



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E
SAÚDE PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

EDGAR TOLEDO DE AGUIAR JÚNIOR

**ANÁLISES HISTOLÓGICAS E IMUNOCELULARES EM JOELHOS DE
RATOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA APÓS USO DE
CLODRONATO LIPOSSOMA**

ARAGUAÍNA-TO
2020

EDGAR TOLEDO DE AGUIAR JÚNIOR

**ANÁLISES HISTOLÓGICAS E IMUNOCELULARES EM JOELHOS DE
RATOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA APÓS USO
CLODRONATO LIPOSSOMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação como requisito para obtenção do grau de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, da Universidade Federal do Tocantins,

Orientador: Prof. Dr. Sandro Estevan Moron

ARAGUAÍNA-TO
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

A282a Aguiar Júnior, Edgar Toledo de.

Análises histológicas e imunocelulares em joelhos de ratos com osteoartrose induzida após uso clodronato lipossoma. / Edgar Toledo de Aguiar Júnior. – Araguaína, TO, 2020.

50 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2020.

Orientador: Sandro Estevan Moron

1. Osteoartrose. 2. Biomarcadores de degradação de cartilagem.
3. Degeneração articular. 4. Mediadores inflamatórios. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E
SAÚDE PÚBLICA NOS TRÓPICOS**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Mestrado do candidato Edgar Toledo de Aguiar Júnior, realizada em 18/09/2020:

Prof. Dr. Sandro Estevan Moron, orientador, UFT

Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova, examinador, UFT

Profa. Dra. Clarissa Amorim Silva de Cordova, examinadora, UFT

DEDICATÓRIA

A Deus, por estar sempre comigo e nunca ter me deixado desistir, sem ele nada teria ocorrido.

Aos meus pais, Edgar e Inês, pelo exemplo de caráter e retidão.

A minha amada Carol pelo apoio incondicional, pela dedicação e companheirismo.

Aos meus filhos, Edgar, Laura e Stefano, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência dedicados a este trabalho

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Sandro Estevan Moron pela amizade, apoio e pelos ensinamentos compartilhados durante o desenvolvimento desse trabalho

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a Prof. Nádia Regina Stefanine pelo apoio e ensinamentos com o manejo dos animais.

À Faculdade Católica Dom Orione pela doação dos animais utilizados no experimento.

As Técnicas Liana e Gil do laboratório de Morfofisiologia da Faculdade de Medicina da UFT, pelo apoio técnico e pelos ensinamentos.

À aluna da iniciação científica Alana, por ter me auxiliado na árdua tarefa da realização e avaliação dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Raphael Ferreira pela amizade, orientação e ensinamentos.

Ao amigo Flávio Lacerda, pela amizade, pelo apoio e pelo suporte para aquisição de alguns insumos.

Aos colegas dos serviços de Ortopedia e Traumatologia do Hospital Regional de Araguaína e Hospital Maternidade Dom Orione pelo apoio e companheirismo, compreendendo minha ausência, nos momentos em que me encontrava imerso na realização deste trabalho.

RESUMO

A osteoartrite de joelho é uma das doenças que mais causa incapacidade no mundo. Apresenta fisiopatologia complexa, onde uma série de interações mecânicas e inflamatórias promovem a destruição da superfície articular, sinovite, rigidez e perda de função. O diagnóstico é baseado em sinais clínicos e de imagem, geralmente é tardio e em fases onde o processo já se encontra irreversível. O objetivo de nosso estudo foi analisar comparativamente, alterações da cartilagem articular em joelhos de ratos com osteoartrite induzida que receberam infiltração intra-articular de clodronato revestido em lipossoma, procurando correlacionar as alterações estruturais precoces da cartilagem articular com a concentração de um biomarcador sérico da degradação do colágeno tipo II, da presença no soro da citocina Interleucina 10 (IL-10) e identificar os possíveis efeitos benéficos e preventivos na osteoartrite por meio da inativação dos macrófagos da superfície da sinóvia. Foram utilizados nos experimentos 21 ratos Wistar, divididos em 3 grupos. Um grupo designado de controle, não recebeu nenhum tipo de tratamento, nos outros 2 grupos se induziu a osteoartrose (OA) por meio da transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). Nos grupos submetidos a TLCA, um grupo (n=7) recebeu infiltração intra-articular no joelho de clodronato revestido em lipossoma e no outro grupo (n=7) solução fisiológica, estes procedimentos ocorreram sete dias anteriores ao procedimento cirúrgico. Durante o experimento amostras de sangue foram colhidas para avaliações laboratoriais, no sétimo e no vigésimo primeiro dia de pós-operatório (PO), quando os animais foram eutanasiados e coletado material para histologia. Os resultados identificaram que o biomarcador de degradação da matriz extracelular não foi capaz de identificar as alterações precoces na cartilagem no tempo adotado para o experimento, que não foi possível determinar concentrações significativas de IL-10 sistêmica neste período, que a técnica empregada na indução osteoartrose é uma metodologia adequada a este tipo de estudo, e que a histologia tem papel fundamental na identificação das alterações iniciais de implantação da osteoartrite. Achado importante a ser destacado é que o uso do clodronato lipossoma parece ter um efeito protetor sobre a cartilagem articular.

Palavras Chaves: Osteoartrite, Joelho, Clodronato lipossoma, Telepeptídeo C, Interleucina 10, Histologia, degeneração articular.

ABSTRACT

The knee osteoarthritis is one of the most disabling diseases in the world. It presents complex pathophysiology, where a series of mechanical and inflammatory interactions promote the destruction of the joint surface, synovitis, stiffness and loss of function. The diagnosis depends of clinical and imaging signs, it is usually late and at a stage where the process has already irreversible. The aim of our study was to comparatively analyze changes in articular cartilage in the knees of rats with induced osteoarthritis that received intra-articular infiltration of liposome-coated clodronate, seeking to correlate the early structural changes in articular cartilage with the concentration of serum degradation biomarker collagen, the presence in the serum of the cytokine Interleukin 10 (IL-10) and to identify the possible beneficial and preventive effects in osteoarthritis by inactivating macrophages on the surface of the synovium. Twenty-one Wistar rats were used in the experiments, divided into 3 groups. One group, designated as control, did not receive any type of treatment, the other 2 groups induced osteoarthritis (OA) through transection of anterior cruciate ligament (TLAC). In the groups submitted to TLAC, one group (n = 7) received intraarticular knee infiltration with clodronate liposome and the other group (n = 7) received saline solution, these procedures occurred seven days before the TLAC surgical procedure. During the experiment, blood samples were collected for laboratory evaluation on the seventh day and on the twenty-first postoperative day (PO) when the animals were euthanized and material for histology was collected. The results identified that the extracellular matrix degradation biomarker was not able to identify early changes in cartilage in the time adopted for the experiment, that it was not possible to determine significant concentrations of IL-10 systemic in this period, that the technique employed in inducing osteoarthritis is adequate methodology for this type of study, and that histology has a fundamental role in the identification of the initial changes in the implantation of osteoarthritis. An important finding to be highlighted is that the use of liposome clodronate seems to have a protective effect on articular cartilage.

Keywords: Osteoarthritis, Knee, Liposome clodronate, Telepeptide C, Interleukin 10, Histology, Joint degeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – CORTE LONGITUDINAL JOELHO ESQUERDO.	27
FIGURA 2 - INSPEÇÃO DOS MEMBROS INFERIORES 21PO.	29
FIGURA 3 GRÁFICO COM VALORES ABSOLUTOS DOS LEUCÓCITOS AOS 7º E AO 21º PO.	31
FIGURA 4 GRÁFICO COM CONTAGEM DIFERENCIAL DOS LEUCOCITOS.	31
FIGURA 5- DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE CTXII 7 E 21 PO	32
FIGURA 6- CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE CTXII POR GRUPO	33
FIGURA 7- CONCENTRAÇÃO DE IL 10 , NO 21PO NOS DIVERSOS GRUPOS ESTUDADOS.	33
FIGURA 8-ESPESSURA TOTAL DA CARTILAGEM ARTICULAR	34
FIGURA 9- LÂMINA CORTE FRONTAL JOELHO HISTOPATOLOGIA	36
FIGURA 10- LÂMINA DEMONSTRANDO A ORTOCROMASIA .	36
FIGURA 11- DISTRIBUIÇÃO DA CLASSIFICAÇÃO DA CELULARIDADE	37
FIGURA 12- CORTE CORONAL DA SUPERFÍCIE ARTICULAR PADRÕES DE CELULARIDADE ENCONTRADOS.	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- VALORES MÉDIOS COM DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS ENCONTRADOS AO 7PO E 21 PO.....	30
TABELA 2- CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PARA OSTEOARTRITE SEGUNDO CRITÉRIOS OARSI.....	35

Sumário

CAPÍTULO I	13
1 REFERENCIAL TEÓRICO	14
CAPÍTULO II	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 METODOLOGIA	23
2.1 ANIMAIS	23
2.2 CLODRONATO ENCAPSULADO POR LIPOSSOMOS	23
2.3 INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE	24
2.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DA DEGRADAÇÃO DE CARTILAGEM	25
2.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	26
2.6 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	28
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3 RESULTADO	28
3.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	29
3.2 ANÁLISE IMUNOENZIMÁTICA	31
3.2.1 CTX-II	31
3.2.2 IL-10	33
3.3 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	34
3.3.1 Espessura da Cartilagem Articular	34
3.3.2 Avaliação Histológica da Osteoartrite	34
3.3.3 Avaliação da Celularidade	36
4 DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS	44
ANEXO I	51
ANEXO II	52

CAPÍTULO I

1 REFERENCIAL TEÓRICO

A osteoartrite (doença articular degenerativa, artrose ou osteoartrose, OA) é a doença do aparelho musculoesquelético mais prevalente entre indivíduos senis. Atualmente, vivemos mais que nossos ancestrais e, pela primeira vez na história, o número de pessoas com 65 anos ou mais, ultrapassa o das crianças com menos de 5 anos, e o número de pessoas com 60 anos ou mais deve dobrar até 2050 e mais do que triplicar até por volta de 2100, segundo dados das Nações Unidas (UNITED NATIONS, DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, POPULATION DIVISION, 2015).

Estando principalmente relacionada ao envelhecimento, a prevalência de OA aumentará constantemente e espera-se que seja a maior causa de incapacidade na população em geral até 2030 (THOMAS; PEAT; CROFT, 2014). Estudos americanos apontam que mais de 50 milhões de pessoas apresentam, hoje, essa enfermidade (COIMBRA et al., 2002). A doença afeta 5,2% da população brasileira, o que corresponde a 9,9 milhões de brasileiros, iniciando em pacientes acima dos 40 anos de idade, mais frequentemente na população acima dos 60 anos (COIMBRA; REZENDE; PAPLER, 2012).

A OA é caracterizada por deterioração progressiva da cartilagem que envolve principalmente articulações de suporte de peso, como joelhos e quadris, resultando em danos ao osso subcondral, diminuição ou perda da mobilidade, dores nas articulações, rigidez articular e inflamação. Dor é a manifestação clínica central da OA. O diagnóstico é feito por meio dos sinais clínicos e confirmados pelos exames de imagem, onde os achados mais frequentes são redução do espaço articular, esclerose subcondral, cistos subcondrais e osteófitos (LANE et al., 2004).

Acomete as articulações por insuficiência de restauração e renovação da cartilagem, ocasionada por um desequilíbrio entre a formação e a destruição dos seus principais elementos, associada a uma variedade de condições, tais como: sobrecarga mecânica, alterações bioquímicas da cartilagem e membrana sinovial e fatores genéticos (COIMBRA et al., 2002).

A cartilagem é um tecido hipocelular, e os condrócitos representam apenas 1 a 2 % de seu volume total. Sua matriz extracelular abundante é altamente hidratada e especialmente diferenciada para adaptar-se às funções biomecânicas do tecido.

Mais de 70% do peso da cartilagem é água, e mais de 90% do seu peso seco corresponde aos dois principais componentes de sua matriz extracelular (MEC), o colágeno tipo II e o agrecan. Diversas outras moléculas fazem parte da organização da MEC da cartilagem, e incluem, por exemplo, colágenos menores (tipo IX, XI, VI, X, XII e XIV), outros proteoglicanos (decorina, biglican, perlecan, versican), ácido hialurônico, proteína de ligação, COMP, tenascina, fibronectina, dentre outras (GOLDRING S.R et al., 2007). A cartilagem possui uma estrutura heterogênea, com quatro regiões reconhecíveis: a zona superficial ou tangencial, a zona média ou de transição, a zona profunda ou radial, e a cartilagem calcificada (VOLPI N., 2006).

Embora considerada classicamente como uma doença mecânica, a inflamação hoje possui papel central na etiopatogenia da OA (ATTUR et al., 2002). Estudos de mediadores pró-inflamatórios encontrados na articulação osteoartrósica apoiam o paradigma de que, embora a OA possa ser em parte uma doença biomecânica, suas manifestações ao nível dos tecidos são mediadas pela atividade de fatores inflamatórios. A OA pós-traumática é um exemplo de uma forma da patologia em que a inflamação aguda induzida por uma lesão articular e uma biomecânica anormal resultante de instabilidade parecem trabalhar em conjunto para promover a destruição comum do tecido. A lesão do menisco, por si só, ou em combinação com ruptura do ligamento cruzado anterior (LCA), é um importante fator de risco para OA do joelho. Estudo de tecido meniscal removido durante meniscectomia parcial em pacientes com lesão do menisco, com ou sem uma ruptura concomitante do LCA, forneceu evidências de que o menisco lesionado pode ser uma fonte de mediadores inflamatórios na articulação (BROPHY et al., 2012). Numerosas citocinas, quimiocinas, e proteinases degradantes de matriz foram consideradas expressas em amostras de menisco, incluindo IL-1 α e β , IL-6, TNF- α , CCL3, CXCL1, CXCL3, ADAMTS-4 e -5, MMP-1, MMP-9 e MMP-13 (LOESER, 2013). De maneira geral na OA, as primeiras mudanças ocorrem na superfície da articulação em áreas onde as forças mecânicas, como a tensão de cisalhamento, são maiores (ANDRIACCHI et al., 2004). O estresse mecânico estimula os condrócitos normalmente quiescentes, a sofrerem uma mudança fenotípica e tornar-se células "ativadas", caracterizadas por proliferação celular, formação de agrupamento e aumento da produção de proteínas da matriz e enzimas degradantes

da matriz, MMP e ADAMTS (Goldring et al, 2009). O produto da interação destas proteases e agrecanases com a MEC estimula a produção e ativação de mecanismos inflamatórios que novamente estimula os condrócitos gerando um ciclo contínuo. Um grande desafio é interromper o dano à cartilagem antes que a haja progressão, devido à incapacidade dos condrócitos residentes de regenerar uma matriz com as mesmas propriedades que a formada durante o desenvolvimento (Goldring et al, 2012).

A melhoria nos métodos de imagem, proporcionou um maior conhecimento sobre a patologia, determinando novos fenótipos demonstrando ser esta uma doença complexa, multi-tecidual, envolvendo cartilagem, osso subcondral e inflamação da sinóvia. A sinóvia pode apresentar alterações significativas, mesmo antes da degeneração visível da cartilagem, com infiltração de células mononucleares, espessamento da camada de revestimento sinovial e produção de citocinas inflamatórias (MATHIESSEN; CONAGHAN, 2017). Grande parte da ativação imune inata e da produção de citocinas na articulação com OA é atribuída aos macrófagos sinoviais, mas outras células, incluindo sinoviócitos e condrócitos, também desempenham papel no processo (SOKOLOVE; LEPUS, 2013). Os mecanismos subjacentes são complexos, mas é provável que moléculas da degradada cartilagem hialina liberadas na cavidade sinovial iniciem a inflamação sinovial na OA. Os sinoviócitos reagem produzindo mediadores pró-inflamatórios, que, por sua vez, atraem as células imunes, aumentam a angiogênese e induzem um deslocamento fenotípico nos condrócitos (GOLDRING, 2012). Segue-se um ciclo vicioso, à medida que os condrócitos produzem citocinas adicionais e enzimas proteolíticas que, eventualmente, aumentam a degradação da cartilagem e induzem uma inflamação sinovial adicional (BERENBAUM, 2013). Pesquisa envolvendo depleção dos macrófagos sinoviais em OA induzida por collagenases, demonstraram uma diminuição na geração de MMP, indicando um papel importante para os macrófagos sinoviais na ocorrência de dano da cartilagem mediada por estes agentes (BLOM et al., 2007).

Em particular, os proteoglicanos e o colágeno tipo II são os principais constituintes da cartilagem articular, e o colágeno tipo II é localizado quase exclusivamente na cartilagem (SARUKAWA et al., 2010). O colágeno tipo II é o principal componente da matriz extracelular da cartilagem e sua síntese e quebra

estão intimamente relacionadas ao metabolismo da cartilagem. Muitos estudos têm focado na síntese e degradação do colágeno tipo II para identificar marcadores bioquímicos para a OA. Várias pesquisas se concentraram nos fragmentos de clivagem do colágeno tipo II que são secretados durante a quebra da cartilagem. Um dos fragmentos mais estudados é o fragmento telopeptídico C do colágeno tipo II (CTX-II). A concentração de CTX-II no líquido sinovial foi relatada como sendo maior em pacientes com OA primária do joelho (diagnosticada por radiografia) do que em pessoas saudáveis. Também foi observado aumento da concentração de CTX-II na urina em pacientes com OA de quadril, mão, joelho, e isso pode ser usado como um marcador de prognóstico, pois o nível de CTX-II se correlaciona com o escore e progressão da doença (GARNERO et al., 2003; JUNG et al., 2004; MEULENBELT et al., 2006). Outro estudo de Rotterud et al. mostrou que pacientes com lesão de cartilagem focal do joelho têm concentrações mais altas de CTX-II urinária do que indivíduos saudáveis e a concentração de CTX-II diminui durante a reabilitação, sugerindo que o biomarcador CTX-II pode ser usado para monitorar os efeitos do tratamento (NGUYEN et al., 2017). Portanto, o telopeptídeo de ligação cruzada C-terminal urinário do colágeno tipo II (CTX-II) pode representar um potencial marcador específico para o metabolismo da cartilagem (CHRISTGAU et al., 2001; GARNERO et al., 2003).

Atualmente, não há consenso a respeito do tratamento ideal da osteoartrose. Vários métodos de tratamento tem sido adotados visando à melhoria da dor e do padrão funcional dos pacientes. Dentre esses métodos destacam-se os farmacológicos, os não farmacológicos (fisioterapia, terapia ocupacional, perda ponderal e exercícios), os agentes físicos, os de terapia alternativa (homeopatia, acupuntura e medicamentos fitoterápicos) e os cirúrgicos (BIJLSMA; BERENBAUM; LAFEBER, 2011; LOPES JÚNIOR; INÁCIO, 2013; ZHANG et al., 2010).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são considerados por muitos autores os medicamentos de primeira escolha para o tratamento medicamentoso da OA (TOWHEED; HOCHBERG, 1997), e tem se mostrado eficaz no alívio da dor e na melhora da função em pacientes com osteoartrose, sendo sua principal limitação o uso crônico. Seus potenciais efeitos adversos ao sistema gastrointestinal e cardiovascular são encontrados principalmente em pacientes idosos (GARNER et al., 2002).

A premissa empírica de que a administração de precursores da matriz extracelular pudessem ajudar os condrócitos a repor o tecido lesado, levou ao uso de glicosamina e da condroitina no tratamento da OA (VERBRUGGEN, 2006). Metanálise publicada no British Medical Journal em 2010, onde 3.803 pacientes fizeram uso de glicosamina e condroitina isoladas ou associadas em ensaios clínicos randomizados comparadas com o uso de placebo, não apresentaram relevância estatística seja na capacidade de promover melhora do quadro clínico seja na melhoria da evolução radiográfica (WANDEL; JÜNI; TENDAL; NÜESCH; VILLINGER; WELTON et al., 2010).

Outros fármacos utilizados incluem analgésicos, corticosteroides ou ácido hialurônico intra-articular, diacereína, insaponificáveis do abacate e soja, cloroquina e alguns tratamentos experimentais, nenhum dos quais registrado como modificador da estrutura (REZENDE; GOBBI, 2009).

Tanto o American College of Rheumatology (ACR) como a European League Against Rheumatism (EULAR) não reconhecem nenhuma droga como agente modificador de doença na OA (FRASER et al., 2003; ZHANG et al., 2010). Segundo a recomendação da EULAR, o sulfato de glicosamina é tido como a droga para a qual existe o maior nível de evidência e força de recomendação para seu uso (JORDAN et al., 2003).

Alguns métodos cirúrgicos têm sido propostos na tentativa de regenerar a cartilagem articular, mas todos estão associados a complicações, deixando muitos destes pacientes tratados inadequadamente. Quando não tratadas, as lesões da cartilagem podem progredir para defeitos mais extensos e, em última instância, podem evoluir para um procedimento cirúrgico de substituição articular, a artroplastia (KOH; CHOI, 2012).

Avanços na compreensão da fisiopatologia da osteoartrite, e a caracterização da importância de mediadores inflamatórios e marcadores bioquímicos de formação e degradação articular poderão propiciar, em um futuro próximo, diagnóstico precoce e eficiente que seja capaz de prever as alterações estruturais irreversíveis e ofertar terapêuticas direcionadas a alvos específicos.

CAPÍTULO II

ANÁLISES HISTOLÓGICAS E IMUNOCELULARES EM JOELHOS DE RATOS COM OSTEOARTROSE INDUZIDA APÓS USO CLODRONATO LIPOSSOMA

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é a forma mais comum de artrite, caracterizada por deterioração progressiva da cartilagem que envolve principalmente articulações de suporte de peso, como joelhos e quadris, resultando em danos ao osso subcondral, diminuição ou perda da mobilidade, dores nas articulações, rigidez articular e inflamação (COIMBRA et al., 2002).

Embora anteriormente tida como uma patologia degenerativa própria do envelhecimento, por uso e desgaste da articulação, a osteoartrose vem sendo considerada mais recentemente como uma doença inflamatória e de intensa atividade metabólica (ATTUR et al., 2002).

Estudos demonstram que a OA se comporta como uma doença auto inflamatória causada por respostas mediadas por condrócitos e sinoviócitos. A implantação da doença inflamatória promove a ativação da imunidade inata por meio da migração de células de defesa e liberação de citocinas e outros mediadores, um importante protagonista deste mecanismo são os macrófagos sinoviais (BONNET; WALSH, 2005; KONTTINEN et al., 2012). Fortes indícios evidenciam que a ativação da sinóvia representa importante papel na etiologia da doença, podendo ser constatado pelo grande acúmulo de macrófagos e alterações inflamatórias teciduais em um elevado número de pacientes com quadros iniciais de OA (BENITO et al., 2005). Como os macrófagos desempenham um papel crucial na orquestração de outras células e na implantação da imunopatogênese da OA, vários estudos investigaram se a saúde da cartilagem e a integridade das articulações se beneficiariam da inativação destes. A remoção de macrófagos de revestimento sinovial por injeção intra-articular de lipossomas carregados de clodronato diminuiu significativamente a expressão gênica de MMP-3 e MMP-9 na sinóvia, juntamente com a redução de TGF β mediador da formação de osteófito em um modelo de OA induzida por colagenase em camundongos (VAN LENT et al., 2004 ; BLOM et al., 2004, 2007).

Apesar dos avanços ocorridos com a utilização da ressonância magnética, principalmente em identificar e caracterizar as sinovites, não existem ainda técnicas

de diagnóstico sensíveis como a radiografia clássica; conseqüentemente, a OA frequentemente não é detectada antes de um estágio intermediário ou avançado, onde as alterações estruturais são irreversíveis (GLYN-JONES et al., 20015; BIJLSMA et al., 2011). A necessidade de métodos que sejam capazes de predizer os primeiros sinais de implantação da OA levou ao estudo de marcadores que pudessem informar tais alterações precocemente. Algumas moléculas estruturais e fragmentos derivados de osso, cartilagem articular e sinóvia, todos afetados pela OA, são candidatos a biomarcadores de OA (BLANCO,2014;HOSNIJEH ET AL.,2015;LOTZ et al.,2013). Os telopeptídeos C reticulados do colágeno tipo II (CTX-II); são produtos de degradação dos tecidos articulares, especialmente da matriz extracelular da cartilagem, e podem potencialmente prever a destruição da cartilagem articular na OA (ZUO et al, 2015; CHARNIE-BEM TABASSI et al 2003; VERMA P.,DALAL K., 2013; CLARK et al, 1999).

O tratamento clínico da OA permanece paliativo e pouco eficaz (CEPEDA et al., 2007). Nenhuma terapêutica produz o benefício sintomático da prótese articular de joelho ou quadril (BRANDT, 2004). Essa realidade representa um desafio para a pesquisa científica: compreender e explorar as diversas vias etiopatogênicas envolvidas na iniciação e progressão da doença, no sentido de desenvolver drogas capazes de modificar sua evolução natural. Compostos capazes de bloquear a ação de enzimas degradadoras da matriz extracelular e de citocinas inflamatórias, e de alterar o metabolismo ósseo, têm sido testados em animais e em estudos clínicos. Implícito no conceito de modificar a evolução da lesão estrutural estaria a ideia de que isto melhoraria os sintomas e qualidade de vida, o que porém não está completamente estabelecido (DIEPPE, 2005).

Apesar de os modelos experimentais em animais refletirem uma forma de OA secundária, estes possibilitam um monitoramento mais preciso da doença, tornando viável o estudo macroscópico, histológico, bioquímico e molecular da cartilagem em diferentes estágios da doença. Estudos utilizando modelos experimentais em animais, indiscutivelmente, fornecem dados importantes ao entendimento da fisiopatologia da OA e da ação terapêutica de diversas drogas.

O modelo de transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) em ratos, por meio de desestabilização articular cirúrgica gerada por instabilidade ligamentar apresenta alterações na cartilagem articular compatíveis com a OA humana

(WILLIAMS et al., 1982). O estudo da ação dos mecanismos inflamatórios e sua relação com a sinóvia, neste modelo de OA induzida, poderá ser importante fonte de conhecimento e fornecer potenciais novos alvos terapêuticos.

Baseado nesta premissa desenvolvemos um projeto de pesquisa que visa analisar comparativamente, alterações da cartilagem articular em joelhos de ratos com osteoartrite induzida que receberam infiltração intra-articular de clodronato revestido em lipossoma, procurando correlacionar as alterações estruturais precoces da cartilagem articular com a concentração de CTX-II sérico e identificar os possíveis efeitos benéficos e preventivos na osteoartrite por meio da inativação dos macrófagos da superfície da sinóvia.

2 METODOLOGIA

2.1 Animais

O modelo experimental *in vivo*, utilizou ratos adultos (*Rattus Novergicus Albinus*), linhagem Wistar. Os animais foram doados pelo biotério da Universidade Católica Dom Orione, transferidos para o laboratório de práticas do curso de medicina, aclimatados, manipulados e eutanasiados de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins (Processo: 23.101.003.524/2019-38). Os animais (n=21, 363 ± 119 g, ambos sexos), foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* e temperatura regulada a 21 ± 2°C, foram acompanhados durante todo o experimento para identificação de alterações tissulares ou presença de edemas nas articulações, pesados semanalmente. O montante total de animais foi dividido aleatoriamente em 3 grupos com 7 animais cada; sendo acomodados no máximo 3 indivíduos por gaiola. Cada grupo recebeu a seguinte denominação: a) CLO = animais submetidos a transecção do ligamento cruzado anterior do joelho e que receberam infiltração intra-articular de clodronato encapsulado em lipossoma; b) SF = animais submetidos a cirurgia, porém receberam infiltração intra-articular com soro fisiológico; c) controle CTR = composto por animais que não foram submetidos a cirurgia, mas receberam infiltração intra-articular com soro fisiológico.

2.2 Clodronato Encapsulado por Lipossomos

O uso intra-articular de clodronato encapsulado por lipossomos, é uma metodologia descrita e reconhecida (VAN ROOIJEN; SANDERS; VAN DEN BERG, 1996) pela capacidade de promover a depleção de macrófagos em nível da íntima da membrana sinovial. Quando estes lipossomos são injetados na articulação, eles são especificamente fagocitados pelos macrófagos do revestimento sinovial e não penetram nas camadas mais profundas da sinóvia (BLOM et al., 2007). Uma vez internalizado, o clodronato encapsulado é liberado intracelularmente e o macrófago

morre por apoptose (VAN ROOIJEN; SANDERS; VAN DEN BERG, 1996). Lipossomas carregados com clodronato foram injetados 7 dias antes da indução da OA experimental, pois a depleção ótima do revestimento da íntima é alcançada após 1 semana da infiltração intra-articular (BLOM et al., 2007). O fármaco utilizado foi o Clodrosome® seguindo as recomendações do fabricante (Encapsula Nano Sciences). Sete animais receberam a medicação por meio de artrocentese por punção paramediana e infiltração de 10 µl de clodrosome nos joelhos direitos. Os demais animais foram submetidos ao mesmo procedimento porém receberam 10 µl de solução fisiológica no lugar do clodrosome.

2.3 Indução da Osteoartrite

O modelo de indução à osteoartrose escolhido foi mediante transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA), de acordo com a metodologia modificada de Silva Júnior (2007). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados sete dias após a infiltração intra-articular: os animais foram anestesiados com Hidrocloridrato de Cetamina (40 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg), por via intramuscular. Após tricotomia e anti-sepsia da região, foi realizada uma incisão longitudinal na pele sobre o joelho direito, dissecação por planos e incisão parapatelar lateral, o tendão patelar rebatido medialmente, dando acesso à cavidade articular. Uma vez visualizado o ligamento cruzado anterior, o mesmo foi cuidadosamente seccionado com bisturi microcirúrgico evitando qualquer contato com a cartilagem articular. O livre movimento do fêmur em relação à tibia no sentido pósterio-anterior foi testado por meio do “sinal da gaveta” confirmando assim a secção do ligamento e instabilidade articular. O tendão patelar foi reposicionado, os planos mais profundos receberam sutura com fio absorvível (Vycril 5/0), e a pele foi suturada com Nylon® 4/0. Um total de 14 animais foram submetidos à transecção do ligamento cruzado anterior, sendo 7 animais pertencentes ao grupo tratados com clodronato intra-articular e 7 animais pertencentes ao grupo submetido à infiltração intra-articular de solução fisiológica.

2.4 Marcadores Bioquímicos da Degradação de Cartilagem

Amostras de sangue foram coletadas dos ratos por meio de punção venosa. As amostras foram coletadas ao sétimo dia após cirurgia (7PO) e ao vigésimo primeiro pós-operatório (21PO).

Os níveis séricos de CTX-II foram medidos por ensaio imunoenzimático, Rat CTX-II® (Cross Linked C-telopeptide of Type II Collagen) ELISA, kit adquirido do fabricante Elabscience®.

O princípio aplicado foi de ELISA *sanduíche*, onde a placa fornecida pelo fabricante é previamente revestida com anticorpos específicos para o telepeptídeo C do colágeno tipo II de ratos. Padrões ou amostras são adicionados aos poços da placa micro ELISA e combinados com o anticorpo específico. Em seguida, um anticorpo de detecção biotinizado específico para o conjugado CTX-II de rato e Peroxidase de rábano silvestre (HRP) é adicionado sucessivamente a cada poço de microplaca e incubado. Os componentes livres são lavados. A solução de substrato é adicionada a cada poço. Apenas os poços que contêm CTX-II de rato, anticorpo de detecção biotinizado e conjugado Avidin-HRP aparecerão em azul. A reação enzima-substrato é finalizada pela adição de solução de parada e a cor fica amarela. A densidade óptica (DO) é medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 450 nm \pm 2 nm. O valor de DO é proporcional à concentração de CTX-II. Foi calculada a concentração de CTX-II nas amostras comparando a DO das amostras com a curva padrão.

Realizamos também a determinação da concentração sérica do marcador inflamatório Interleucina10 (IL-10), por meio de ensaio imunoenzimático, MOUSE IL-10 fabricado por R&D SYSTEMS ,INC. USA.

Este ensaio emprega a técnica de imunoensaio enzimático *sanduíche* quantitativo. Um anticorpo policlonal purificado por afinidade específico para IL-10 de rato foi pré-revestido em uma micro placa ELISA. Padrões, controle e amostras são pipetados para os poços e qualquer IL-10 presente é ligada ao anticorpo da placa. Os poços são lavados e as substâncias não ligadas são retiradas, um anticorpo policlonal de detecção ligado a enzima específico para IL-10 de rato é adicionado. Uma nova lavagem é feita para remover qualquer reagente de enzima de anticorpo não ligado, então uma solução de substrato é adicionada aos poços. A reação

enzimática produz um produto azul, que após a adição da solução de parada passa a apresentar coloração amarelo. A intensidade da cor medida é proporcional à concentração de IL-10 de rato ligada na etapa inicial. Os valores da amostra são então lidos na curva padrão.

2.5 Análise Histopatológica

Ao vigésimo primeiro dia pós-operatório (21PO), os animais de todos os grupos experimentais foram eutanasiados e as articulações foram observadas macroscopicamente. Para isso, os ratos foram anestesiados com Hidrocloridrato de Cetamina (120 mg/kg) e Xilazina (40 mg/kg), por via intramuscular. Seguindo a metodologia proposta, os fêmures direitos de cada animal foram fixados em formol tamponado a 10%, durante 48 horas. Após a fixação, o osso foi processado de acordo com as técnicas histológicas de rotina para inclusão em parafina, e corados pela hematoxilina-eosina (HE), Azul de Toluidina e Mallory. Lâminas coradas com Azul de Toluidina e HE foram utilizadas para quantificar os danos da cartilagem relacionados à OA, alterações morfológicas e ortocromáticas. Cada bloco/secção padrão, para avaliação do grau, estágio, foi confinado a uma superfície articular com a presença de tecidos subjacentes de um dos compartimentos da articulação do joelho que, neste trabalho, correspondeu ao côndilo femoral medial (figura 1). A seção se estendeu horizontalmente de uma borda da articulação até a outra e, em profundidade, da superfície articular até abaixo da placa óssea articular (PRITZKER et al., 2006). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio de luz com captura de imagens. Os dados foram analisados a partir de observação direta das lâminas histológicas, comparando-se a histologia do tecido ósseo e cartilagem através das análises de imagens capturadas dos animais de cada grupo. A classificação histopatológica foi realizada de acordo com a “classificação histopatológica da *Osteoarthritis Research Society International*” – OARSI- (PRITZKER et al., 2006). Os dados mensurados foram submetidos às análises estatísticas.

A variável celularidade foi avaliada qualitativamente a partir dos cortes corados com HE e graduada conforme a tabela utilizada (Anexo1). Os cortes histológicos foram avaliados campo a campo com aumento de 40x. Considerou-se hiper celularidade o corte histológico que continha dois campos com a celularidade aumentada e, a partir de três campos, foi considerada hiper celularidade difusa.

Nesse item, a graduação da tabela segue a sequência dos eventos descritos que ocorrem com a celularidade após o dano à cartilagem articular. Após a lesão ocorre uma migração parcial dos condrócitos através da matriz extracelular, seguida por proliferação celular e posterior morte celular (Angel et al., 2003; Clements et al., 2004), representada pela seguinte sequência: normal, hiper celularidade, hiper celularidade difusa, e hipocelularidade. Para análise da espessura da cartilagem articular, foi utilizada a morfometria. Foram feitas fotos em um aumento de 40x, utilizando o software ASL X (Leica), ao longo de toda a extensão da cartilagem articular do côndilo femoral. Para verificação da espessura, foi realizada uma medida central, desde o osso subcondral até a superfície da cartilagem e, a partir dessa, mais duas outras avaliações para a esquerda e para a direita foram feitas a cada 300 µm, contabilizando 5 imagens. Calculado a média aritmética das 5 medidas de cada indivíduo, obtemos a média da espessura da cartilagem articular.

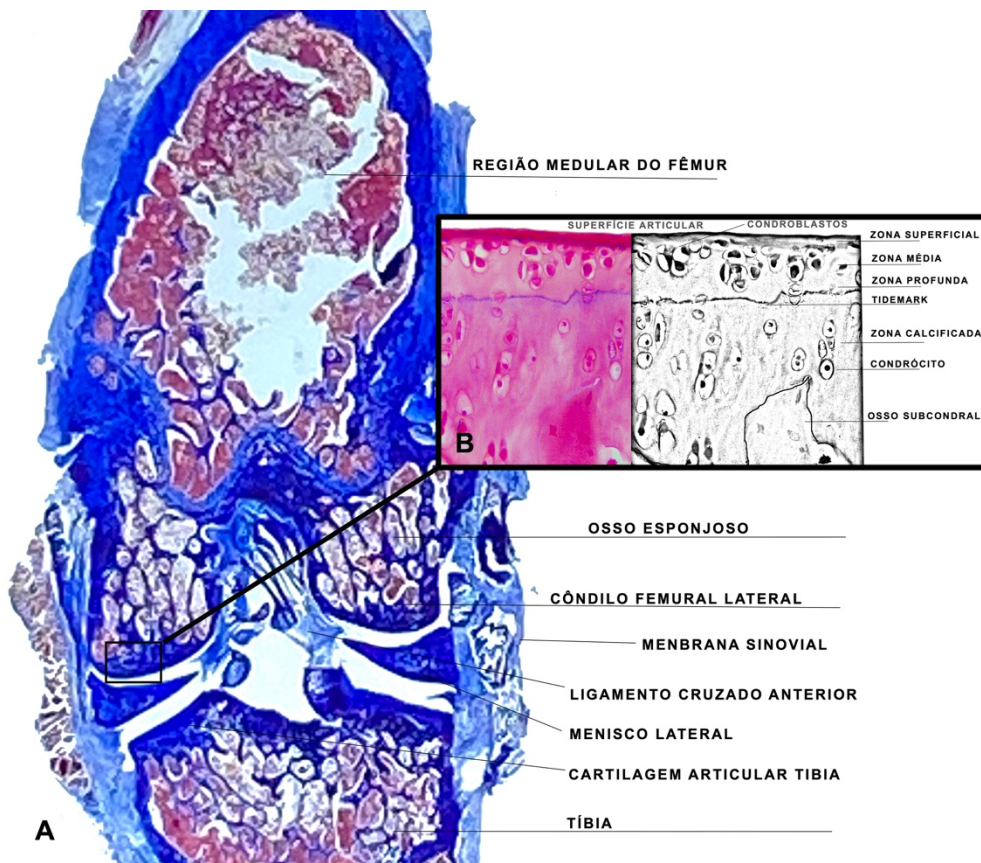


Figura 1 – Corte longitudinal joelho esquerdo. Lâmina histológica abordando as superfícies articulares do joelho esquerdo em corte coronal sendo destacado o condilofemoral medial e estruturas adjacentes utilizadas neste estudo (A). Área em destaque, lâmina histológica do côndilo femoral medial ilustrando as camadas formadoras da cartilagem articular (B). Coloração Mallory. (A) Aumento 4x, (B) Aumento 40x. Fonte: Arquivo do autor.

2.6 Parâmetros Hematológicos

Foi avaliado durante o experimento, parâmetros sanguíneos entre os grupos, coletado por meio de punção venosa, sendo abordados os constituintes das séries, vermelha e branca. Na série vermelha foi realizado a dosagem de hemograma, concentração de hemoglobina (g/dL-1) e hematócrito(%), valor corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leitura feita em aparelho ABX Micros 60. Na série branca, leucócitos totais e seus subtipos. O material foi coletado no 7 e 21PO, agregando ao estudo uma avaliação pormenorizada da saúde dos animais que se encontravam em pós-operatório e cativeiro e as possíveis correlações com o quadro degenerativo articular que se encontrava em curso. As extensões sanguíneas para diferenciar os leucócitos foram preparadas e coradas com Panótico.

2.7 Análise estatística

Os valores de todos os parâmetros foram expressos, com média \pm desvio padrão. A análise estatística das variáveis foi pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95 % de significância. Estas análises ocorreram com o software Graph Pad Instat.

3 RESULTADO

Após a cirurgia, os animais foram avaliados diariamente durante o período do experimento, não identificando macroscopicamente fatores que influenciaram negativamente no reparo da cicatrização, todos apresentaram satisfatória recuperação sem complicações de natureza infecciosa. Ao vigésimo primeiro dia de pós-operatório, os joelhos de alguns animais apresentaram hipotrofia na musculatura da coxa submetida a TLCA quando comparada a coxa contra lateral (Figura 2).

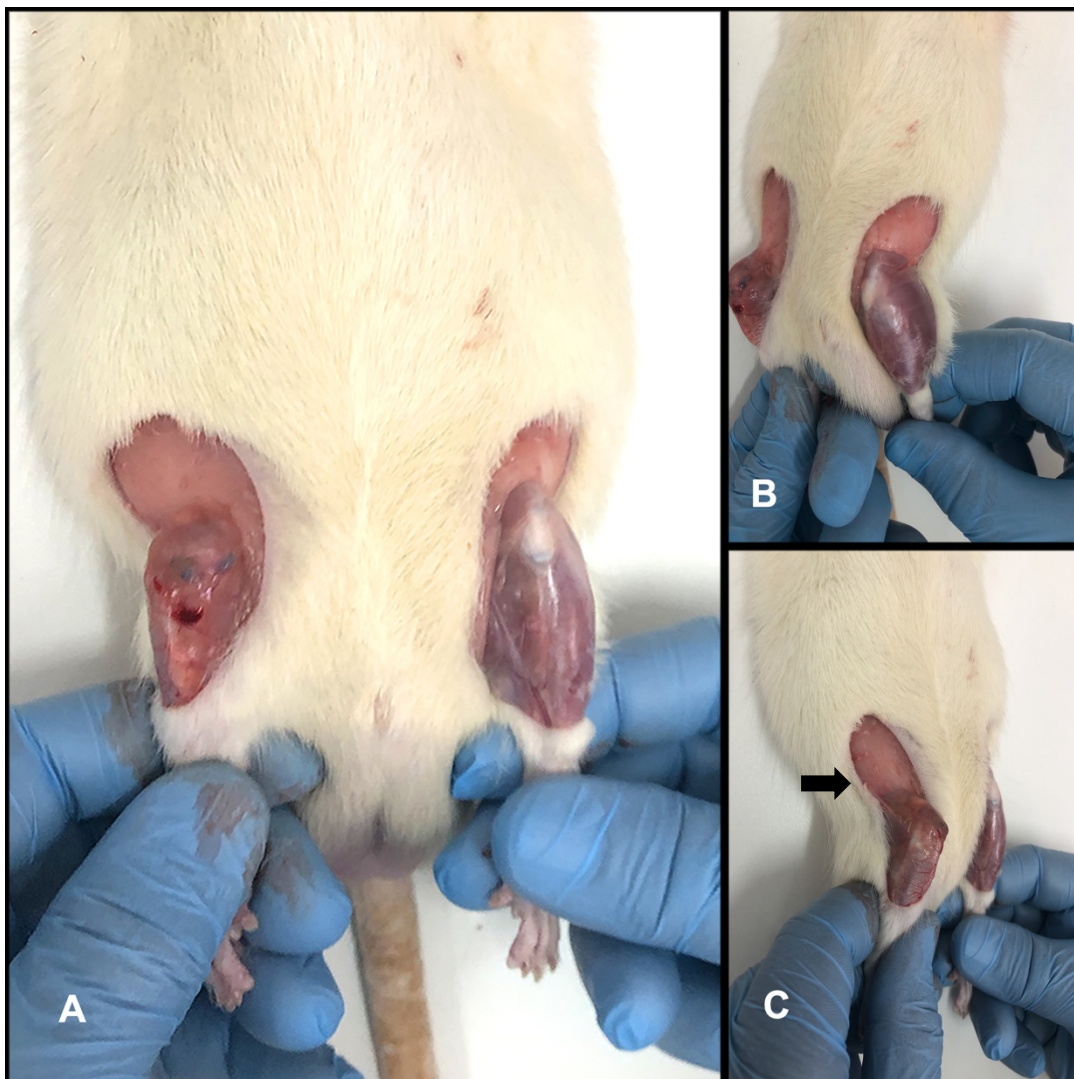


Figura 2 - Inspeção dos membros inferiores 21PO. (A), Membro inferior esquerdo normotrófico (B), Membro inferior direito Hipotrófico (C). Atrofia da musculatura do quadríceps indicado pela seta (↑). Fonte: Elaborada pelo autor

3.1 Análise dos Parâmetros Hematológicos

Os valores médios dos parâmetros hematológicos, série vermelha, dos grupos teste e controle estão apresentados na tabela 01.

Tabela 1- Valores médios com desvio padrão dos parâmetros hematológicos da série Vermelha, eritograma, ao 7º e 21º dias pós operatório (PO) de TLCA.

	CTR		SF		CLO	
	7PO	21PO	7PO	21PO	7PO	21PO
<i>RBC</i> ($10^6/mm^3$)	6,68±0,9	6,39±0,47	6,52±0,93	6,68±0,86	6,34±1	6,267±1,27
<i>Hematócrito</i> (%)	39,2±5,94	38,7±2,24	40,5±1,1	39,8±4,04	38,6±4,3	37,7±6,6
<i>Hemoglobina</i> (g/dl)	16,91±2,8	15,6±0,84	17,1±0,86	15,1±1,39	15,8±0,59	13,9±1,81
<i>HCM</i> (pg)	25,47±2,1	24,50±1,3	27,50±3,5	22,74±1,5	25,04±2,3	22,60±1,98
<i>VCM</i> (f)	58,77±2,4	60,70±2,4	60,61±4,4	59,83±3,3	60,50±4,8	60,70±2,55
<i>CHCM</i> (%)	0,43±0,03	0,40±0,02	0,43±0,02	0,38±0,01	0,415±0,0	0,371±0,01

Não houve significância estatística dos valores encontrados na série vermelha entre os diversos grupos estudados.

Na série branca, observou-se diminuição dos leucócitos totais nos grupos CTR e SF quando comparado a primeira amostra a segunda amostra. Ainda na primeira amostra observou-se diferença nos valores absolutos dos leucócitos encontrados entre os grupos que receberam infiltração com solução fisiológica e o que recebeu o clodronato lipossoma (Figura 3). Quanto aos subtipos houve maior presença de linfócitos com relação a outros tipos de leucócitos (Figura 4).

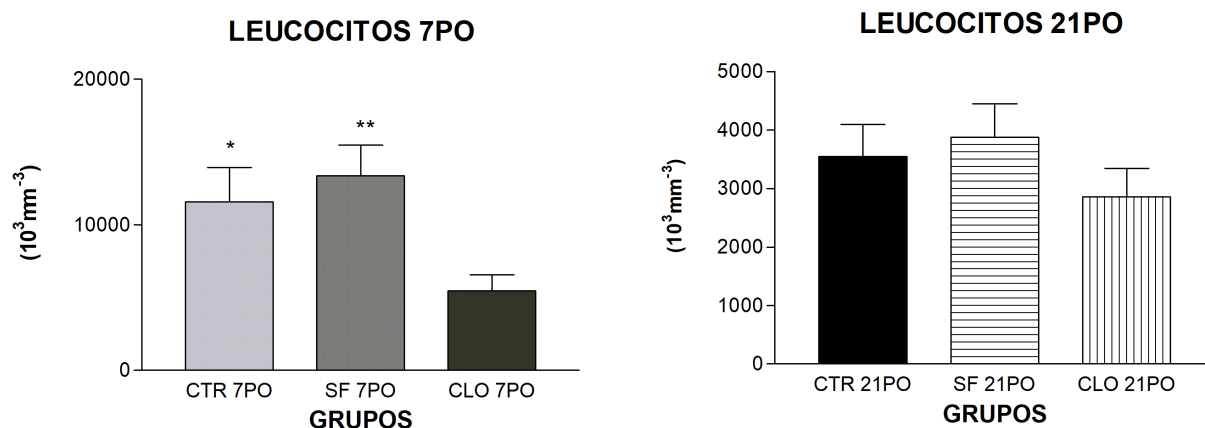


Figura 3 Gráfico com valores absolutos dos leucócitos aos 7º e 21º PO.

*Alteração dos valores dos leucócitos totais do CTR 7POxCLO7PO ($P < 0,05$)

**Alteração dos valores dos leucócitos totais do SF 7POxCLO7PO ($P < 0,001$)

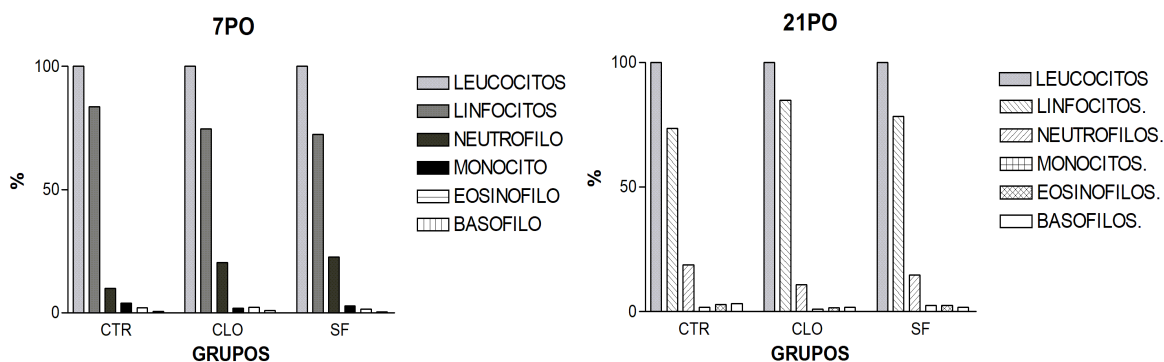


Figura 4 Gráfico com as porcentagens dos diferentes tipos celulares que compõe os leucócitos nos grupos estudados, sendo os linfócitos a célula com maior predominância.

3.2 Análise Imunoenzimática

3.2.1 CTX-II

A detecção da concentração média sérica do telepeptídeo C do colágeno tipo II da cartilagem articular dos animais dos grupos CTR, SF e CLO nos períodos estudados estão representados na Figura 5.

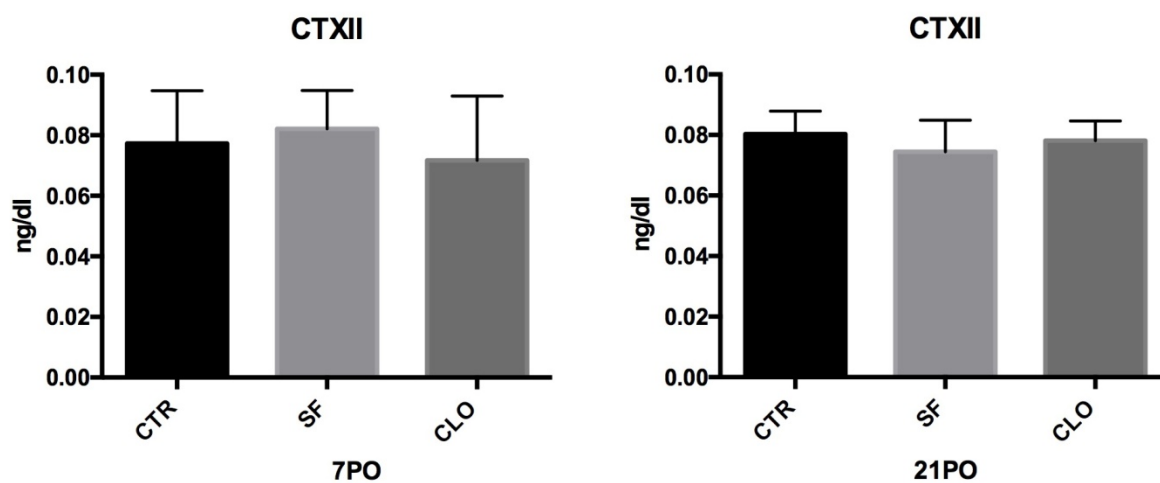


Figura 5- Dosagem da concentração média de CTXII nos grupos estudados ao 7º e 21º PO.

Ao sétimo dia pós-transecção do LCA, os grupos CTR, SF, e CLO apresentaram concentrações diferentes entre si, tendo o grupo SF ($0,082 \pm 0,011$) maior concentração que o grupo CTR ($0,077 \pm 0,016$), e o CTR maior concentração de CTXII que o grupo CLO ($0,071 \pm 0,011$) porém sem relevância estatística. Após 21 dias da transecção do LCA, os grupos apresentaram alterações em suas concentrações com discreto aumento nos grupos CTR ($0,080 \pm 0,007$) e CLO ($0,078 \pm 0,006$) e queda no grupo SF ($0,074 \pm 0,009$), porém sem significância estatística.

Na figura 6, após o 7º dia da TLCA, o grupo CLO apresentou aumento médio da CTXII, superior ao grupo SF e ao grupo CTR para o período analisado, porém sem diferença estatística ($P=0,742$) quando analisado no tempo total do experimento.

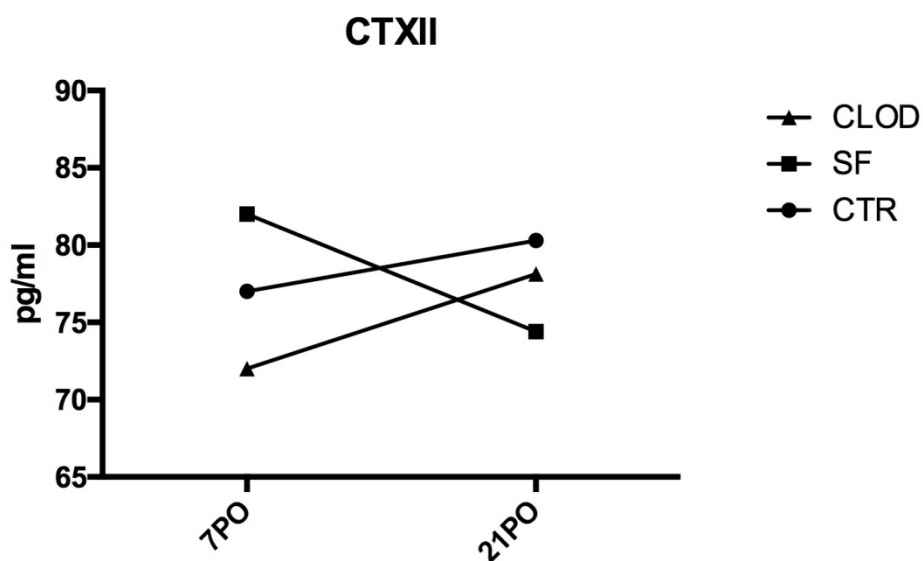


Figura 6- Concentração média de CTXII por grupo nos períodos estudados.

3.2.2 IL-10

O sangue dos ratos foi coletado ao fim do experimento (21PO) e o soro utilizado para a avaliação da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por meio da técnica de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). O experimento para detecção da IL-10 não identificou diferenças estatísticas entre os grupos estudados (Figura 7).

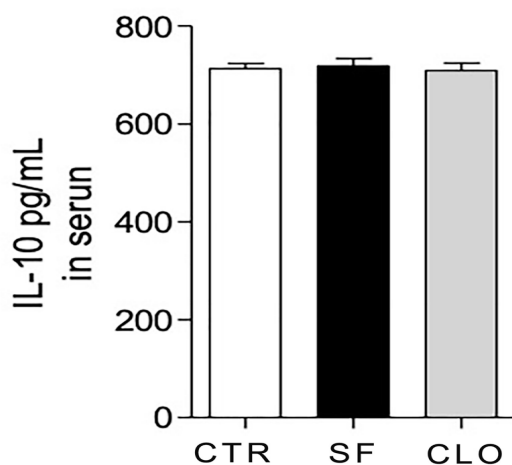


Figura 7- Concentração de IL 10, no 21PO nos diversos grupos estudados.

3.3 Análise Histológica

3.3.1 Espessura da Cartilagem Articular

A espessura da cartilagem articular medida na área de contato do fêmur dos grupos SF e CLOD em relação ao grupo controle após os 21 dias de TLCA e 4 semanas da administração do clodronato lipossoma e da solução fisiológica, não demonstraram diferenças significativas (Figura8).

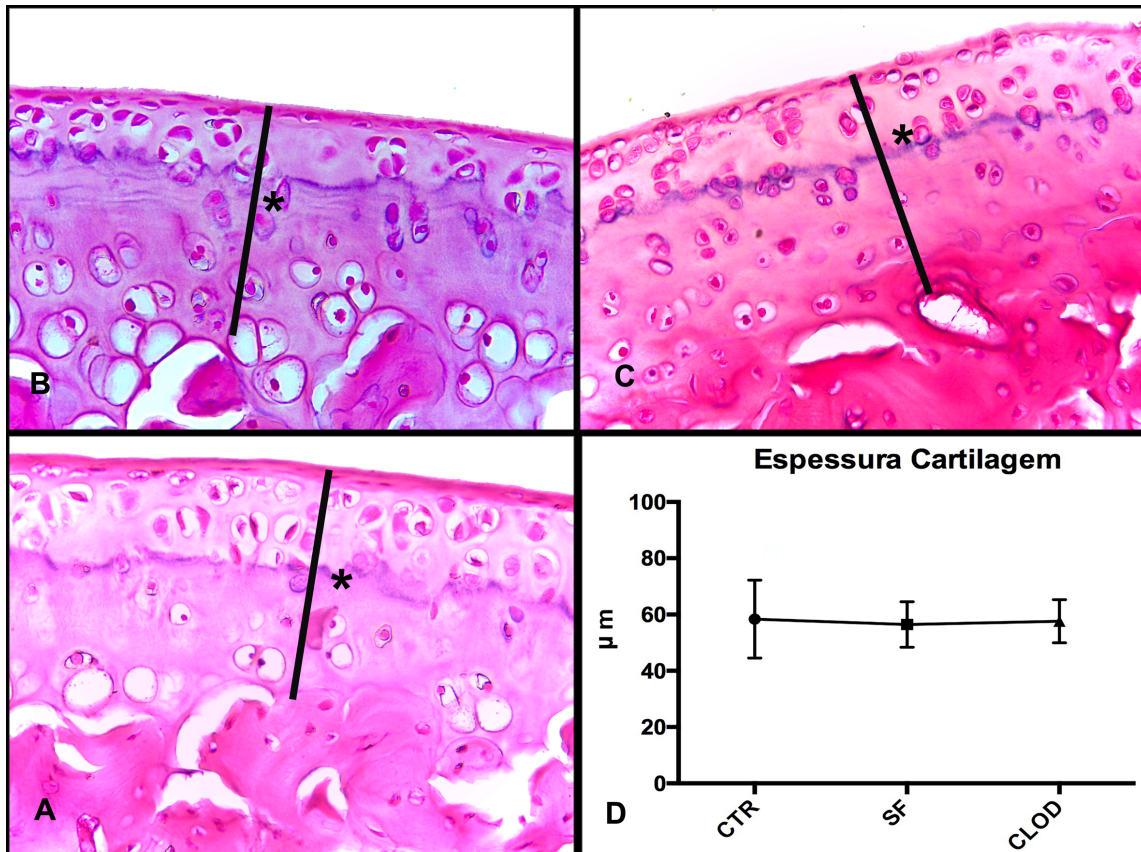


Figura 8-Corte coronal do condilo de fêmures de ratos submetidos a OA induzida por TLCA. Espessura total da superfície articular no 21^o PO. Espessura de animal do grupo CLO (A); espessura total da cartilagem do grupo SF (B); medida de cartilagem do grupo CTR(C) ; gráfico demonstrando as medidas médias das cartilagens articulares dos gruposestudados(D). (*)Barra demonstrando a espessura total da cartilagem articular. Aumento 40X. Coloração HE.

3.3.2 Avaliação Histopatológica da Osteoartrite

Na avaliação histológica da cartilagem articular do cõndilo direito, as lesões encontradas eram discretas a moderadas e estavam distribuídas aleatoriamente na cartilagem, no entanto, as lesões mais graves encontravam-se na região central

correspondente à região de maior carga. As lesões encontradas na cartilagem articular apresentaram irregularidades na superfície, de distribuição difusa, fibrilação moderada e fissuras discretas da cartilagem, principalmente, presentes na zona superficial e de transição, necrose de condrócitos, desorganização das fileiras de condrócitos, duplicações de “*Tide Mark*” e aglomerados de condrócitos. Aplicamos o score *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI) como instrumento para avaliar o dano condral e sua progressão.

A tabela 2 apresenta os diferentes graus e estágios da Osteoartrite observados na articulação dos vários grupos, utilizando a classificação da (OARSI) (Anexo 2).

Tabela 2- Classificação histopatológica para osteoartrite segundo critérios OARSI

	CTR	SF	CLO
<i>Grau</i>	1(1-1)	3(1,5-5)	2(2,5-1)
<i>Estágio</i>	1(0-1)	2(1-3)	2(3-1)
<i>Score</i>	1(0-1)	6(1,5-15)*	3(7,5-1)**

Valores: Mediana (Maior-Menor valor).

*Diferença estatisticamente relevante CTR x SF (P>0,05)

** Diferença estatística relevante SF x CLO (P>0,01)

Os animais submetidos a TLCA que receberam infiltração intra-articular de clodronato lipossoma, grupo CLO, apresentaram significativamente menor dano articular (P<0,05) que os animais tratados com solução fisiológica..

A Figura 9 ilustra a cartilagem articular de animais dos grupos CLO e SF submetidos à TLCA, e eutanasiados após o 21PO.

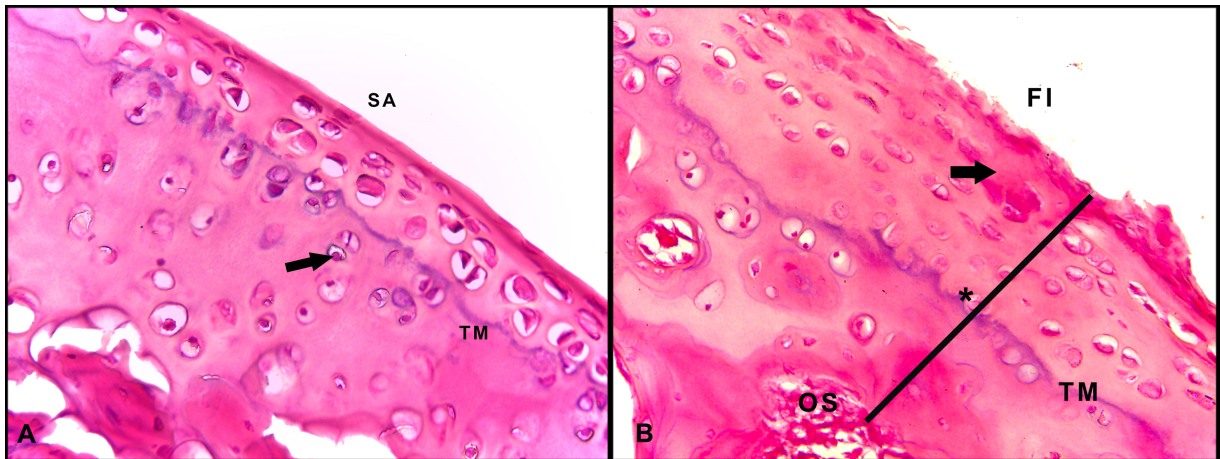


Figura 9- Lâmina corte frontal joelho de joelhos de ratos com OA induzida por TLCA. (A) Corte coronal do cômulo do fêmur grupo CLO , mostrando uma distribuição de condrocitos (seta) normal presença da "Tide Mark" (TM) com a camada camada superficial íntegra sem fibrilação junto a superfície articular (SA); (B) Corte coronal do condilo de fêmur do grupo SF mostrando Fibrilação da camada superficial (FI) tecido de granulação (seta) e morte de condrocitos, "Tide Mark" (TM). Na imagem ainda observamos observamos a transição da camada calcificada com o osso subcondral(OS) e toda a espessura da cartilagem articular (Asterisco). Aumento 40X. Coloração HE.

A FIGURA10, ilustra a análise da ortocromasia com preservação e perda dos proteoglicanos da matriz extracelular nas camadas superficiais e profundas da cartilagem articular.

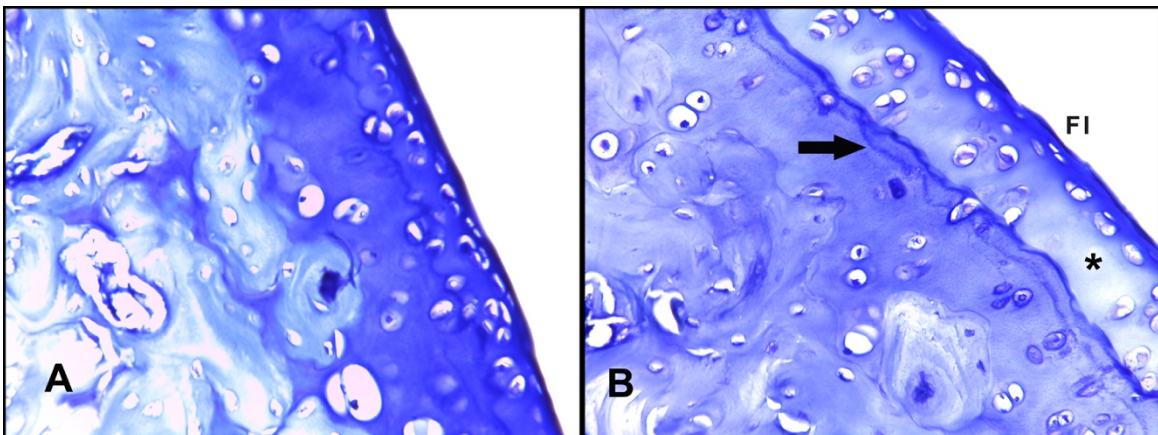


Figura 10- Corte demonstrando a ortocromasia da camada superficial da cartilagem articular , coloração Azul de Toluidina (A) Preservação dos proteoglicanos com a manutenção da coloração azul; (B) Perda de coloração em decorrência da perda de proteoglicanos (asterisco) podemos observar também a duplicação de "Tide Mark ". Coloração Azul de Toluidina. Aumento 40X.

3.3.3 Avaliação da Celularidade

A Figura 11, ilustra os resultados da classificação histomorfológica da celularidade nos grupos estudados.

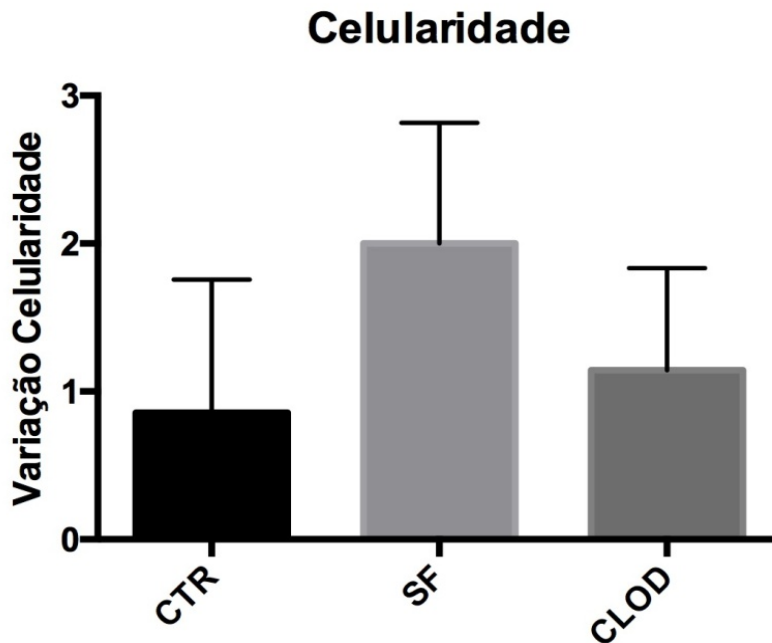


Figura 11- Distribuição da classificação da celularidade.

Quando comparada a celularidade entre os diferentes grupos, foi observado que apenas o grupo CTR apresentou celularidade significativamente normal, conforme ilustrado na Figura 12A.

No grupo SF alguns animais apresentaram hipocelularidade (grau 3) conforme ilustrado na Figura 12D, porém o predomínio foi de hipercelularidade, grau 2, como demonstra a Figura 12C. No grupo CLO observou-se animais com celularidade normal, grupo 0, e outros com presença de hipercelularidade de grau 1, tendo predominado este último, Figura 12B.

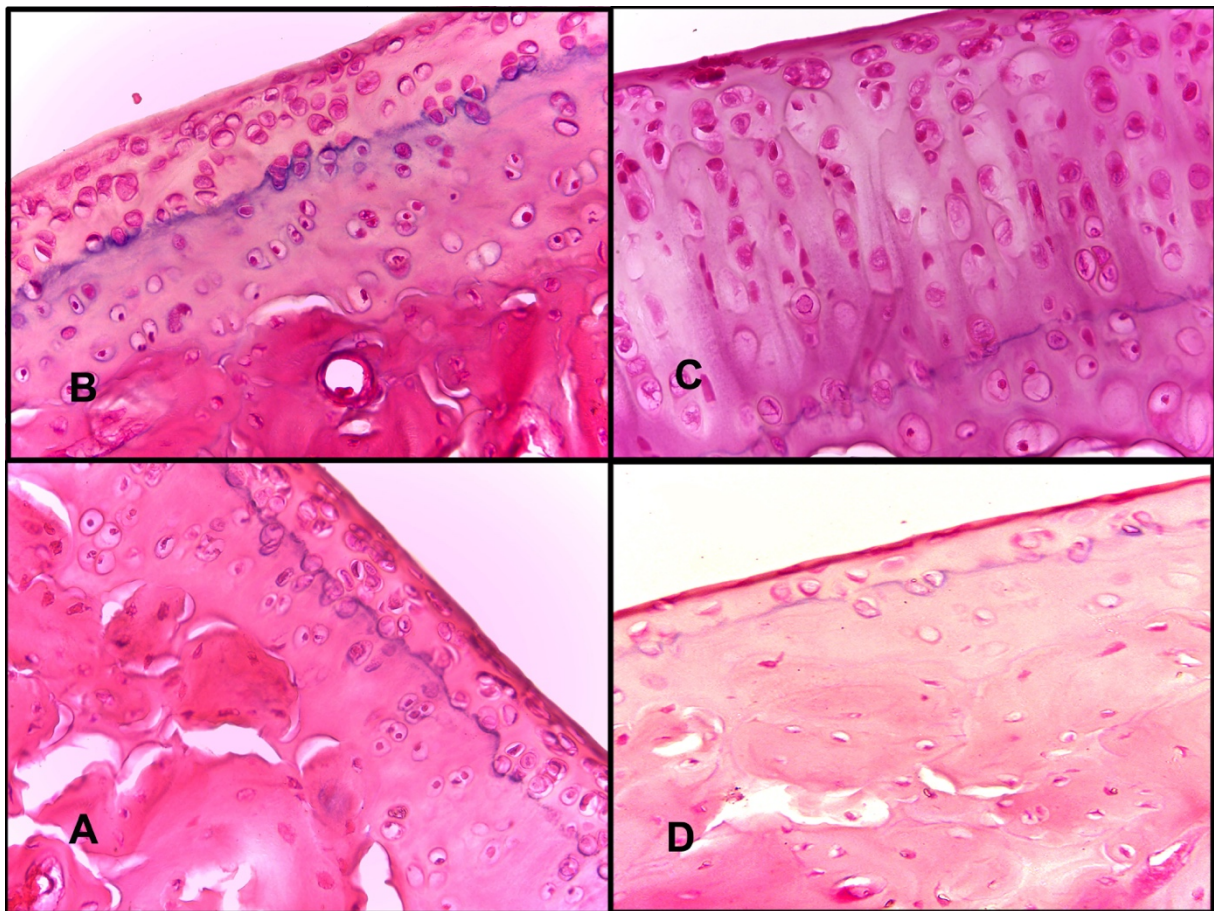


Figura 12- Corte coronal da superfície articular dos fêmures de ratos Wistar ilustrando os padrões de celularidade encontrados. (A) Normocelularidade, (B) Hipercelularidade classificação Grau 1, (C) Hipercelularidade difusa classificação grau 2, (D) Hipocelularidade classificação grau 3. Aumento 40X. Coloração HE;

4 DISCUSSÃO

A atrofia muscular nos animais submetidos a TLCA foi um sinal clínico relevante que nos despertou interesse em buscar evidências que apontassem uma correlação entre esta e o procedimento adotado no experimento. Este achado vem de encontro ao que descreve a literatura atual na qual o processo de implantação da osteoartrose do joelho induzida por TLCA em ratos promove um remodelamento da junção neuromuscular com atrofia dos músculos quadríceps e tibial anterior, associados a sinais inflamatórios e alterações na marcha e na expressão de genes e proteínas musculares (CUNHA, J.E.; BARBOSA, G.M.; CASTRO, P.A.T.d.S. et al., 2019). Outra explicação para este é a atrofia por desuso. Silva Junior (2007) relata que animais submetidos à mesma técnica, apresentaram ausência adequada de

apoio sobre o membro por um período de 2 semanas após a cirurgia, fato este que impacta diretamente na biomecânica do membro e atrofia muscular.

Na avaliação dos parâmetros hematológicos, os valores médios encontrados para o hematócrito, hemoglobina e seus derivados, apresentaram concordância com os parâmetros de normalidade descritos na literatura (LIMA, 2014), fato este que demonstra ser a indução da OA por meio da cirurgia de TLCA um método seguro quanto ao risco de sangramento, uma vez que não ocasionou alterações hematológicas significativas, mesmo se tratando de um procedimento invasivo.

Na série branca, a diminuição de leucócitos em todos os grupos, provavelmente se deve a resposta humoral aos procedimentos invasivos aos quais foram submetidos (LEE, J.Y; KIM, M.C., 2014), já a diferença entre os grupos CTR, SF e o grupo CLO provavelmente esteja relacionado à administração do clodronato encapsulado em lipossoma utilizada neste grupo, apresentando conformidade com os relatos de Lee (2011).

A possibilidade de diagnóstico precoce da OA por meio de um indicador sérico, nos encorajou a investigar o efeito de um biomarcador sérico do produto da clivagem do colágeno tipo II, o Telepeptídeo C, designado aqui como CTX-II. A perda do equilíbrio do mecanismo de degradação, remodelação da matriz extracelular da cartilagem articular, ocasionando balanço negativo de reparo, é um importante sinal patológico, e a capacidade de determinar estas alterações de maneira precoce uma importante ferramenta para monitorização da evolução e da efetividade de ações terapêuticas.

Visando reverter ou estabilizar este mecanismo, a utilização da dosagem de biomarcadores de lesão condral como método de diagnóstico e prognóstico é algo factível sendo o CTX-II urinário o marcador de metabolismo da cartilagem mais estudado (NGUYEN et al., 2017), já a dosagem sérica apresenta poucos relatos. A degeneração da cartilagem articular, incluindo a degeneração das células e matriz cartilaginosa, é a principal característica patológica da OA e a CTX-II urinária já demonstrou ser útil na determinação da gravidade das lesões em artroses de quadril, mão e joelho (GARNERO et al., 2003; JUNG et al., 2004; MEULENBELT et al., 2006), porém, ainda não foi possível correlacionar com exatidão qual concentração de CTX-II sérico marca o início do quadro.

Como método para avaliação precoce da quebra da homeostase na matriz extracelular da cartilagem, realizamos a mensuração da concentração média do CTX-II sérico e a possível implicação na diminuição do dano articular quando administrado clodronato lipossoma intra-articular. Em nosso modelo de OA induzida, experimento de curto prazo, observamos um discreto aumento na concentração de CTX-II sérico no grupo SF, quando comparados ao grupo tratado CLO e grupo CTR, embora as concentrações medidas ao longo do experimento tenham sofrido mudanças estas não foram capazes de determinar alterações estatisticamente significativas, sendo estes resultados semelhantes aos encontradas por ZheBai (2018) e Britzman (2018). Bin Bai e Yangi Li (2016) utilizando um modelo de OA induzida por TLCA em coelhos, demonstrou que as concentrações de CTX-II aumentaram de maneira significativa somente a partir da quinta semana da realização da TLCA. Duclos (2010), utilizando o mesmo modelo animal, relata aumento das concentrações de CTX-II nas primeiras três semanas, porém, ao término da quarta semana, os grupos não apresentavam diferenças estatísticas em suas concentrações médias. Entretanto em nosso experimento, na quarta semana após a infiltração do clodronato lipossoma, o grupo CLO apresentou concentrações de CTX-II maiores que na segunda semana, constatamos que este achado se deve à redução da efetividade do clodronato, que ocorre após três semanas da infiltração com o repovoamento por macrófagos na camada superficial da membrana sinovial e suas implicações no controle de mediadores inflamatórios (VAN ROOIJEN et al., 1994).

Embora a dosagem da concentração média da CTX-II não tenha demonstrado a eficiência esperada neste experimento de curta duração, as análises histológicas, corroboraram para validação do método de indução da OA e para a avaliação do potencial efeito condroprotetor do clodronato lipossoma por meio da depleção de macrófagos. O macrófago é um ator importante na produção de mediadores inflamatórios e degradantes na sinóvia. Em resposta a estímulos microambientais, os macrófagos podem ser ativados e adquirir habilidades funcionais distintas: M1 pró-inflamatório (macrófagos ativados classicamente) e M2 anti-inflamatório (macrófagos ativados alternativamente) (S, GORDON et al., 2014). Este último atua especialmente na regulação dos TNF- α e IL-1 β e suas consequentes respostas inflamatórias na OA (BONDENSON et al., 2006).

Os macrófagos M2, relacionados com resposta anti-inflamatória, são os principais produtores de citocinas moduladoras do processo inflamatório como a Interleucina 10, envolvidas no controle da inflamação e dano tecidual em várias patologias e estão associados à cronicidade nas doenças infecciosas (MARTINEZ et al.,2008;MOVAHEDI et al.,2010), fato que nos estimulou a dosar a concentração desta citocina no soro dos animais. O experimento para detecção da IL-10 não revelou alterações nas amostras analisadas. Diante do resultado obtido, é possível fazer pelo menos duas ponderações importantes. Primeiro, o resultado sugere que não existe produção sistêmica da citocina anti-inflamatória IL-10 no período adotado para a coleta no experimento, porém, seria importante avaliar se existe produção da citocina em um momento anterior ao analisado. O entendimento do padrão de produção de citocinas anti-inflamatórias é importante pois abre a perspectiva para a realização de intervenções farmacológicas com o objetivo de modular o processo inflamatório instaurado, e possíveis benefícios que estas apresentam no anabolismo e reparação tecidual. Um segundo ponto importante seria avaliar se existe a produção local de IL-10. Para isso, seria interessante realizar a coleta tanto do lavado articular quanto do tecido. A análise do lavado e do tecido propriamente dito permitirá avaliar se a IL-10 está presente dentro da cápsula sinovial, bem como, sinalizar quais células seriam as possíveis responsáveis pela síntese e liberação da citocina.

Em vários modelos experimentais de artrite, foi demonstrado o papel significativo dos Macrófagos M1 na patologia articular (VAN LENT,1996; 1998). Há uma forte evidência na associação entre o número de macrófagos na sinóvia e a progressão do dano articular na artrite reumatóide humana (HARINGMAN, 2005), entretanto nunca foi claramente estabelecida a proporção desta na OA, e em experimentos de curta duração, uma das diretrizes do presente estudo. Assim como em Blom (2007), a utilização da infiltração de clodronato intra-articular demonstrou uma diminuição da gravidade dos achados histológicos quando comparados ao grupo controle. Nossos dados mostraram uma pontuação menor neste grupo quando aplicada a classificação histopatológica proposta pela *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI).

A avaliação da lesão da cartilagem articular em modelos experimentais tem sido tradicionalmente baseada no escore descrito por Mankin (1971). Contudo, a

reprodutibilidade e validade desse escore têm sido questionadas (OSTERGAARD,1997; 1999), o que levou a OARSI a desenvolver um novo sistema para avaliação histopatológica em estudos em OA (PRITZKER et al., 2006). Esse sistema é mais simples de usar e permite uma avaliação mais detalhada dos achados compatíveis com OA na cartilagem. Ainda dentro da avaliação histológica, observamos importantes alterações na arquitetura celular e morfológica das camadas mais superficiais da cartilagem, porém, estas não se traduziram em alterações da espessura da cartilagem total quando comparados os diversos grupos. Nossas observações encontram suporte nos achados descritos por Dias (2012) utilizando o mesmo modelo de OA induzida.

Mesmo que os resultados obtidos em modelos animais representem apenas hipóteses a serem testadas em estudos clínicos, podem ajudar a esclarecer controvérsias em relação a tratamentos e drogas, e, nesse sentido, os resultados obtidos no presente trabalho fornecem evidências de que a metodologia empregada foi adequada e novos estudos com maior tempo de experimento se fazem necessários para compreensão e maior conhecimento sobre a patologia.

Concluimos que o método de indução da osteoartrose pela técnica de secção do ligamento cruzado anterior é eficiente em promover alterações na cartilagem articular em joelhos, sendo o modelo animal escolhido adequado a este tipo de experimento que simula a doença articular degenerativa, mesmo em experimentos de curta duração como este.

O uso do clodronato encapsulado em lipossoma demonstrou ter a propriedade de atenuar as alterações histológicas da lesão condral ocorrida no modelo experimental adotado e que drogas capazes de bloquear a produção de mediadores inflamatórios em nível da sinovial apresentam potencial promissor necessitando estudos mais completos que abranjam mecanismos fisiológicos, mecânicos e funcionais.

A dosagem da concentração do CTX-II sérica, em experimento inferiores a quatro semanas não se mostrou método capaz de demonstrar de maneira precoce os primeiros sinais de instalação da osteoartrose no modelo animal escolhido, no qual lesões leves e moderadas que acometem as fases iniciais da doença não encontraram suporte neste marcador, só podendo ser comprovadas por meio da avaliação histológica.

A necessidade de obtenção de métodos não invasivos que sejam capazes de prever com exatidão alterações estruturais antes mesmo do surgimento de sinais radiológicos é objeto de grande interesse no estudo da osteoartrose e possível agente modificador da história natural da doença, embora a histologia tenha validado a proposta do estudo, novos trabalhos com metodologias capazes de realizar diagnóstico precoce e não invasivos se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

ANDRIACCHI, T.P., MUNDERMANN, A., SMITH, R.L., ALEXANDER, E.J., DYRBY, C.O. and KOO, S. A framework for the in vivo pathomechanics of osteoarthritis at the knee. **Annals of Biomedical Engineering** 32: 447–457, 2004.

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

BAI, ZHE et al. "Effects of Artesunate on the Expressions of Insulin-Like Growth Factor-1, Osteopontin and C-Telopeptides of Type II Collagen in a Rat Model of Osteoarthritis." **Pharmacology** vol. 101, 1-2, p1-8, 2018.

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

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

BERENBAUM, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 1, p. 16–21, 2013.

BIJLSMA, J. W. J.; BERENBAUM, F.; LAFEBER, F. P. J. G. Osteoarthritis: An update with relevance for clinical practice. **The Lancet**, v. 377, n. 9783, p. 2115–2126, 2011.

BLANCO F.J., Osteoarthritis year in review 2014: we need more biochemical biomarkers in qualification phase. **Osteoarthritis and Cartilage**. 2014;22(12):2025–32.

BLOM A.B., VAN LENT P.L., HOLTHUYSEN A.E., VAN DER KRAAN P.M., ROTH J., VAN ROOIJEN N, et al. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**;12:627e35, 2004.

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

BONDESON J, WAINWRIGHT SD, LAUDER S, AMOS N, HUGHES CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. **Arthritis Research Therapy**;8(6):R187, 2006.

BONNET, C. S.; WALSH, D. A. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. **Rheumatology**, v. 44, n. 1, p. 7–16, 2005.

BRANDT, K. Non-surgical treatment of osteoarthritis: a half century of “advances”. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 2, p. 117 LP-122, 2004.

BRITZMAN, DAVID et al. “Tibial Osteotomy as a Mechanical Model of Primary Osteoarthritis in Rats.” **Scientific Reports** vol. 8,1 5132. 23 Mar. 2018

BROPHY, R. H. et al. Molecular Analysis of Age and Sex-Related Gene Expression in Meniscal Tears with and without a Concomitant Anterior Cruciate Ligament Tear. **The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume**, v. 94, n. 5, p. 385–393, 2012.

CEPEDA, M. et al. Tramadol for osteoarthritis (Review). **Library**, n. 1, 2007.

CHANG, Y.-H. et al. Mesenchymal Stem Cells and Their Clinical Applications in Osteoarthritis. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 5, p. 937–950, 2016.

CHARNI-BEN TABASSI N., DESMARAIS S., BAY-JENSEN A.C., DELAISSÉ J.M., PERCIVAL M.D., GARNERO P. The type II collagen fragments helix-II and CTX-II reveal different enzymatic pathways of human cartilage collagen degradation. **Osteoarthritis Cartilage**. 2008;16(10):1183–91.

CHRISTGAU, S. et al. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. **Bone**, v. 29, n. 3, p. 209–215, 2001.

CLARK A.G., JORDAN J.M., VILIM V., RENNER J.B., DRAGOMIR A.D., LUTA G., KRAUS V.B. Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. **Arthritis Rheum.**;42(11):2356–64,1999.

COIMBRA, I.B.; REZENDE, M.U.; PAPLER, P. G. **Osteoartrite (artrose)- cenário atual e tendências no Brasil**. [s.l.] Limay Editora, 2012.

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

CUNHA, J.E., BARBOSA, G.M., CASTRO, PA.T.D.S *et al.* A osteoartrite do joelho induz atrofia e remodelação da junção neuromuscular nos músculos quadríceps e tibial anterior de ratos. **Scientific Reports** 9, 6366 ,2019.

CUNNANE, G. et al. Expressão gênica da protease do tecido sinovial e erosões articulares na artrite reumatoide inicial . **Arthritis Rheumatism** 2001 ; 44 : 1744 - 53

DIAS,C.N.K., Tese apresentada ao programa de pós graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos. São Carlo, SP, Fev. 2012

DIEPPE, P. Disease modification in osteoarthritis: Are drugs the answer? **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 7, p. 1956–1959, 2005.

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

DVM, F. T. et al. <Toghraie - 2012 - Archives of Iranian Medicine.pdf>. v. 15, n. 8, p. 495–499, 2012.

FRASER, A. et al. Turnover of Type II Collagen and Aggrecan in Cartilage Matrix at the Onset of Inflammatory Arthritis in Humans: Relationship to Mediators of Systemic and Local Inflammation. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 11, p. 3085–3095, 2003.

GARNER, S. et al. Celecoxib for rheumatoid arthritis. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 4, p. CD003831, 2002.

GARNERO, P. et al. Urinary type II collagen C-telopeptide levels are increased in patients with rapidly destructive hip osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 10, p. 939–943, 2003.

GOLDRING, M. B., MARCU, K. B.. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. **Arthritis Research and Therapy**, May 19, 2009

GOLDRING, M. B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 4, n. 4, p. 269–285, 2012.

GORDON S., PLUDDMANN A., MARTINEZ Estrada F. Macrófago heterogeneidade nos tecidos: diversidade e funções fenotípicas. **Immunological Reviews**. 262 : 36–55, 2014.

HARINGMAN, J.J. et al. Macrófagos do tecido sinovial: um biomarcador sensível para resposta ao tratamento em pacientes com artrite reumatóide . **Annals of the Rheumatic Disease**. 64 : 834 – 8, 2005.

Hosnijeh FS, Runhaar J, van Meurs JB, Bierma-Zeinstra SM. Biomarkers for osteoarthritis: can they be used for risk assessment? A systematic review. **Maturitas**.;82(1):36–49, 2015.

JORDAN, K. M. et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). **Annals of the rheumatic diseases**, v. 62, n. 12, p. 1145–1155, dez. 2003.

JUNG, M. et al. Increased urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. **Pathobiology**, v. 71, n. 2, p. 70–76, 2004

KOH, Y. G.; CHOI, Y. J. Infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. **Knee**, v. 19, n. 6, p. 902–907, 2012.

KONTTINEN, Y. T. et al. Osteoarthritis as an autoinflammatory disease caused by chondrocyte-mediated inflammatory responses. **Arthritis and rheumatism**, United States, mar. 2012.

KUMM J., TAMM A., LINTROP M., TAMM A. The value of cartilage biomarkers in progressive knee osteoarthritis: cross-sectional and 6-year follow-up study in middle-aged subjects. **Rheumatology International**.33(4):903–11,2013.

2013

LEE, J.Y.; KIM, M.C.. Comparasion of oxidative stress status in dogs undergoing laparoscopic and open ovariectomy. **The Journal Veterinary Medical Science**, v.76,p.273-76,2014

LEE S.M., ROSEN S., WEINSTEIN P., VAN ROOIJEN N., NOBLE-HAEUSSLEIN L.J. A prevenção do recrutamento de neutrófilos e monócitos promove a recuperação após lesão da medula espinhal. **Journal Neurotrauma** . 28 (9): 1893-1907. doi: 10.1089 / neu.2011.1860, 2011.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K. ; MELO, M. G. D. ; DORIA, G. A. A. ; LEITE, B. L. S. ; R.SERAFINI, M. ; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C. ; ARAUJO, A.A.S . Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, p. 4601-4609, 2014.

LOESER, R. F. Osteoarthritis year in review 2013: **Biology Osteoarthritis and Cartilage**, 2013.

LOPES JÚNIOR, O. V.; INÁCIO, E A. M. Uso de glucosamina e condroitina no tratamento da osteoartrose: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 48, n. 4, p. 300–306, 2013.

LOTZ M., MARTEL-PELLETIER J., CHRISTIANSEN C., BRANDI M.L., BRUYÈRE O., CHAPURLAT R., COLLETTE J., COOPER C., GIACOVELLI G., KANIS J.A., KARSDAL M.A., KRAUS V., LEMS W.F., MEULENBELT I., PELLETIER J.P., RAYNAULD J.P., REITER-NIESERT S., RIZZOLI R., SANDELL L.J., VAN SPIL W.E., REGINSTER J.Y. Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. **Annals Rheumatic Disease**. 72(11):1756–63, 2013.

MANKIN H.J., DORFMAN H., LIPIELLO L., ZARINS A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data , **Journal of Bone and Joint Surgery**, 53A, p 523-37, 1971.

MARTINEZ FO, SICA A, MANTOVANI A, LOCATI M. Macrophage activation and polarization. **Frontier Biosciences**. 13: 453-61, 2008

MATHIESSEN, A.; CONAGHAN, P. G. Synovitis in osteoarthritis: Current understanding with therapeutic implications. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2017.

MELO, M. G. D.; DORIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAUJO A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem

Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **SCIENTIA PLENA** VOL. 8, NUM. 4, 2012.

MEULENBELT, I. et al. Urinary CTX-II levels are associated with radiographic subtypes of osteoarthritis in hip, knee, hand, and facet joints in subject with familial osteoarthritis at multiple sites: The GARP study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 65, n. 3, p. 360–365, 2006.

MOVAHEDI K, LAOUI D, GYSEMANS C, BAETEN M, STANGÉ G, VAN DEN BOSSCHE J, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. **Cancer Research**. 2010; 70: 5728-39.

NGUYEN, L. T. et al. Review of prospects of biological fluid biomarkers in osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.

OSTERGAARD K, PETERSEN J, ANDERSEN CB, BENDTZEN K, SALTER DM. Histologic/histochemical grading system for osteoarthritic articular cartilage: reproducibility and validity. **Arthritis Rheumatism**.40(10):1766-1771,1997.

OSTERGAARD K, ANDERSEN CB, PETERSEN J, BENDTZEN K, SALTER DM. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. **Annals Rheumatic Disease**.58(4):208-213,1999.

PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; ABRAMSON, S. B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: Potential implication for the selection of new therapeutic targets. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 6, p. 1237–1247, 2001.

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

REZENDE, M. U.; GOBBI, R. G. Tratamento medicamentoso da OA no joelho. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 44, n. 1, p. 14–19, 2009.

SARUKAWA, J. et al. A longitudinal analysis of urinary biochemical markers and bone mineral density in STR/Ort mice as a model of spontaneous osteoarthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 62, n. 2, p. 463–471, fev. 2010.

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

SOKOLOVE, J.; LEPUS, C. M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: Latest findings and interpretations. **Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, v. 5, n. 2, p. 77–94, 2013.

TOWHEED, T. E.; HOCHBERG, M. C. A systematic review of randomized controlled trials of pharmacological therapy in osteoarthritis of the knee, with an emphasis on trial methodology. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 26, n. 5, p. 755–770, abr. 1997.

THOMAS, E.; PEAT, G.; CROFT, P. Defining and mapping the person with osteoarthritis for population studies and public health. **Rheumatology (Oxford)**, v53, n.2, p. 338–345, 2014.

UNITED NATIONS, DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, POPULATION DIVISION (2015). *WORLD POPULATION PROSPECTS: THE 2015 REVISION, KEY FINDINGS AND ADVANCE TABLES*. WORKING PAPER NO. ESA/P/WP.241. Disponível < <https://esa.un.org/unpd/wpp/> > Acesso em 12 agosto 2020.

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

VAN LENT P.L.; HOLTHUYSEN A.E.; VAN DEN BERSSELAAR, L.A., VAN ROOIJEN, N.; JOOSTEN, L.A.; VAN DE LOO, F.A., et al. Phagocytic lining cells determine local expression of inflammation in type II collagen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatism**.39:1545–55,1996.

VAN LENT, P.L., HOLTHUYSEN, A.E., VAN ROOIJEN, N., VAN DE PUTTE, L.B., VAN DEN BERG, W.B. Local removal of phagocytic synovial lining cells by clodronate-liposomes decreases cartilage destruction during collagen type II arthritis. **Annals Rheumatic Disease**.57:408–13,1998.

VAN LENT P., BLOM A., VAN DER KRAAN P., HOLTHUYSEN A., VITTERS E., VAN ROOIJEN N., et al. Crucial role of synovial lining macrophages in the promotion of transforming growth factor mediated osteophyte formation. **Arthritis Rheumatism: Off Journal American College Rheumatology**;50:103e11,2004.

VAN SPIL W.E., DEGROOT J., LEMS W.F., OOSTVEEN J.C., LAFEBER F.P. Serum and urinary biochemical markers for knee and hip-osteoarthritis: a systematic review applying the consensus BIPED criteria. **Osteoarthritis Cartilage**.;18(5):605–12, 2010.

VELOSA, A. P. P. et al . Meniscectomia parcial como modelo experimental de osteoartrite em coelhos e efeito protetor do difosfato de cloroquina. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo , v. 47, n. 6, p. 401-410, Dec. 2007

VERBRUGGEN, G. Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. **Rheumatology**, v. 45, n. 2, p. 129–138, 2006.

VERMA P., DALAL K. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in knee osteoarthritis: a novel diagnostic and prognostic biomarker. **Journal Orthopedic Research**. 2013;31(7):999–1006.

WANDEL S., JÜNI P., TENDAL B., NÜESCH E., VILLINGER P.M., WELTON N.J., et al. Effects of glucosamine, chondroitin, or placebo in patients with osteoarthritis of hip or knee: network meta- analysis. **British Medical Journal**;341:c4675, 2010.

WILLIAMS, J. M. et al. Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. **Journal of anatomy**, v. 134, n. Pt 1, p. 103–9, 1982.

ZHANG, W. et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis. Part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 4, p. 476–499, 2010.

ZUO H, JIANG L, QU N, WANG J, CUI X, YAO W. The biomarkers changes in serum and the correlation with quantitative MRI markers by histopathologic evaluation of the cartilage in surgically-induced osteoarthritis rabbit model. **PLoSOne.**;10(4):e0124717, 2015.

ANEXO I

Classificação da contagem celular

Células	
Normal	0
Hiper celularidade	1
Hiper celularidade difusa	2
Hipo celularidade	3

ANEXO II

CRITÉRIOS DA CLASSIFICAÇÃO OARSI

Grau (Característica Principal)	Subgrau (Opcional)	Critério de Associação (Reação Tecidual)
Grau 0: superfície intacta, cartilagem intacta	Ausência de Subtipo 0	Cartilagem intacta não envolvida
Grau 1: superfície intacta	1.0 Células intactas 1.5 Morte celular	Matriz: zona superficial intacta, edema e / ou fibrilação Células: proliferação (clusters), hipertrofia Reação deve ser maior que fibrilação superficial apenas
Grau 2: Descontinuidade de superfície	2.0 Fibrilação através da zona superficial 2.5 Abrasão superficial com perda de matriz dentro da zona superficial	Como acima +Descontinuidade na zona superficial ±Depleção da coloração matriz cationica (Safranina O ou Azul de Toluidina) superior 1/3 da cartilagem (zona média) ±Dissorientação de colunas de condron
Grau 3: fissuras verticais	3.0 Fissuras simples 3.5 Fissuras ramificadas / complexas	Como acima ±Depleção de coloração Catiônica (Safranina O ou Azul de Toluidina) nos 2/3 inferiores da cartilagem (zona profunda) ± Formação de colágeno Novo (microscopia de luz polarizada, coloração Picro Sirius Red)
Grau 4: erosão	4.0 Delaminação da zona superficial 4.5 Escavação da zona média	Perda da matriz da cartilagem, formação de cisto dentro da matriz da cartilagem
Grau 5: desnudação	5.0 Superfície óssea intacta 5.5 Superfície de tecido reparador presente	A superfície é osso esclerótico ou tecido reparador, incluindo fibrocartilagem
Grau 6: deformação	6.0 Osteófitos de margem articular 6.5 Margem articular e osteófitos centrais	Remodelação óssea. Deformação do contorno da superfície articular (mais do que apenas formação de osteófito)

Caracterização do Estágio

Estágio	Porcentagem de envolvimento
Estágio 0	Sem OA visível
Estágio 1	<10%
Estágio 2	10-25%
Estágio 3	25-50%
Estágio 4	>50%

Estágio= Extensão do acometimento da articulação

Cálculo do Score

Grau	Estágio			
	S1	S2	S3	S4
G1	1	2	3	4
G2	2	4	6	8
G3	3	6	9	12
G4	4	8	12	16
G5	5	10	15	20
G6	6	12	18	24

Score= Grau x Estágio