada e fase avançada.

Por fim, para os estudos que pretendam avaliar terapêuticas com capacidade de impedir o remodelamento das fibras de colágeno (suplementação de colágeno tipo II ou sulfato de condroitina), a sugestão é que utilizem os grupos controles de lesão considerando que 3 a 6 meses há redução inicial na densidade do colágeno que tende a se acentuar nos tempos de 9 e 12 meses pós TLCA.

## 7 LIMITAÇÕES

Diante do exposto, é limitação nesse estudo ausência de grupos controles *shan* nos respectivos tempos pós-operatório com intuito de escalonar o quando do processo inflamatório inerente ao procedimento cirúrgico (incisão da pele/fáscias/músculos e invasão da cápsula articular) influenciou na observação dos resultados encontrados.

## 8 CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos e resultados obtidos conclui-se que a OA evoluiu de forma lenta e gradual no modelo experimental por TLCA, sendo que a gravidade da degeneração articular foi mais proeminente nas articulações dos animais com maior tempo pós TLCA (OA12). Em relação ao conteúdo de proteoglicanos, a constatação de perdas leve do corante Safranina nos grupos AO3 e AO6 são compatíveis com as alterações histológicas presentes na fase inicial da lesão articular. Diante da persistência do estímulo lesivo, ocorreu aumento da perda do conteúdo de proteoglicanos nos grupos AO9 e AO12 caracterizando degeneração articular em estágios mais avançados que se correlacionam com alterações nos componentes da MEC. Quanto ao colágeno, a diminuição na densidade das fibras colágenas a partir de 3 meses da TLCA que tende a se acentuar nos períodos posteriores é indicativo da ocorrência do remodelamento da rede colágena frente ao processo artrósico.

Contudo, recomendamos estudos futuros que quantifiquem de forma mais específica a depressão do colágeno tipo II na cartilagem articular durante a evolução da OA, a fim de complementar as metodologias que fazem uso apenas da quantificação da densidade colágena por Picro Sirius Red. Como continuidade do estudo, está previsto a complementação destes resultados com análises histológicas por método amplamente usado na literatura (Avaliação Histológica da *OARSI - Osteoarthritis Research Society International*), para melhor determinação do grau de degeneração articular nos respectivos tempos pós TLCA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGNER, T.; SOEDER, S.; HAAG, J. IL- 1 and BMPS: Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **Eur Cell Mater**, v. 12, p. 49-56, 2006. DOI: 10.22203/eCM.v012a06.

ALFORD, J.W.; COLE, B.J. Cartilage Restoration, Part 1. **American Journal of Sport Medicine**, v.33, 2005. DOI:10.1177/0363546504273510.

AMIN, S.; GUERMAZI, A.; LA VALLEY, M.P. et al. Complete anterior cruciate ligament tear and the risk for cartilage loss and progression of symptoms in men and women with knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.16, p. 897–902, 2008. DOI: 10.1016/j.joca.2007.11.005.

APPLETON, C.T.G.; McERLAIN, D.D.; PITELKA, V. et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. **Arthritis Research e Therapy**, v.9, p. 1-15, 2007. DOI: 10.1186/ar2120.

BENDELE, A. M. Animal models of osteoarthritis. **J. Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 1, n. 4, p. 363-376, 2001.

BENNEL K. L.; WRIGLEY T. V.; HUNT M.A., et al. Update on the Role of Muscle in the Genesis and Management of Knee Osteoarthritis. **Rheum Dis Clin. N Am**, v.39; p.145–176, 2013. DOI: 10.1016/j.rdc.2012.11.003

BREEDVELD, F.C. Osteoarthritis – the impact of a serious disease. **Rheumatology**, v. 43, p. 14-18, 2004. DOI: 10.1093/rheumatology/keh10v2.

CASTROGIOVANNI, P.; MUSUMECI, G. Which is the Best Physical Treatment for Osteoarthritis? **Journal of Functional Morphology and Kinesiology**, v. 1, n. 1, p. 54-68, 2016. DOI: 2411-5142/1/1/54.

CARTER, D.R.; BEAUPRÉ, G.S.; WONG, M. et al. The mechanobiology of articular cartilage development and degeneration. **Clin Orthop**, v. 427, p. 69-77, 2004. DOI: 10.1097/01.blo.0000144970.05107.7e.

DIAS CNK, RENNER AF, SANTOS AA, VASILCEAC FA, MATTIELLO SM. Progression of articular cartilage degeneration after application of muscle stretch. **Connective Tissue Research**. n.1, v.53, p. 39-47. 2012. <https://doi.org/10.3109/03008207.2011.610476>

FAVERO, M.; RAMONDA, R.; GOLDRING, M.B. et al.. Early knee osteoarthritis. **RMD. Open**, p. 8. 2015. <http://dx.doi.org/10.1136/rmdopen-2015-000062>

FERRÁNDIZ, M. L.; TERCENIO, M. L.; RUHÍ, R. Influence of age on osteoarthritis progression after anterior cruciate ligament transection in rats. **Experimental Gerontology**, v. 55, p. 44-48, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.010>.

FLIK, K. R.; VERMA, N.; COLE, B. J.; BACH Jr., B. R. Articular Cartilage. Structure, Biology, and Function. In: WILLIAMS III, R. J. (Ed.) **Cartilage Repair Strategies**. New Jersey: Humana Press, 2007. c. 1, p. 1-12.

GERWIN N., BENDELE A.M, GLASSON S. et al. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, p. 24-34, 2011. doi: 10.1016/j.joca.2010.05.030.

GROESSL, E. J.; KAPLAN, R. M.; CRONAN, T. A. Quality of well-being in older people with osteoarthritis. **Arthritis Reum**, v. 49, p. 49-23, 2003. DOI: 10.1002/art.10903.

KUYINU, E.L. et al. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. **Journal of orthopaedic surgery and research**, v. 11, n. 1, p. 1, 2016. DOI: 10.1186/s13018-016-0346-5.

LEITE, et al. Comorbidades em pacientes com osteoartrite: frequência e impacto na dor e na função física. **Rev Bras Reumatol**, v. 2, n. 51, p. 113-123, 2011. ISSN 0482-5004.

LEONG, D. J. et al. Nutraceuticals: potential for chondroprotection and molecular targeting of osteoarthritis. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 11, p. 23063-23085, 2013. DOI: 10.3390/ijms141123063.

LITTLE, C. B.; ZAKI, S. What constitutes an “animal model of osteoarthritis”–the need for consensus? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 4, p. 261-267, 2012. DOI: 10.1016/j.joca.2012.01.017 10.1016/j.joca.2012.01.017.

LYONS, T.J.; SHEENA, F. McC.; BUCKWALTER, J.A.; et al. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 7, n. 52, 2006. DOI: 10.1186/1471-2474-7-52.

MANKIN, H.J.; DORFMAN, H.; LIPPIELLO, L.; et al. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. **J Bone Joint Am**, v. 53, p. 523-537, 1971. PMID: 5580011.

PRITZKER, K.P.H.; GAY, S.; JIMENEZ, S.A. et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, p. 13-29, 2006. DOI:10.1016/j.joca.2005.07.014.

RENNER, A.F.; CARVALHO, E; Soares, E.; MATTIELLO, S.M. The effect of a passive muscle stretching protocol on the articular cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 14, p. 196-202, 2006. DOI:10.1016/j.joca.2005.08.011.

THOMA, C.M.; FULLER, C.J.; WHITTLES, C.E. et al. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, p. 27-34, 2007. DOI:10.1016/j.joca.2006.06.012.

SANTOS, A.A; OLIVEIRA, P.; FERNANDES, K.R. et al. Effects of low-level laser therapy on cartilage repair in an experimental model of osteoarthritis. **Photonics and Lasers in Medicine**, v. 3, p. 255-264, 2014. DOI: 10.1515/plm-2013-0063.

SHARMA, L. Osteoarthritis year in review 2015: clinical. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 1, p. 36-48, 2016. DOI: 10.1016/j.joca.2015.07.026.

SZAFRANKI, J.D.; GRODZINSKY, A.J.; BRUGER, E.; et al. Chondrocyte mechanotransduction: effects of compression on deformation of intracellular organelles and relevance to cellular biosynthesis. **Osteoarthritis and cartilage**, v.12, p. 937-46, 2004. DOI:10.1016/j.joca.2004.08.004.

VASILCEAC, F.A.; RENNER, A.F.; TEODORO, W.R. et al. The remodeling of collagen fibers in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol. **Rheumatol Int**, 2010. DOI: 10.1007/s00296-010-1371-z.

VELOSA, A.P.P.; TEODORO, W.R.; YOSHINARI, N.H. Colágeno na cartilagem osteoartrosica. **Revista Brasileira de reumatologia**, v.43, p. 160-166, 2003. ISSN 0482-5004.

YASUDA, T. Cartilage destruction by matrix degeneration products. **Med Rheum**, v. 16, p. 197-205, 2006.

WILLIAMS, J.M.; FELDEN, D.L.; PETERSON, R.G. et al. Effects of surgically induced instability on rat Knee articular cartilage. *J Anat*, v. 134, p. 103-109, 1982. DOI: 10.1007/s10165-006-0490-6.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, L. A.; SZUKIEWICZ, D. The role inflammatory and anti-inflammatory cytokines pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators of inflammation**. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/561459>

WYATT, L.A.; MORETON, B.J.; MAPP, P.I. et al. Histopathological subgroups in knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, p. 14-22, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2016.09.021>.

## ANEXO A



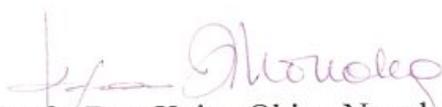
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propg@power.ufscar.br](mailto:propg@power.ufscar.br) - [www.propg.ufscar.br](http://www.propg.ufscar.br)

**Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal**  
**nº 021/2010**

Protocolo nº. 021/2010

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos - CEEA/UFSCar em sua 42ª. Reunião **APROVOU** o projeto "Efeito do exercício resistido na cartilagem articular de ratos submetidos a transecção do ligamento cruzado anterior" apresentado pelo pesquisador Fernando Augusto Vasilceac.

São Carlos, 18 de maio de 2010.

  
Profª. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal