

RODRIGO VIANA SEPÚLVEDA

**ANÁLISE DO ÓRGÃO ARTICULAÇÃO NA DOENÇA ARTICULAR  
DEGENERATIVA EM MODELO EXPERIMENTAL POR RUPTURA DO  
LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL EM CÃES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S479a  
2017

Sepúlveda, Rodrigo Viana, 1986-

Análise do órgão articulação na doença articular degenerativa em modelo experimental por ruptura do ligamento cruzado cranial em cães / Rodrigo Viana Sepúlveda. - Viçosa, MG, 2017.

viii, 40f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cães - Doenças. 2. Osteoartrite. 3. Ortopedia veterinária.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.708

RODRIGO VIANA SEPÚLVEDA

**ANÁLISE DO ÓRGÃO ARTICULAÇÃO NA DOENÇA ARTICULAR  
DEGENERATIVA EM MODELO EXPERIMENTAL POR RUPTURA DO  
LIGAMENTO CRUZADO CRANIAL EM CÃES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de julho de 2017.

  
Tatiana Schmitz Duarte

  
Renato Barros Eleotério

  
Emily Correna Carlo Reis  
(Coorientadora)

  
Fabrício Luciani Valente  
(Coorientador)

  
Andréa Pacheco Batista Borges  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, incentivo, confiança e orientação em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Professora Andréa, foi muito difícil o caminho do doutorado, mas tenho certeza que seria ainda mais difícil sem a sua presença. Obrigado pela paciência, dedicação e amizade.

Ao meu grande companheiro, Fabrício, pela amizade de todas as horas e pela ajuda imensurável na realização deste trabalho, sempre com bom humor, um sorriso e muita paciência.

Ao amigo Renato, pela amizade construída na pós-graduação, pelas conversas por *Whatsapp* durante o seu período sanduíche e por oferecer ajuda durante o momento tenebroso vivido em 2015.

À Professora Emily pela confiança e ajuda durante a realização desse trabalho.

À Maninha por todo carinho demonstrado.

À minha amiga Flávia por sempre ter uma palavra doce de incentivo e por sempre buscar uma solução para os momentos difíceis.

Aos amigos da pós-graduação, Vanessa e Fernanda, obrigado pelas anestésias, pelas conversas e pelas risadas durante o momento experimental. Foi ótimo trabalhar com vocês.

A todos os alunos de iniciação científica pela ajuda no trabalho braçal.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

**SUMÁRIO**

LISTA DE FIGURAS .....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS .....	32

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Fotomicrografia da superfície articular do platô tibial lateral de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa.	19
<b>Figura 2:</b> Fotomicrografia da superfície articular do platô tibial lateral e medial de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa.	19
<b>Figura 3:</b> Fotomicrografia da superfície articular do côndilo femoral lateral e medial de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa.	21
<b>Figura 4:</b> Fotomicrografia da superfície articular do platô tibial medial de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa.	22
<b>Figura 5:</b> Fotomicrografia da superfície articular do platô tibial lateral e do medial de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa.	24
<b>Figura 6:</b> Fotomicrografia da superfície articular do côndilo femoral lateral e do medial de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa.	24
<b>Figura 7:</b> Fotomicrografias da membrana sinovial de cães após 60 dias de ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa.	25
<b>Figura 8:</b> Fotomicrografias dos meniscos de cães após 60 dias de ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa.	27
<b>Figura 9:</b> Média e desvio-padrão das estruturas presentes na articulação femorotibiopatelar e grau geral de doença articular induzida de cães após 60 dias de ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa.	29

**Figura 10:** *Box plot* dos valores para os compartimentos medial e lateral das estruturas presentes na articulação femorotibiopateral de cães após 60 dias de ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. 29

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Grau atribuído a severidade máxima das lesões em cada parâmetro de cada região de interesse na análise da indução da doença articular degenerativa no joelho de cães após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial na abordagem proposta pela Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (Adaptado de Cook *et al.*, 2010). 16
- Tabela 2:** Porcentagem de acometimento de cada região analisada da articulação do joelho de cães após 60 dias da ruptura experimental do ligamento cruzado cranial utilizando o sistema de avaliação proposto pela Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (Adaptado de Cook *et al.*, 2010). 30

## RESUMO

SEPÚLVEDA, Rodrigo Viana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Análise do órgão articulação na doença articular degenerativa em modelo experimental por ruptura do ligamento cruzado cranial em cães.** Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Coorientadores: Adriano de Paula Sabino, Emily Correna Carlo Reis e Fabricio Luciani Valente.

A doença articular degenerativa (DAD) é uma doença crônica da cartilagem articular. Até hoje, nenhuma terapia é capaz de regenerar a cartilagem articular danificada e nem impedir totalmente a sua progressão. Posto isso, é necessário o conhecimento de seus vários aspectos patológicos. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar macro e microscopicamente as alterações ocorridas no modelo de indução cirúrgica da DAD após a ruptura do ligamento cruzado cranial em cães. Foram utilizados seis cães, adultos, pesando entre 15 e 30 Kg. Os animais foram anestesiados e tiveram o ligamento cruzado cranial do joelho direito rompido. Após 60 dias, foi realizada a eutanásia. Foi feita a análise anatomopatológica dos tecidos articulares e após essa análise, amostras foram coletadas para a análise histológica. A análise anatomopatológica revelou fibrilações superficiais e focais de espessura parcial na cartilagem articular dos côndilos femorais e platô tibial. A membrana sinovial apresentou-se descolorada, espessada e com aumento da vascularização. Nenhuma lesão macroscópica visível foi percebida nos meniscos. Na análise histológica, todos os tecidos articulares apresentaram algum grau de lesão. A superfície articular apresentou fissuras restritas à zona superficial e ondulações na superfície cartilaginosa, perda celular na zona superficial com eventuais agrupamentos. Também foi visto a presença de lacunas vazias na zona superficial. Ocorreu perda global do conteúdo de proteoglicanos e colágeno até a zona média da cartilagem articular. Houve perda da continuidade ou duplicação da *tidemark* da cartilagem articular de forma multifocal e aumento da espessura da placa óssea subcondral. A membrana sinovial apresentou pequenas vilosidades de distribuição multifocal, aumento da espessura do revestimento e moderado infiltrado inflamatório. Os meniscos apresentaram perda moderada do arranjo tecidual com discreta perda tecidual, perda moderada do conteúdo de proteoglicanos e colágeno em ambos os meniscos. Portanto, foi possível observar que aos 60 dias pós-ruptura do ligamento cruzado cranial, um grau leve de DAD, sendo as lesões uniformes. Por fim, o modelo não é útil para que o estudo de lesões macroscópicas seja feito, porém, permite avaliar a ocorrência de lesões microscópicas nos componentes articulares utilizando a abordagem da articulação como um órgão.

## ABSTRACT

SEPÚLVEDA, Rodrigo Viana, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Analyses of the organ joint in degenerative joint disease in cranial cruciate experimental rupture model in dogs.** Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-advisers: Adriano de Paula Sabino, Emily Correna Carlo Reis and Fabrício Luciani Valente.

Degenerative joint disease (DJD) is a chronic disease of the articular cartilage. To date, no therapy is capable to regenerate the damaged cartilage nor completely impeding its progression. Therefore, it is necessary to know its various pathological aspects. Thus, the present work aims to evaluate macro and microscopically the changes occurred in the surgical model of induction of DJD after rupture of the cranial cruciate ligament in dogs. Six adults dogs, weighing between 15 and 30 kg were used. The animals were anesthetized and had cranial cruciate ligament of the right knee ruptured. After 60 days, euthanasia was performed. Anatomopathological analysis of the articular tissues was performed and after this analysis, samples were collected for histological analysis. Anatomopathological analysis revealed superficial and focal fibrillation of partial thickness in the articular cartilage of the femoral condyles and tibial plateau. The synovial membrane presented discolored, thickened and with increased vascularization. No visible macroscopic lesion was noticed in the meniscus. In the histological analysis, all the articular tissues presented some degree of lesion. The articular surface presented fissures restricted to the superficial zone and undulations in the cartilaginous surface, cellular loss in the superficial zone with possible groupings. It was also seen the presence of empty gaps in the superficial zone. There was a global loss of the proteoglycan and collagen contents up to the middle zone of the articular cartilage. There was loss of continuity or duplication of the tidemark of the articular cartilage in multifocal form and increase of the thickness of the subchondral bone plate. The synovial membrane presented small villi of multifocal distribution, increased coating thickness and moderate inflammatory infiltrate. The meniscus presented moderate loss of tissue arrangement with slight tissue loss, moderate loss of proteoglycan content and collagen in both menisci. Therefore, it was possible to observe that at 60 days post-rupture of the cranial cruciate ligament, a mild degree of DJD, the lesions being uniform. Finally, the model is not useful for the study of macroscopic lesions, but allows to evaluate the occurrence of microscopic lesions in the articular components using the joint approach as an organ.

## 1. INTRODUÇÃO

A perda de cartilagem articular é considerada o ponto estrutural principal da doença articular degenerativa (DAD), porém, nos últimos anos, pesquisas têm demonstrado que, na verdade, a DAD é uma doença de todos os componentes da articulação e, dessa maneira, a abordagem da articulação como um “órgão” ganhou popularidade. Hoje, considera-se que todos os componentes articulares são importantes, portanto, quando se considera a articulação do joelho, não apenas a cartilagem dos côndilos femorais e do platô tibial é analisada para se avaliar a saúde da articulação, mas considera-se também os meniscos, os músculos, os ligamentos, a membrana sinovial e o osso subcondral que compõem essa articulação.

Em 2006, Pritzker *et al.* publicaram um guia da Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (OARSI) para análise histológica da DAD, avaliando-se qual modelo seria o melhor para tal propósito e sugeriu um sistema de graduação, estadiamento e escore, baseados no exame histológico. Nesse guia, graduação é definida como progressão da profundidade DAD na cartilagem sendo, portanto, um índice da severidade do processo natural de progressão da DAD. Já estadiamento é definido como a extensão horizontal de envolvimento da cartilagem em um determinado compartimento da articulação, independente da lesão existente em outros compartimentos. Por fim, escore é definido como a avaliação combinada entre graduação e estágio, ou seja, entre a severidade e a extensão.

Apesar de útil e extremamente simples e didático, o sistema supracitado era falho em descrever como a análise dos outros componentes articulares deveria ser feita; então, em 2010, a OARSI publicou um suplemento científico sobre os protocolos de análise histológica em diversos modelos animais (COOK *et al.*, 2010). Nesses suplementos, os autores descreveram o sistema de avaliação para a espécie canina que consiste, de forma simplificada, em uma análise macroscópica da articulação, observando-se a superfície articular, bem como o aspecto dos meniscos e da membrana sinovial, e uma análise microscópica que consiste numa varredura por todos os componentes articulares, avaliando-se, por diferentes colorações, a arquitetura tecidual bem como a qualidade da matriz extracelular de cada componente.

Considera-se que a síndrome da DAD é a principal manifestação das doenças crônicas degenerativas da cartilagem articular, afetando toda a população mundial com alta prevalência. A patogênese da DAD é multifatorial e até hoje não completamente compreendida, envolvendo fatores mecânicos, genéticos, metabólicos e de desenvolvimento, incluindo instabilidade articular, incongruência articular, lesões articulares e ligamentares, alterações pela idade, obesidade e diabetes (WISE *et al.*, 2012).

A capacidade funcional da cartilagem saudável de suportar carga é mantida pela adaptação de suas características físico-químicas, mecânicas e morfológicas, com um equilíbrio refinado entre síntese e degradação da matriz extracelular. Os fatores anteriormente citados provocam um desequilíbrio em tal processo, com aumento da degradação dos componentes da matriz cartilaginosa e liberação de debris no espaço intra-articular, levando à inflamação com aumento da produção de líquido sinovial na presença de infiltrado inflamatório e conseqüentemente, a dor (FELSON, 2013). Com a progressão da doença, ocorre fibrilação e erosões na superfície da cartilagem e remodelação do osso subcondral (WISE *et al.*, 2012). A inflamação e as próprias lesões geram mais incongruência, instabilidade articular e inflamação, perpetuando assim o ciclo vicioso que é a progressão da DAD (MADRY *et al.*, 2012).

Atualmente, não há nenhum tratamento disponível que impeça a progressão da DAD e nem o retorno da cartilagem articular ao seu estado fisiológico, apenas o controle da dor ou a substituição dos componentes articulares com próteses, o que pode aumentar a morbidade (WISE *et al.*, 2012; FELSON, 2013).

A DAD, como já citado anteriormente, afeta toda a população mundial apresentando alta prevalência, sendo a causa mais frequente de incapacidade funcional nos Estados Unidos, onde aproximadamente 12% da população acima de 60 anos apresentam sintomas de DAD no joelho (SURI *et al.*, 2012; WISE *et al.*, 2012). Isso representa um custo médio de aproximadamente 10,3 bilhões de dólares por ano em diversas modalidades de tratamento, sendo que o custo relacionado à invalidez e queda de produção laboral pode chegar a 200 mil dólares por ano por pessoa, considerando os indivíduos que apresentam problemas relacionados à articulação do joelho (LOSINA *et al.*, 2015).

Um estudo realizado por Figueira Neto *et al.* (2011) em pacientes tratados em Unidades Básicas de Saúde, demonstrou que o quadro no sistema de saúde brasileiro é semelhante. Outro estudo realizado com dados do Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SUS) sugeriu que, apesar da população idosa corresponder apenas a 14,3% do total da população adulta brasileira, ela é responsável por 33,5% das internações hospitalares e 37,7% dos recursos pagos, dentre os quais, a artrose é a sétima causa que mais onerou o SUS (PEIXOTO *et al.*, 2004).

Além dos gastos financeiros, outro importante componente da influência da DAD na população afetada é a redução na atividade física, com redução na atividade produtiva e diária do paciente, com piora expressiva da qualidade de vida (FIGUEIRA NETO *et al.*, 2011).

Segundo Teeple *et al.* (2003), o desenvolvimento de tratamentos para a DAD exige a compreensão de fatores biomecânicos, inflamatórios, genéticos e ambientais para o sucesso dessas terapias. Posto isso, é necessário o conhecimento dos vários aspectos da DAD e, por isso, os modelos animais ainda são requeridos para tal e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de uma terapia segura e eficaz. Os mesmos autores afirmaram que os modelos animais são indispensáveis para, de maneira controlada e padronizada, reproduzir o desenvolvimento e a progressão da DAD e, dessa maneira, determinar os melhores momentos e alvos terapêuticos dentro do ciclo de desenvolvimento e progressão da doença. O modelo animal ideal é aquele que apresenta um custo de manutenção baixo, que exhibe a progressão da doença de forma reprodutível e padronizada entre os indivíduos e que possua uma magnitude de sinais que seja suficiente para a detecção, mas que não atinja a perda total da cartilagem articular de forma muito rápida. Além disso, no modelo animal ideal, pequenas mudanças nos sinais, na progressão ou em qualquer outra variável, sejam notadas em um curto espaço de tempo quando se aplica alguma interferência externa como um tratamento, por exemplo (TEEPLÉ *et al.*, 2003).

De maneira geral, existem três categorias de modelos animais para DAD: aqueles que apresentam o desenvolvimento natural da doença, aqueles que necessitam de indução cirúrgica ou outro tipo de trauma e aqueles que necessitam de aplicações intra-articulares de substâncias condrotóxicas ou pró-inflamatórias (TEEPLÉ *et al.* 2013).

Cada modelo animal apresenta vantagens e desvantagens, contudo, como recomendação da Sociedade Internacional de Pesquisa com Osteoartrite (OARSI), como exposto por Aigner *et al.* (2010), quando se almeja a transposição de resultados para seres humanos, os modelos de animais maiores como os cães, ovelhas e cavalos são os mais indicados.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar macro e microscopicamente as alterações ocorridas no modelo de indução cirúrgica da doença articular degenerativa após a ruptura do ligamento cruzado cranial em cães, utilizando a abordagem da articulação como um órgão, como sugerido pela OARSI.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

Ao considerar a articulação como um órgão, conforme proposto pela OARSI, pode-se implicar que a ruptura do ligamento cruzado cranial como método indutor de doença articular degenerativa nada mais é que um método que causa insuficiência de um órgão, no caso, a articulação do joelho, ao promover instabilidade e sobrecarga mecânica sobre os componentes

articulares (COOK, 2010). Dessa forma, considerando o tecido cartilaginoso da articulação joelho, sabe-se que a unidade celular é o condrócito, porém a unidade funcional desse tecido é o cêndron, que consiste em uma ou duas células circundadas por matriz pericelular, existindo entre um cêndron e outro, uma matriz interterritorial cuja principal função é a absorção e redistribuição de forças compressivas para o osso subcondral através de um sistema biológico de suspensão hidroelástica (POOLE, 1997).

Essa função só é possível já que a matriz pericelular do cêndron, rica em proteoglicanos, sofre um “inchaço”, em consequência da ligação dos proteoglicanos com a água. Assim, à medida que a carga é aplicada, a matriz pericelular sofre uma deformação elástica e parte da carga é absorvida e parte é redistribuída para o osso subcondral. Quando a carga é removida, as pressões de expansão osmótica superam a capacidade dos proteoglicanos em se ligarem com a água e esta é liberada novamente para a matriz e um novo potencial para “inchaço” é criado nos proteoglicanos. Os cêndrons ainda possuem uma função metabólica relacionada à síntese e regulação de agrecan, o principal componente dos proteoglicanos da cartilagem articular (POOLE, 1997).

É importante considerar que o agrupamento de condrocitos é uma das características mais marcantes observadas por histologia na doença articular degenerativa (HOSHIYAMA *et al.*, 2015) e que esses agrupamentos ocorrem frequentemente próximos a fissuras na zona superficial da cartilagem articular. Uma das teorias que explicaria tal fato foi elaborada por Schumacher *et al.* (2002), que propuseram que esse fenômeno perto das fissuras encurtaria a distância de difusão de nutrientes para os condrocitos, já que essas células seriam as responsáveis pela tentativa de reparar a lesão da cartilagem e que o fenômeno de agrupamento seria a fase inicial do processo de reparação (LOTZ *et al.*, 2010).

Ademais, Grogan *et al.* (2009) descreveram a ocorrência de marcadores para células progenitoras mesenquimais em condrocitos obtidos a partir de fragmentos de cartilagem de articulações com DAD e propuseram que ocorre um recrutamento de células tronco mesenquimais a fim de contribuir para o processo de reparação.

Ainda, ao observarem diferentes núcleos dentro do mesmo cêndron, Rotzer e Mohr (1992) sugeriram que os agrupamentos ocorrem em consequência da proliferação dos condrocitos, sendo essa hipótese confirmada por outros autores ao observarem a presença de marcadores de proliferação celular nos cêndrons (HELLIO *et al.*, 2001).

Uma outra hipótese que explicaria o fenômeno da hiper celularidade é a migração celular, como sugerida por Kouri *et al.* (1996) ao observar mudanças no citoesqueleto dos condrocitos, porém, não está totalmente confirmada (LOTZ *et al.*, 2010). Lotz *et al.* (2010)

concluíram que a intensidade de proliferação está relacionada ao grau de lesão que o tecido sustentou e pode estar relacionado à liberação de fator de crescimento de fibroblastos 2. Esses autores ainda comentaram que a migração das células é um fenômeno ainda não compreendido *in vitro*.

É importante considerar ainda que essa resposta adaptativa hiperplásica dentro dos cêndrons tem curta duração, sendo seguida por uma hipocelularidade, sendo que a autofagia e apoptose parecem ser a razão para que tal fato aconteça (SHEN *et al.*, 2015).

O processo de autofagia é um mecanismo celular adaptativo e protetor quando a célula é submetida a um estresse metabólico alto, principalmente quando apresenta alta taxa metabólica e baixa nutrição (WHITE & LOWE, 2009).

Em um trabalho sobre a regulação do processo de autofagia na doença articular degenerativa, Zhang *et al.* (2015) relataram que mTOR, uma molécula supressora de autofagia, estava aumentada em modelos traumáticos de indução da doença, porém, diminuídos em modelos de ocorrência natural, como a doença articular degenerativa induzida por idade, indicando que, no trauma, o processo de apoptose pode ser o principal responsável pela hipocelularidade observada na cartilagem hialina.

Contudo, alguns autores demonstraram que a expressão de genes marcadores de autofagia estava diminuída em indivíduos com lesões cartilagosas e que a observação de caspases estava aumentada nesses indivíduos (BOUDERLIQUE *et al.*, 2016).

Zamli *et al.* (2011) relataram que a apoptose está correlacionada a hipocelularidade observada na doença articular degenerativa e ao dano da matriz extracelular, porém propuseram que a apoptose é um evento tardio no desenvolvimento da doença articular degenerativa uma vez que observaram aumento da espessura da placa óssea subcondral precedendo a ocorrência da apoptose.

Posto isso, é importante salientar a ideia proposta por Zhang *et al.* (2016) em um trabalho mais atual. Esses autores propuseram que o fenótipo catabólico descontrolado dos condrócitos, ou seja, a disfunção dos condrócitos seja a razão por trás da progressão da doença articular degenerativa e não a apoptose dessas células, ou seja, a apoptose dos condrócitos seria consequência da doença articular degenerativa e não causa, porém, ainda não há consenso quanto a esse tema (CHARLIER *et al.*, 2016).

Os condrócitos são primordiais em manter saudável a matriz extracelular da cartilagem e vice-versa, principalmente em consequência da modificação enzimática da matriz que resulta em uma matriz mais rígida, porém, menos eficiente na transmissão de forças. A matriz extracelular da cartilagem articular é constituída por um gel de

proteoglicanos altamente carregados negativamente que conferem resistência à compressão e uma rede de fibras de colágeno que conferem resistência à tensão (KIM *et al.*, 2015).

Os proteoglicanos são complexos agregados supramoleculares constituídos por um filamento central de ácido hialurônico no qual múltiplos monômeros estão ligados, lateralmente, por uma ligação não covalente estabilizada por uma proteína de ligação. Os monômeros variam em tamanho, emergem em intervalos regulares do filamento central de ácido hialurônico e são formados a partir de uma proteína central da qual irradiam inúmeras cadeias de glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos são formados por uma longa cadeia de repetição polidimérica de sacarídeos como o sulfato de condroitina, mais abundante representando cerca de 60 a 90% dos glicosaminoglicanos, e sulfato de queratina (BERTRAND *et al.*, 2010).

Ainda, os proteoglicanos desempenham um importante papel na propriedade mecânica da cartilagem articular por sua capacidade de ligar e reter água quando uma força compressiva age na cartilagem articular. Essa característica deve-se principalmente a dois fatores: a região de fixação do glicosaminoglicano que proporciona elevada densidade de carga aniônica contribuindo para a função osmótica e o tamanho do proteoglicano, já que quanto maior for a molécula, maior será a quantidade de regiões de fixação do glicosaminoglicano (ROUGHLEY, 2006). Portanto, na doença articular degenerativa, a clivagem proteolítica promovida por aggrecanases age de duas maneiras: clivando a ligação entre o glicosaminoglicano e a proteína central diminuindo a capacidade iônica e, conseqüentemente, osmótica do proteoglicano e clivando o ácido hialurônico, diminuindo o tamanho do próprio proteoglicano.

Durante as fases iniciais da doença articular degenerativa, os condrócitos apresentam um perfil de crescimento clonal alto com aumento da quantidade de células agrupadas por cêndron como uma resposta adaptativa a agressão sofrida pelo tecido cartilaginoso. Posteriormente a essa fase, os condrócitos apresentam alto índice de apoptose, incluindo a liberação de IL-1, que interrompe o estímulo à proliferação de condrócitos. Sabe-se ainda que, durante essa fase de hiper celularidade, os condrócitos apresentam um metabolismo intenso de síntese e degradação que, com a persistência do estímulo nocivo, culminará na prevalência de fatores de degradação como as metaloproteinases da matriz e aggrecanases (GOGGS *et al.*, 2003). A IL-1 apresenta um papel importante na interrupção do estímulo para proliferação de condrócitos e, sem os condrócitos, não há síntese de proteoglicanos. Além disso, a IL-1 também age como um catalisador da ação da aggrecanase (ARNER *et al.*, 1998) e, dessa maneira, promove também a degradação da matriz.

Segundo Schmidt *et al.* (1990) apenas a perda de proteoglicanos não parece alterar de maneira significativa a capacidade da cartilagem articular em distribuir a carga, mas sim diminui a resistência oferecida pelos proteoglicanos garantindo uma resposta de distribuição de carga mais rápida na rede de fibras de colágeno, porém, a rapidez na resposta é acompanhada de microdanos na rede de fibras de colágeno. Os autores afirmam que a fim de absorver e distribuir as forças compressivas a que está sujeita, a cartilagem articular depende da propriedade de sua matriz extracelular em ligar e reter água. Entretanto, os mesmos autores afirmam que essa função não está unicamente na dependência dos proteoglicanos, a rede de fibras de colágeno também age durante a compressão da cartilagem articular, garantindo rigidez tênsil, ou seja, a medida que a carga compressiva é recebida pelo gel de proteoglicanos, ela é distribuída na rede de fibras de colágeno.

A rede de fibras de colágeno é o principal componente de sustentação da cartilagem articular sendo esta rede composta principalmente por fibras de colágeno do tipo II (POOLE *et al.*, 2002), orientadas paralelamente a zona superficial garantindo máxima resistência a força de tensão. Como já dito anteriormente, a rede de fibras de colágeno age em conjunto com os outros elementos da matriz extracelular, em especial os proteoglicanos, a fim de garantir as propriedades mecânicas da cartilagem articular, especialmente a resistência a forças de compressão e tensão.

Um dos primeiros sinais de doença articular degenerativa é o dano à rede de fibras de colágeno e o gel de proteoglicanos, ou seja, o dano na matriz extracelular. No tocante ao colágeno, inicialmente, este dano ocorre pela sua desnaturação (HOLLANDER *et al.*, 1994) e, posteriormente, é potencializado pela ação das colagenases (BILLINGHURST *et al.*, 1997). Uma vez ocorrida a clivagem, o colágeno é perdido. Diante da degradação do colágeno, ocorre o estímulo para sua produção pelos condrócitos, porém, assim como ocorre com os proteoglicanos (RIZKALLA *et al.*, 1992), essas moléculas recém produzidas são ineficientes na reparação do tecido cartilaginoso (DAHLBERG *et al.*, 2000). Com o aumento do estímulo, os condrócitos sofrem hipertrofia e começam a produzir colágeno tipo XII de forma semelhante ao que ocorre no processo de ossificação endocondral (MWALE *et al.*, 2002).

Classicamente, a degradação do colágeno ocorre em consequência da ação das metaloproteinases da matriz, sendo a MMP-13 a que apresenta um papel de destaque ao degradar o colágeno não apenas na região interterritorial do cêndron, mas também as fibras mais distantes (DAHLBERG *et al.*, 2000). Além disso, a ação da MMP-13 é um dos estímulos para o processo de hipertrofia dos condrócitos e mineralização da matriz extracelular (WU *et al.*, 1997).

Diante das mudanças sofridas na matriz extracelular pelo dano na rede de fibras de colágeno e no gel de proteoglicanos, ocorre o estímulo para a mineralização da matriz extracelular como uma resposta irreversível ao estímulo agressor contínuo, semelhante a um processo de metaplasia. Em outras palavras, a continuidade do processo agressor muda o caráter resiliente da cartilagem articular e cria uma alternativa pobre em resistir a qualquer estímulo mecânico, o que eventualmente culminará na perda do tecido cartilaginoso (THIBAUT *et al.*, 2002).

A *tidemark* é uma membrana basofílica situada entre a porção avascular e a porção vascular calcificada da cartilagem articular (BONDE *et al.*, 2005) sendo um importante fator a ser estudado na doença articular degenerativa já que a sua ruptura ou duplicação podem indicar a penetração de vasos sanguíneos na parte avascular do tecido cartilaginoso. Essa penetração é o estágio final do processo de ossificação que a cartilagem sofre nos estágios finais da doença. A penetração de vasos sanguíneos altera a organização das fibras de colágeno da matriz extracelular piorando ainda mais a fragilidade do tecido cartilaginoso (REDLER *et al.*, 1975).

Bonde *et al.* (2005) propuseram que, em circunstâncias normais, a *tidemark* garantiria um equilíbrio entre a tensão de oxigênio, vascularização e calcificação entre as camadas da cartilagem, garantindo um estado de equilíbrio que, na doença articular degenerativa, é perdido. Estes mesmos autores ainda discutem que a duplicação da *tidemark* representa uma resposta do tecido na tentativa de atrasar a invasão vascular e a mineralização da cartilagem hialina, sendo a ondulação da *tidemark* um estado intermediário entre a duplicação e a ruptura, que refletem o estágio final, conforme demonstrado por Oettmeier *et al.* (1989).

A placa óssea subcondral é uma subdivisão do osso subcondral juntamente com o osso subcondral trabecular (GOLDRING & GOLDRING, 2010). A placa óssea subcondral corresponde a uma fina lamela de osso cortical imediatamente abaixo da cartilagem calcificada apresentando canais para penetração de vasos sanguíneos e nervos, os quais são direcionados à cartilagem calcificada (MADRY *et al.*, 2010).

A distribuição desses canais no osso subcondral depende, entre outros fatores, da magnitude da força compressiva transmitida da cartilagem para o osso (MILZ *et al.*, 1994), sendo os canais preferencialmente localizados onde a magnitude de força é maior, estando mais finos e ramificados nas regiões em que a placa óssea é mais espessa e mais largos onde a placa óssea é menos espessa.

Já o osso subcondral trabecular exerce importante função mecânica ao absorver a carga transmitida pela cartilagem articular, sendo mais poroso e metabolicamente ativo do que a placa óssea subcondral (MADRY *et al.*, 2010).

A unidade funcional criada pelo íntimo contato entre a cartilagem articular e o osso subcondral é chamada de junção osteocondral (SURI & WALSH, 2012), que corresponde à região da cartilagem calcificada até o osso subcondral (LYONS *et al.*, 2006). Alterações em qualquer um dos tecidos, cartilagem ou osso, irá alterar as propriedades dos outros componentes da junção osteocondral (GOLDRING, 2009).

O aumento do volume do osso subcondral é um sinal claro de DAD (WANG *et al.*, 2010), porém, de acordo com Intema *et al.* (2010), este sinal pode ser observado apenas nos estágios finais da doença. Nos estágios intermediários, pode ser observado tanto o aumento, quanto diminuição desse volume, porém de acordo com Li e Aspden (1997), a mineralização do osso subcondral deve ser considerada na doença articular degenerativa, já que ela pode estar perigosamente diminuída na doença articular degenerativa.

Mansell e Bailey (1998) demonstraram que na doença articular degenerativa, a razão entre a quantidade de cálcio e colágeno é reduzida na matriz extracelular do osso subcondral contribuindo para uma baixa resistência (LI & ASPDEN, 1997).

Day *et al.* (2001) propuseram que o aumento da espessura da placa óssea é uma resposta adaptativa não ao estímulo agressor (por exemplo, a sobrecarga), mas sim à baixa mineralização da matriz óssea, ou seja, o estímulo agressor alteraria o equilíbrio osteoblástico e osteoclástico natural do tecido ósseo e esse desequilíbrio seria a compensado com alta atividade osteoblástica levando ao aumento da espessura da placa óssea às custas de uma matriz mineralizada resistente.

Li *et al.* (2013) descreveram como a lesão do osso subcondral se manifesta nas diferentes fases da doença articular degenerativa, de modo que inicialmente as microfissuras atuam como um estímulo para o início da remodelação óssea, além de promover uma comunicação física entre a cartilagem e o osso. Ainda, as microfissuras causam lesão aos canalículos ósseos, induzindo a reabsorção osteoclástica como forma de reparo das microfissuras, culminando inicialmente com diminuição da espessura do osso subcondral. Posteriormente, na tentativa de equilibrar a alta atividade osteoclástica promovida pelas microfissuras, ocorre o aumento da atividade osteoblástica, o que culmina com o aumento da espessura do osso subcondral.

No desenvolvimento da DAD, fragmentos microscópicos de cartilagem podem ser liberados pela superfície cartilaginosa danificada, os quais ficam imersos no líquido sinovial e

acabam aderindo à membrana sinovial, onde ocasionam uma reação de corpo estranho com uma resposta inflamatória caracterizada como sinovite (BERENBAUM, 2012). Essa sinovite é caracterizada por hiperplasia das células de revestimento com proliferação de fibroblastos, vascularização, infiltrado linfocítico, infiltrado mononuclear e formação de agregados linfóides perivasculares (LOTZ, 2012). Além disso, a inflamação da membrana sinovial ainda pode ativar condrócitos da zona superficial da cartilagem a produzir MMP, aumentando a degeneração da cartilagem articular (BERENBAUM, 2012).

Outras alterações importantes que ocorrem durante a DAD são as lesões nos meniscos. Os meniscos são formados principalmente por condrócitos circundados por colágeno tipo I, os fibrocondrócitos, e são responsáveis por impedir o movimento cranial da tíbia em relação ao fêmur, juntamente com o ligamento cruzado cranial, além da distribuição de forças que atuam na articulação. Sendo assim, a perda de tecido meniscal ocasiona ou é ocasionada pela DAD, na grande maioria dos casos por sobrecarga compartimental na articulação. Estudos demonstraram que a perda de 1/3 do menisco já resulta em um aumento de 65% do pico de força do estresse de contato, enquanto que a perda total do menisco ocasiona um aumento de 235% no pico de força.

Os mecanismos moleculares no menisco que culminam com sua degeneração são semelhantes aos que acontecem na cartilagem articular e incluem quebra da matriz proteica, fibrilação, aglomeração celular, calcificação e morte celular. Nos estágios iniciais ocorre a fibrilação do tecido meniscal acometendo primeiro a zona avascular, sendo o corno caudal do menisco a parte mais afetada e, com a permanência do estímulo nocivo, pode ocorrer subluxação e ruptura completa do menisco que altera a biomecânica e o ambiente articular, culminando com a DAD (MADRY *et al.*, 2012).

Clinicamente, as lesões nos meniscos têm uma distribuição bimodal; aquelas que acometem indivíduos jovens, ativos e com articulação saudável na qual o menisco eventualmente fica preso entre o côndilo femoral e o platô tibial sob forças excessivas. Nesses casos, o menisco geralmente sofre uma ruptura que é vertical e paralela às fibras de colágeno, sendo essa lesão a mais comum. Ainda, a ruptura pode ocorrer perpendicularmente às fibras de colágeno. Tanto a ruptura longitudinal (vertical e paralela às fibras) quanto à ruptura transversal (perpendicular às fibras), são sintomáticas e possuem tratamento cirúrgico, na grande maioria dos casos e, eventualmente, culminarão com o desenvolvimento de DAD na articulação em questão (ENGLUND *et al.*, 2009). Ainda existem aquelas que acometem indivíduos mais velhos, menos ativos e com uma articulação já doente, podendo ela ser sintomática ou não. Nesses casos, as lesões originam-se não de forças excessivas como na

situação supracitada, mas de forças normais e repetitivas agindo em um menisco já comprometido. As principais lesões encontradas nesses casos são rupturas horizontais, rupturas oblíquas (também chamadas de *flaps*), rupturas complexas (combinação de lesões), maceração ou a completa destruição (NOBLE & HAMBLEEN, 1975).

Outro ponto importante observado a ser considerado é que as lesões meniscais não são uniformes, sendo a porção caudal do menisco medial foi a mais afetada (MARTIG *et al.*, 2006; FRANKLIN *et al.*, 2010). Sabe-se que pela anatomia e biomecânica da articulação canina, o menisco medial é usualmente o mais afetado durante o deslocamento da tibia na ruptura do ligamento cruzado cranial. Isso ocorre uma vez que este é mais aderido à cápsula articular e não possui o ligamento meniscofemoral como o menisco lateral, dessa forma, o menisco medial não acompanha o movimento de deslocamento como o menisco lateral e, portanto, está mais propenso a sofrer a compressão (FRANKLIN *et al.*, 2010).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### *3.1. Aspectos éticos*

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações da legislação brasileira (Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), Resoluções Normativas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA/MCTI) através da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica e as Diretrizes de Prática da Eutanásia recomendada pelo CONCEA/MCTI. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), número de permissão: 82/2012.

#### *3.2. Seleção dos animais*

Foram utilizados seis cães, três machos e três fêmeas, castrados, sem raça definida, adultos, pesando entre 20 e 30 Kg, com idade estimada entre três e seis anos. Os animais foram alojados em baias individuais no Canil Experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Um período de adaptação de 30 dias foi realizado com cada animal. Eles receberam água *ad libitum* e ração comercial duas vezes ao dia. Ainda receberam tratamento contra ecto e endoparasitas.

A triagem dos animais foi feita baseada no exame clínico geral, ortopédico específico e radiográfico. Para o exame ortopédico, foi utilizado o sistema de pontuação proposto por Muzzi *et al.* (2009), requerendo apoio normal em estação, ausência de claudicação em

caminhada e corrida e ausência de crepitação à flexão e extensão da articulação femorotibio Patelar, o que corresponde ao valor 1 na referida escala que vai de 1 a 5.

### 3.3. Procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico, cada animal foi submetido a jejum sólido e líquido de 12 horas e recebeu terapia antimicrobiana profilática (cefazolina sódica 20 mg/kg, pela via intravenosa), 30 minutos antes da indução anestésica. Os animais foram sedados com associação de acepromazina (0,05 mg/kg) e sulfato de morfina (0,5 mg/kg), ambos pela via intramuscular. A indução anestésica foi realizada com propofol (6 mg/kg, pela via intravenosa) e a manutenção com isoflurano diluído em 100% de oxigênio pela via inalatória em circuito com reinalação parcial de gases. A fim de promover melhor analgesia trans e pós-operatória, foi feito um bloqueio regional pela associação de lidocaína (4 mg/kg), bupivacaína (1 mg/kg) e sulfato de morfina (0,1 mg/kg) pela via epidural.

Em procedimento asséptico, foi realizada a abordagem craniolateral da articulação femorotibio Patelar direita conforme descrito por Piermattei *et al.* (2009). Após a artrotomia lateral, o ligamento cruzado cranial foi identificado e rompido com auxílio de uma tesoura de Metzenbaum fina-fina e confirmado pelo deslocamento cranial da tíbia em relação ao fêmur (movimento de gaveta positivo).

A cápsula articular e o retináculo lateral foram suturados com fio de náilon 0, no padrão de Sultan. O tecido subcutâneo foi suturado com fio de ácido poliglicólico 2-0, padrão simples contínuo e, a pele foi suturada com fio de náilon 2-0, padrão Wolff.

No pós-operatório, os animais receberam cloridrato de tramadol (6 mg/kg) a cada oito horas, pela via subcutânea, durante cinco dias para analgesia. Por 10 dias pós-operatórios, a ferida cirúrgica foi higienizada, uma vez ao dia, com solução fisiológica estéril e foi feito um curativo com faixa de crepe e esparadrapo. Todos os animais usaram colar elisabetano nesse período. Ainda durante os 10 primeiros dias de pós-operatório, a ferida cirúrgica foi examinada quanto à hemorragia, secreção purulenta e deiscência de sutura, sendo classificada em presente ou ausente para cada parâmetro.

Durante todo o período experimental, os cães tinham acesso a um pátio de piso rugoso onde eram permitidos passeios guiados por coleira durante 15 minutos diários. Os cães eram estimulados a apoiar o membro operado e recebiam reforço positivo com petiscos e incentivo verbal toda vez que o faziam. Durante os passeios, eram realizados ciclos de cinco minutos compostos por caminhadas leves durante dois minutos seguidas por corridas leves por três minutos, sempre respeitando o limite do animal.

### 3.4. Análise anatomopatológica

Aos 60 dias pós-indução da DAD, os animais foram anestesiados conforme descrito anteriormente e uma nova artrotomia foi realizada para avaliação anatomopatológica e posterior coleta de fragmentos para análise histológica.

A avaliação anatomopatológica foi feita por meio da observação das lesões da superfície da cartilagem articular, na membrana sinovial e nos meniscos. Toda a análise anatomopatológica seguiu o sistema de pontuação proposto por Cook *et al.* (2010).

Em seguida, procedeu-se com a coleta dos côndilos femorais, platô tibial, meniscos e membrana sinovial para análise histológica. Depois de realizada a coleta, foi realizada a eutanásia dos animais por sobredose anestésica de propofol seguida por aplicação intravenosa de cloreto de potássio.

### 3.5. Análise histológica

A análise histológica da articulação e a graduação das lesões foram feitas com base nas orientações de análise propostas pela OARSI, conforme recomendação de Pritzker *et al.* (2006) e Cook *et al.* (2010). O processamento histológico seguiu as recomendações de Schmitz *et al.* (2010).

Para análise da superfície articular e da placa óssea subcondral foram consideradas quatro regiões de interesse: côndilo femoral medial (CFM), côndilo femoral lateral (CFL), platô tibial medial (PTM) e platô tibial lateral (PTL). De cada região de interesse da superfície articular, duas lâminas com distância de três milímetros entre si foram feitas e encaminhadas para coloração.

Seguindo as recomendações de Cook *et al.* (2010) e Schmitz *et al.* (2010), três colorações foram feitas: hematoxilina-eosina para análise da arquitetura tecidual e características celulares, Safranina O para análise do conteúdo de proteoglicanos e *Picrosirius red* para análise do conteúdo de colágeno. Está última foi analisada em microscópio com filtro de luz polarizada. Já o grau de lesão na superfície articular foi avaliado na coloração de hematoxilina-eosina e incluiu a eventual presença de fissuras ou erosões, e sua extensão, além da lesão nos condrócitos, incluindo agrupamento, necrose e perda celular. No tocante ao conteúdo de proteoglicanos, este foi avaliado pela coloração de Safranina O e consistiu na observação da diminuição da coloração referente a esse conteúdo dentro das zonas superficial, média e profunda da cartilagem articular. A análise do conteúdo de colágeno pela coloração de *Picrosirius red* consistiu na observação da perda da integridade do colágeno nas zonas superficial, média e profunda da cartilagem articular, enquanto que a

integridade da *tidemark* da cartilagem articular foi avaliada na coloração de Safranina O e consistiu na observação da sua eventual perda e/ou sua duplicação. Por fim, foi avaliada a placa óssea subcondral na coloração de Safranina O e sua espessura, em  $\mu\text{m}$ , foi mensurada no programa computacional *Micrometrics SE Premium*.

Para a análise da membrana sinovial, cortes histológicos foram realizados nas regiões medial e lateral da articulação e corados por hematoxilina-eosina. As características das células de revestimento (camada de células), a característica do revestimento (hiperplasia) e as características do infiltrado celular foram consideradas na avaliação.

A análise histológica dos meniscos lateral e medial foi feita em três fragmentos coletados de cada terço (cranial, médio e caudal), que foram avaliados quanto à arquitetura tecidual e resposta proliferativa na junção menisco-sinóvia, corados por hematoxilina-eosina, perda do conteúdo de proteoglicanos pela coloração de Safranina O e perda do conteúdo de colágeno pela coloração de *Picrosirius red*.

### 3.6. Análise dos dados

Após análise das duas lâminas das regiões de interesse da superfície articular, o grau de lesão atribuído a cada uma foi convertido em mediana e esse valor foi utilizado para atribuir o grau de lesão da região de interesse da superfície articular.

Para obtenção do grau de lesão da membrana sinovial, lateral e medial, e dos meniscos, lateral e medial, foi realizada a soma dos valores atribuídos a cada parâmetro analisado. No caso dos meniscos, ainda foram somados os valores atribuídos a cada região (cranial, média e caudal).

A escala máxima de lesão em cada parâmetro para cada região de interesse da articulação consistiu na soma dos valores máximos atribuídos a cada parâmetro analisado, conforme representado na tabela 1.

Para obtenção do grau de osteoartrite dos animais, primeiro dividiu-se a articulação em dois compartimentos transversais: medial e lateral; então foi realizada a soma da média dos valores atribuídos a cada estrutura presente em cada compartimento. O grau geral de DAD dos animais consistiu na soma dos valores atribuídos aos compartimentos medial e lateral.

Para fins de comparação nas estruturas analisadas, os valores máximos obtidos para cada região de interesse da articulação foram convertidos em porcentagem de acometimento dentro da escala máxima para cada região e analisados pelo teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

Os valores obtidos em cada região na análise anatomopatológica e para cada região de interesse da articulação na análise histológica foram analisados por ANOVA para medidas repetidas. Ainda foi realizado o teste de correlação de Spearman com os valores obtidos de cada análise e o teste de Wilcoxon para comparar os compartimentos medial e lateral.

Todos os testes foram realizados utilizando o programa *SigmaPlot* versão 11.0 e, para todos os testes realizados, o nível de significância considerado foi de 5%.

**Tabela 1:** Grau atribuído à severidade máxima das lesões em cada parâmetro de cada região de interesse na análise da indução da doença articular degenerativa no joelho de cães após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial na abordagem proposta pela Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (Adaptado de Cook *et al.*, 2010)

	Severidade máxima da lesão na superfície articular	Severidade máxima da lesão nos condrócitos	Severidade máxima da lesão nos proteoglicanos	Severidade máxima da lesão no conteúdo de colágeno	Severidade máxima da lesão na <i>tidemark</i>	Severidade máxima da lesão na placa óssea do osso subcondral	Severidade máxima em cada região de interesse
CFM	12	12	12	12	9	9	66
CFL	12	12	12	12	9	9	66
PTM	12	12	12	12	9	9	66
PTL	12	12	12	12	9	9	66
	Severidade máxima da lesão das <i>lining cells</i>			Severidade máxima do infiltrado inflamatório		Severidade máxima em cada região da membrana sinovial	
MSM		12			6		18
MSL		12			6		18
	Severidade máxima da perda tecidual e proliferação tecidual		Severidade máxima da lesão no proteoglicanos		Severidade máxima da lesão no conteúdo de colágeno		Severidade máxima em cada menisco
MM	18		9		9		36
ML	18		9		9		36
Grau máximo	372						

Legenda: CFM = côndilo femoral medial; CFL = côndilo femoral lateral; PTM = platô tibial medial; PTL = platô tibial lateral; MSM = membrana sinovial medial; MSL = membrana sinovial lateral; MM = menisco medial; ML = menisco lateral.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Análise clínica e anatomopatológica

Em nenhum momento pós-ruptura do ligamento cruzado cranial, algum animal apresentou hemorragia, deiscência ou qualquer tipo de secreção na ferida cirúrgica. Contudo, todos apresentaram dor leve durante os três primeiros dias a qual foi combatida com o uso de analgésico.

O exame ortopédico revelou ausência de crepitação durante todo o período experimental e claudicação variável. Na primeira semana, os animais apresentavam-se sem apoiar o membro operado, porém com reforço positivo e passeios diários, a partir do oitavo dia todos os animais estavam apoiando o membro operado. A partir do décimo quarto dia, o grau de claudicação estabilizou-se em dois (em uma escala máxima de cinco) para todos os animais, que segundo a escala proposta por Muzzi *et al.* (2009) corresponde a ausência de claudicação ao caminhar, mas claudicação intermitente ao correr. Todos os animais apresentaram o deslocamento cranial anormal da tíbia em relação ao fêmur no exame ortopédico (teste de gaveta positivo), típico da ruptura do ligamento cruzado cranial.

A análise anatomopatológica da cartilagem apresentou um escore de dois (em uma escala máxima de quatro) para as quatro regiões de interesse: côndilo femoral medial (CFM), côndilo femoral lateral (CFL), platô tibial medial (PTM) e platô tibial lateral (PTL). Tal escore refere-se à fibrilações superficiais e focais de espessura parcial na cartilagem articular dessas regiões como proposto por Cook *et al.* (2010). Não houve diferença quanto ao grau de acometimento das estruturas ( $p > 0,05$ ).

Já a análise anatomopatológica da membrana sinovial revelou que todos os animais apresentaram algum grau de lesão, variando entre um a cinco (em uma escala de zero a cinco) tanto na porção lateral quanto na medial. Não houve diferença entre o acometimento da porção medial e da porção lateral, ou seja, ambas as porções foram afetadas de forma semelhante ( $p > 0,05$ ). Ainda, as lesões observadas na membrana sinovial apresentaram a mediana de dois, o que, no sistema de avaliação proposto por Cook *et al.* (2010) refere-se a um envolvimento difuso com discreta descoloração, apresentando espessamento evidente e notável aumento da vascularização.

A análise anatomopatológica dos meniscos apresentou mediana igual à zero (em uma escala que varia de zero a cinco) e não houve diferença quanto ao grau de lesão entre os terços cranial, médio e caudal, tanto do menisco medial quanto do lateral ( $p > 0,05$ ). A mediana de zero corresponde a nenhuma lesão macroscópica visível.

No presente estudo, nenhuma lesão macroscópica foi observada nos meniscos, mas esperava-se que diante do modelo utilizado, algum grau de lesão fosse encontrado. Durante o deslocamento cranial anormal da tíbia em relação ao fêmur, como consequência da ruptura do ligamento cruzado cranial, o menisco fica aprisionado entre côndilo femoral e o platô tibial, o que acarretaria algum grau de lesão (MARTIG *et al.*, 2006). Portanto, era esperado que forças compressivas e de cisalhamento agissem sobre o menisco, causando lesões macroscópicas nos meniscos. Contudo, a falta de lesões meniscais macroscópicas pode ser explicada pela natureza da lesão, ou seja, primeiro o menisco passa por um processo degenerativo com desarranjo das fibras, como visto na análise histológica que, posteriormente, causará uma lesão macroscópica.

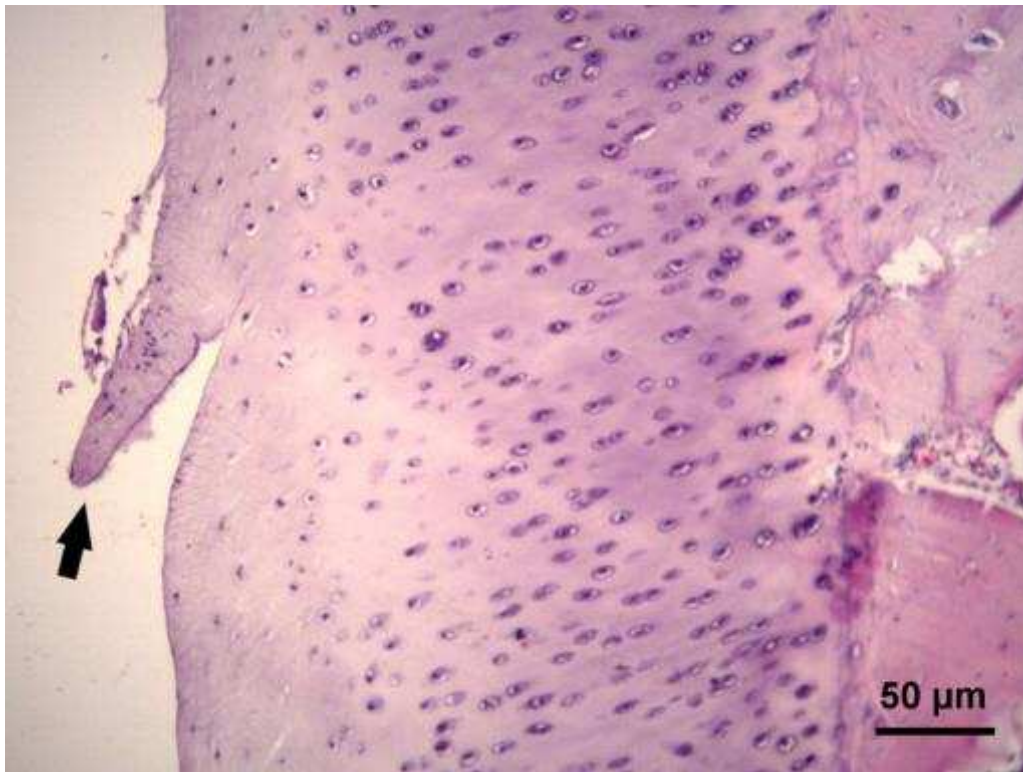
#### 4.2. Análise histológica da superfície articular e dos condrócitos

A análise histológica da superfície articular revelou uma mediana de nove (em uma escala de severidade máxima de 48) não havendo diferenças entre o grau de acometimento ( $p > 0,05$ ) para todas as regiões de interesse.

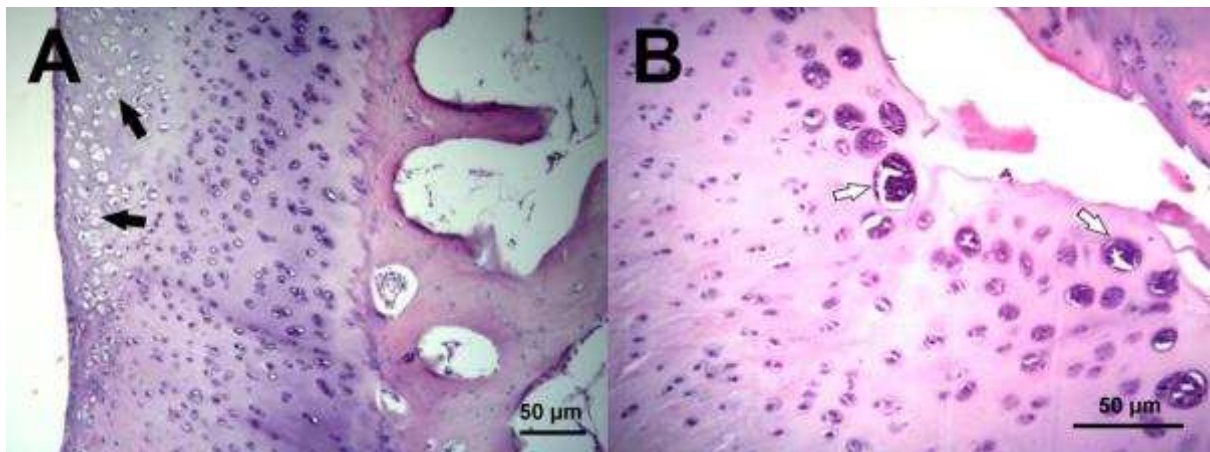
A mediana de nove, nesse estudo, corresponde a um comprometimento multifocal da cartilagem articular apresentando fissuras restritas a zona superficial e ondulações na superfície cartilaginosa. A figura 1 exemplifica o resultado encontrado na análise histológica da superfície articular.

A ocorrência de fissuras na zona superficial da cartilagem articular é um achado esperado nos modelos de indução da DAD, incluindo a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial (MAERZ *et al.*, 2016) e tal fato parece estar diretamente relacionado a saúde dos condrócitos. Elsaid *et al.* (2015) demonstraram que na ruptura experimental do ligamento cruzado cranial, citocinas pró-inflamatórias diminuem a produção de lubricina e este correlaciona-se diretamente com a ocorrência de fissuras na zona superficial. Dessa forma, o modelo de indução por ruptura do ligamento cruzado cranial em cães, ao final do período de avaliação, foi capaz de produzir alterações no funcionamento dos condrócitos, provavelmente alterando a produção de lubricina, a ponto de fissuras aparecerem na zona superficial das regiões articulares analisadas.

A análise dos condrócitos revelou perda celular na zona superficial com eventuais agrupamentos de duas a três células, tendo um acometimento focal na cartilagem articular (Figura 2). Essa alteração corresponde a uma mediana de quatro (em uma escala de severidade de 48) também para todas as regiões de interesse ( $p > 0,05$ ).



**Figura 1:** Fotomicrografia da superfície articular do platô tibial lateral de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. Notar a presença de uma fissura restrita a zona superficial (seta preta). Hematoxilina-eosina.



**Figura 2:** Fotomicrografia da superfície articular do platô tibial lateral (A) e medial (B) de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. A. Notar lacunas vazias evidenciando perda celular na zona superficial e presença de pequenos agrupamentos celulares (seta preta).

Hematoxilina-eosina. B. Notar a presença de grandes agrupamentos celulares com presença de necrose (seta branca). Hematoxilina-eosina.

Neste experimento, o fator agressor (a sobrecarga focal devido instabilidade articular promovida pela ruptura do ligamento cruzado cranial) é um fenômeno contínuo e, portanto, houve uma resposta evidente do tecido na tentativa de adaptar-se ao novo sistema de forças a que estava exposto, por exemplo, o agrupamento de condrócitos. Sabe-se que tal fenômeno é uma resposta fisiológica a uma agressão sofrida pela cartilagem articular na tentativa de adaptação ao processo agressor através de um processo hiperplásico (LOTZ *et al.*, 2010). Contudo, a ineficiência dos condrócitos em produzir uma matriz competente diante da continuidade do processo agressor apenas piora o estado do tecido, o que somado à continuidade da agressão, amplifica a lesão ao tecido cartilaginoso.

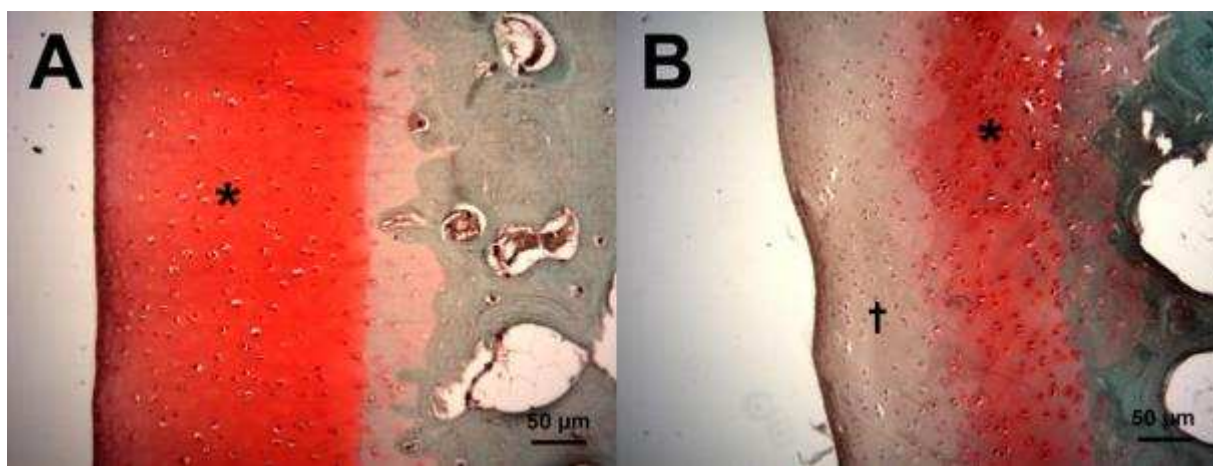
Ainda, no presente estudo, a observação de agrupamentos não foi tão evidente quanto a relatada por outros estudos (HOSHIYAMA *et al.*, 2015), porém, diferente do descrito por outros autores (MARTIG *et al.*, 2006), neste estudo, aos 60 dias, as respostas teciduais aqui observadas ocorreram diante de um apoio espontâneo e gradual, respeitando o limite individual de cada um e não de forma forçada, o que poderia induzir uma resposta mais severa.

É importante notar que a hiper celularidade em resposta a agressão tem curta duração no processo adaptativo do tecido cartilaginoso, sendo seguida pelo processo de hipocelularidade em um evento sequencial, conforme relatado por SHEN *et al.* (2015). Portanto, a baixa observação de agrupamentos e a observação mais proeminente de lacunas vazias no presente estudo poderiam indicar que aos 60 dias após a indução da ruptura do ligamento cruzado cranial como modelo indutor de DAD, a ocorrência de hipocelularidade é um evento primário quando comparado ao agrupamento, ou seja, sugere-se que neste modelo, a resposta celular dos condrócitos não é um evento sequencial, mas sim um evento independente relacionado à sobrecarga articular promovida pela instabilidade articular, no entanto, é necessário o estudo seriado para confirmar esse hipótese.

White e Lowe (2009) demonstraram que diante de um alto estresse metabólico, as células podem iniciar o processo de autofagia, como um mecanismo protetor. Diante disso, pode-se considerar que os condrócitos podem ter regulado seu metabolismo diminuindo o consumo e priorizando a síntese de componentes da matriz cartilaginosa, ou seja, organizando uma resposta adaptativa.

#### 4.3. Análise histológica do conteúdo de proteoglicanos e colágeno

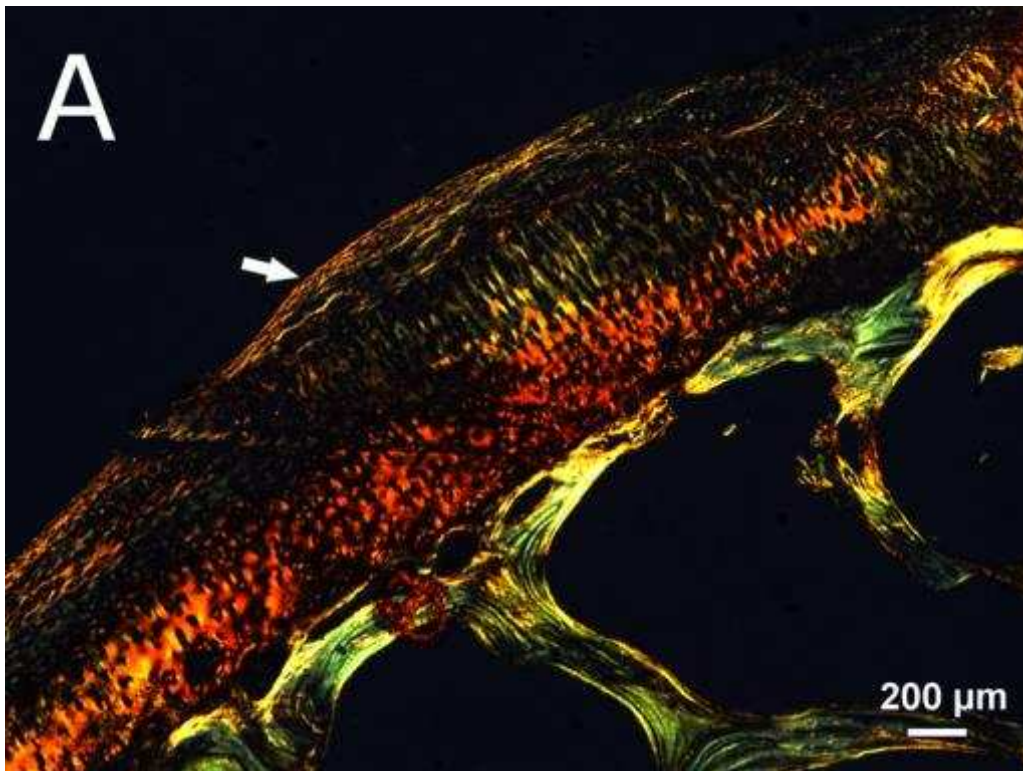
A avaliação histológica do conteúdo de proteoglicanos revelou uma mediana de 12 (em uma escala de severidade de 48) para todas as regiões de interesse e sem diferenças entre elas ( $p > 0,05$ ). Tal escore corresponde a perda global do conteúdo de proteoglicanos até a zona média da cartilagem articular caracterizado na figura 3. O mesmo resultado foi observado para o conteúdo de colágeno, ou seja, a perda da integridade do colágeno até a zona média da cartilagem articular (Figura 4), porém, a mediana para esse parâmetro foi de 24 em uma escala de severidade de até 36.



**Figura 3:** Fotomicrografia da superfície articular do côndilo femoral lateral (A) e medial (B) de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. A. Conteúdo normal de proteoglicanos nas diferentes zonas da cartilagem articular (\*). Safranina O. B. Notar a perda do conteúdo de proteoglicanos e da coloração característica (†) em toda a zona superficial e parte da zona média da cartilagem articular superfície articular (\*). Safranina O.

A perda de proteoglicanos (até a zona média) foi mais marcante do que a perda de condrócitos (até a zona superficial), sugerindo que possivelmente, os condrócitos tiveram um papel inicial importante na degradação do proteoglicano, de início liberando fatores que contribuíram para sua degradação de forma mais proeminente do que produzindo as moléculas que compõem o proteoglicano. Além do mais, a degradação dos proteoglicanos pode ter sido acelerada pela falta do componente celular que os produzia, devido ao fenômeno de hipocelularidade já discutido anteriormente. É importante considerar que existe um mecanismo de transdução mecânica entre a matriz extracelular e os condrócitos, de maneira que o dano à matriz extracelular incita um aumento do catabolismo nos condrócitos em detrimento do efeito anabólico (KIM *et al.*, 2015), ou seja, a matriz extracelular da cartilagem

articular possui um papel importante no agravamento da degradação de seus próprios componentes ao contribuir para o desarranjo funcional dos condrócitos.



**Figura 4:** Fotomicrografia da superfície articular do platô tibial medial de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. A. Perda do arranjo natural do colágeno sinalizado pela coloração amarelo-esverdeada na zona superficial (seta branca) e esverdeada na zona média da cartilagem articular. *Picrosirius red*.

Sabe-se que o gel de proteoglicanos e a rede de fibras de colágeno presente na matriz extracelular cartilaginosa formam uma membrana semissólida permeável a água e que combina as propriedades de cada um dos elementos que a compõe, atingindo uma propriedade diferente e superior a aquela observada nos elementos quando separados, logo, agem como um compósito natural da cartilagem articular e, como tal, quando há desarranjo em algum desses seus componentes, a estrutura perde a função. Portanto, possivelmente, a severidade dos resultados encontrados para esses dois componentes deva-se a íntima relação entre um e outro.

É relevante ponderar ainda que a perda da integridade da matriz cartilaginosa também é o resultado do novo regime de forças ao qual o tecido está submetido. Rundhaug (2005) relata que a degradação da matriz extracelular é um evento em resposta a lesão da cartilagem

articular a fim de facilitar a angiogênese, importante para processos reparativos. Contudo, sabe-se que a invasão vascular da cartilagem articular ativa centros de ossificação secundária, sendo, a calcificação do tecido cartilaginoso, um dos estágios finais da DAD. A falta da formação de osteófitos, neste estudo, indica que a invasão vascular não ocorreu, portanto, a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial, aos 60 dias, não é capaz de levar a DAD a esse estágio.

#### 4.4. Análise histológica da *tidemark*

Houve perda da continuidade ou duplicação da *tidemark* da cartilagem articular de forma multifocal nas regiões analisadas como mostra a figura 5, sem diferença entre as regiões ( $P > 0,05$ ), sendo a duplicação, mais evidente do que a ruptura. Essa característica corresponde a uma mediana de oito (em uma escala de 36) pelo sistema de análise utilizado.

A ruptura da *tidemark* representa uma das etapas finais da reposta do tecido cartilaginoso a um estímulo agressor, uma vez que representa caminho livre para invasão vascular e calcificação do tecido. Posto isso, a *tidemark* duplicada, como observado neste estudo, indica que o tipo de estímulo provocado pela ruptura do ligamento cruzado cranial demora mais de 60 dias para desenvolver a ruptura dela.

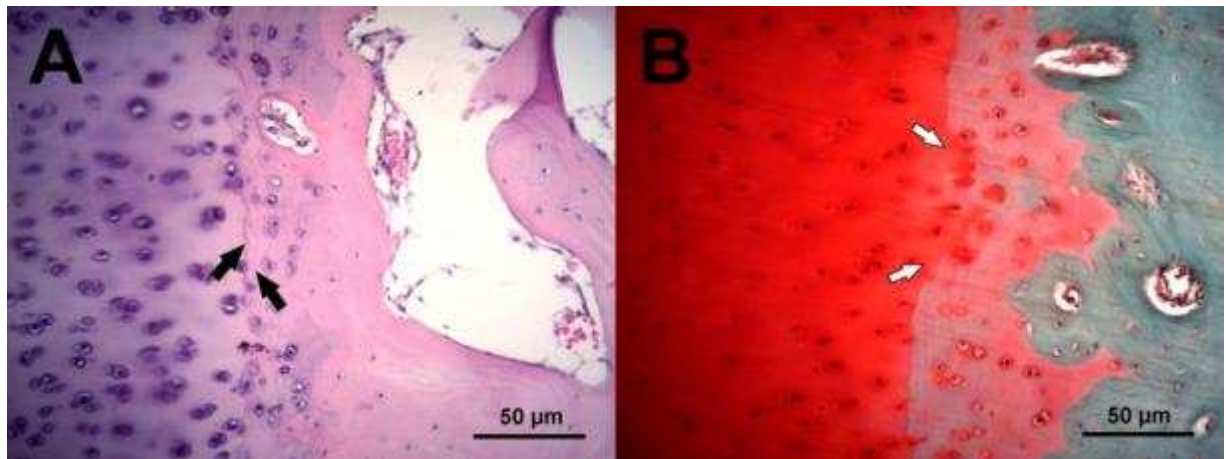
Todavia, Stoppiello *et al.* (2014) relataram que a ruptura da *tidemark* é um estágio final da DAD sendo precedido pela duplicação e Mapp *et al.* (2010) afirmaram que quando tal evento acontece, fatalmente, o indivíduo apresentará sinais clínicos. Portanto, é possível considerar que aos 60 dias de indução da DAD, apesar da ausência de sinais clínicos, graus leves de alteração na superfície articular e alterações moderadas no conteúdo de colágeno e proteoglicanos, o grau de severidade de lesão na *tidemark*, quando presente, foi intenso.

#### 4.5. Análise histológica da placa óssea subcondral

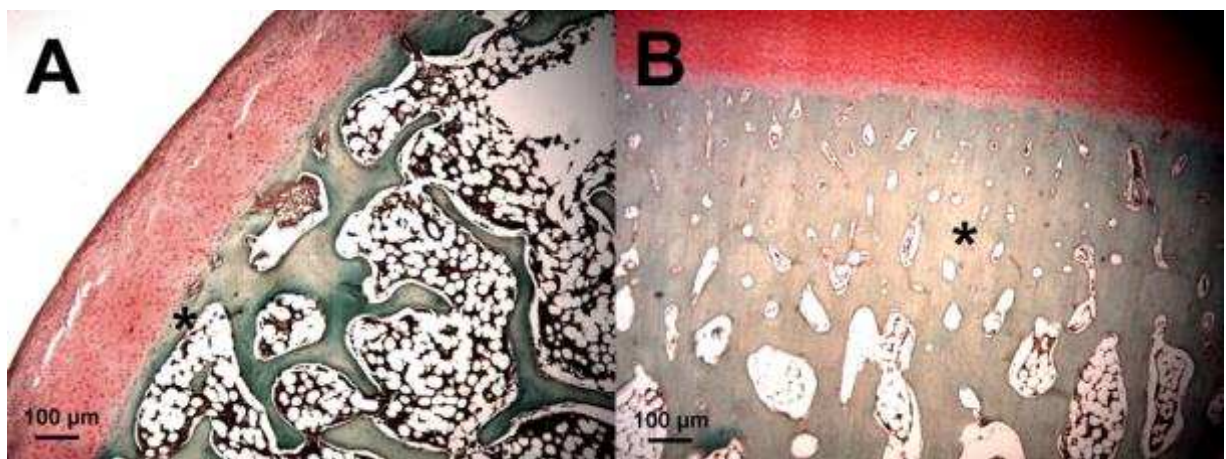
A placa óssea subcondral apresentou-se moderadamente aumentada (entre 450 a 750  $\mu\text{m}$ ) de forma global (Figura 6). Essa característica corresponde a um escore de 24 (em uma escala de severidade máxima de 36) pelo sistema de avaliação utilizado.

O aumento da espessura do osso subcondral é uma resposta esperada diante do estresse mecânico, porém, é importante considerar que esse osso é significativamente mais fraco do que aqueles em situações de normalidade como relataram Li e Aspden (1997). Portanto, o aumento da espessura pode ter ocorrido como uma resposta a baixa mineralização óssea e não propriamente ao estímulo agressor.

Ainda é importante pensar que a alteração na placa óssea subcondral também é um dos estágios finais da DAD (WALSH *et al.*, 2010), assim como a ruptura da *tidemark*, portanto, mesmo que os 60 dias de ruptura do ligamento cruzado cranial não tenham sido suficientes para causar lesões severas em parâmetros clássicos como a superfície articular e os condrócitos, eles foram capazes de causar danos consideráveis a placa óssea subcondral.



**Figura 5:** Fotomicrografia da superfície articular do platô tibial lateral (A) e do medial (B) de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. A. Notar a *tidemark* da cartilagem articular duplicada (seta preta). Hematoxilina-eosina. B. Notar a ruptura da *tidemark*, caracterizada pela da continuidade dessa estrutura na cartilagem articular (setas brancas). Safranina O.

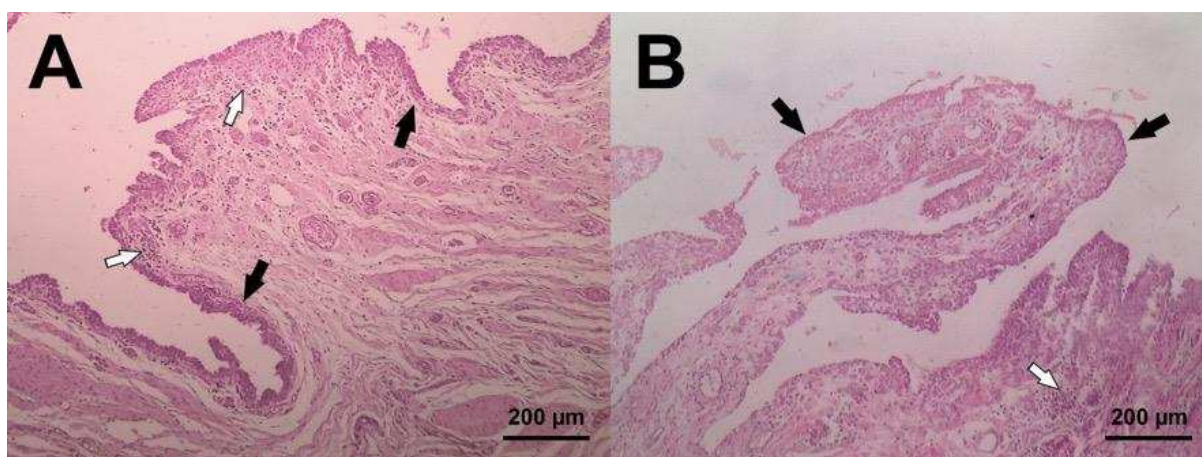


**Figura 6:** Fotomicrografia da superfície articular do côndilo femoral lateral (A) e do medial (B) de um cão 60 dias após a ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. A. Notar a placa óssea subcondral com

espessura normal de até 300  $\mu\text{m}$  (\*). Safranina O. B. Notar moderado aumento da espessura da placa óssea subcondral, sendo nessa amostra obtido o valor de 523  $\mu\text{m}$  (\*). Safranina O.

#### 4.6. Análise histológica da membrana sinovial

Na análise histológica da membrana sinovial, não houve diferença entre as porções medial e lateral ( $p > 0,05$ ), sendo que ambas apresentaram uma mediana de dois em uma escala de severidade máxima de seis para cada parâmetro analisado. Tal escore corresponde à presença de pequenas vilosidades de distribuição multifocal, aumento da espessura do revestimento (entre três e seis células) e moderado infiltrado inflamatório caracterizado como linfo-histiocitário. Os resultados da análise histológica da membrana sinovial estão representados na figura 7.



**Figura 7:** Fotomicrografias da membrana sinovial de cães após 60 dias de ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. A. Porção medial da membrana sinovial, com hiperplasia da camada de células de revestimento (setas pretas), discreta formação de vilosidades e infiltrado difuso de células inflamatórias (setas brancas). Hematoxilina-eosina. B. Porção lateral da membrana sinovial, notar maior formação de vilosidades, com pouca hiperplasia da camada de revestimento (setas pretas) e infiltrado inflamatório linfo-histiocitário moderado localizado (seta branca). Hematoxilina-eosina.

Resultados semelhantes foram encontrados por Lemburg *et al.* (2004) na membrana sinovial de cães com ruptura espontânea do ligamento cruzado cranial. Esses autores discutem que células, tipicamente linfócitos B, migrariam para a membrana sinovial durante um processo inicial de sinovite. A partir de então, essas células passariam a adquirir um caráter de

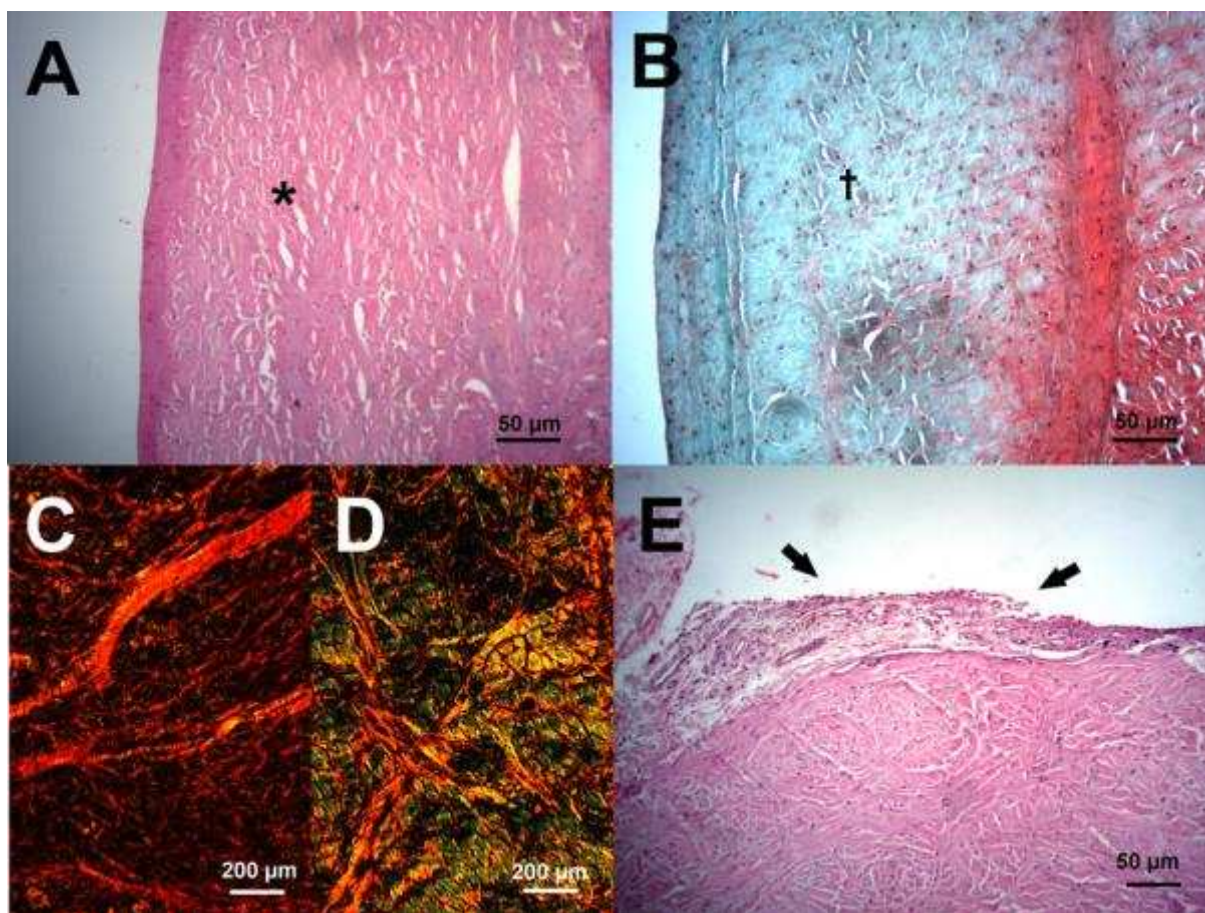
células produtoras de imunoglobulinas e que esse fato pode estar associado à liberação de autoantígenos, por exemplo, para o colágeno presente na matriz extracelular da cartilagem articular ou para os próprios condrócitos ali presentes, agravando a lesão cartilaginosa, ou seja, justamente pela função que desempenha (nutrição dos condrócitos através do líquido sinovial) a membrana sinovial contribui para o ciclo vicioso e progressivo da DAD carregando citocinas e imunoglobulinas produzidas pelo infiltrado inflamatório sinovial que agravam a degeneração cartilaginosa, piorando a sobrecarga articular. Com isso, mais debris são liberados no líquido sinovial e a sinovite se agrava ainda mais.

Portanto, é possível inferir que a membrana sinovial apresentou um papel perpetuador da DAD, ou seja, mesmo que ela não tenha sido a responsável direta pelo início da DAD, pode ter contribuído para a sua perpetuação e progressão, inclusive para as lesões em outros componentes articulares.

#### *4.7. Análise histológica dos meniscos*

Todos os animais apresentaram alterações microscópicas nos meniscos, tanto medial quanto lateral, sendo as alterações uniformes em todas as regiões, cranial, média e caudal ( $p > 0,05$ ). A mediana para a arquitetura tecidual do menisco foi de seis em uma escala de severidade máxima que varia de zero a nove, ou seja, uma perda moderada do arranjo tecidual com discreta perda tecidual (Figura 8A). Também houve moderada perda do conteúdo de proteoglicanos (Figura 8B) e colágeno (Figura 8C e 8D) nos meniscos, sendo que em ambos os parâmetros a mediana foi seis em uma escala máxima de nove. A resposta proliferativa na junção menisco-sinóvia foi média e apareceu em menos de um terço das lâminas analisadas (Figura 8E).

De todas as estruturas analisadas por histologia, os meniscos apresentaram-se, em relação aos outros componentes analisados, proporcionalmente, o grau mais severo de acometimento ( $p < 0,005$ ), conforme demonstrado na figura 9.



**Figura 8:** Fotomicrografias dos meniscos de cães após 60 dias de ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. A. Porção média do menisco medial com marcada perda tecidual (\*). Hematoxilina-eosina. B. Porção cranial do menisco medial com marcada perda do conteúdo de proteoglicanos (†). Safranina O. C. Porção caudal do menisco lateral com conteúdo normal de colágeno. *Picrosirius red*. D. Porção cranial do menisco medial com marcado desarranjo do conteúdo de colágeno. *Picrosirius red*. E. Porção caudal do menisco lateral com discreta proliferação tecidual na junção menisco-sinóvia (seta preta). Hematoxilina-eosina.

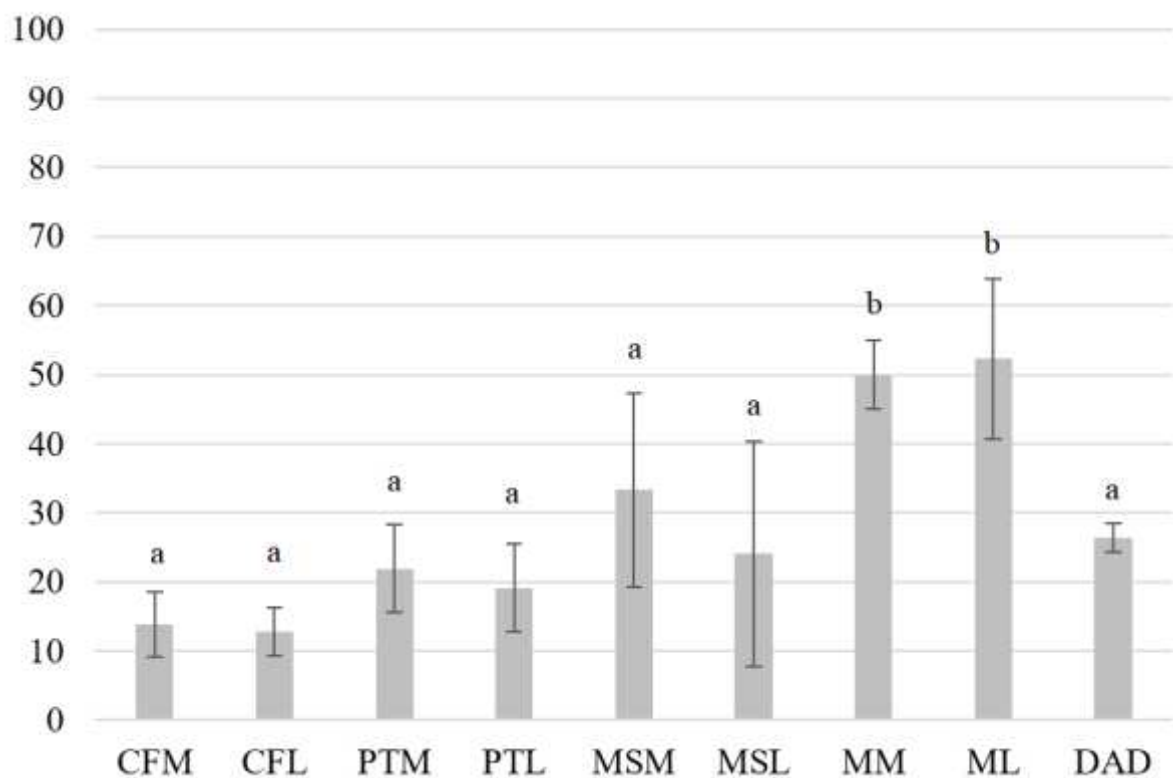
Era esperado que o menisco medial fosse o mais comprometido diante da instabilidade articular promovida pelo ligamento cruzado cranial e pelos componentes anatómicos do joelho canino (FRANKLIN *et al.*, 2010). Porém, aos 60 dias pós-ruptura do ligamento cruzado cranial, isso não foi observado. Kuroki *et al.* (2011), ao comparar três métodos diferentes de indução cirúrgica de DAD em cães, observaram que, no modelo da ruptura do ligamento cruzado cranial, após 12 semanas, o compartimento lateral foi o mais acometido, mas não foi possível explicar essa diferença. Teeple *et al.* (2013) comentam que o modelo animal ideal deve ser acometido de maneira uniforme a fim de facilitar a interpretação dos

resultados e diminuir as possíveis variações dentro de um modelo experimental. Dessa forma, acredita-se que a ocorrência uniforme de lesões neste trabalho é um fator desejável, garantindo a padronização do modelo.

#### 4.8. Grau geral de doença articular degenerativa e acometimento geral das estruturas analisadas

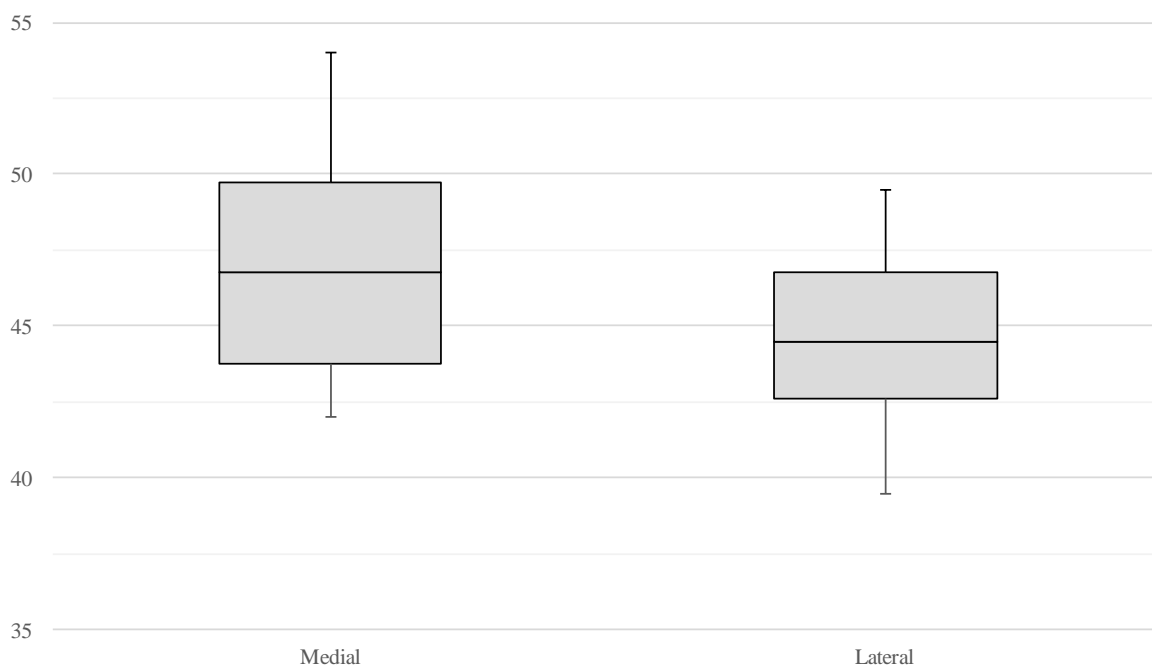
A mediana do grau geral da DAD induzida nos animais foi 92 em uma escala máxima de 372. Os compartimentos medial e lateral foram acometidos de forma semelhante, não havendo diferença entre o grau de acometimento entre eles ( $p > 0,05$ ).

O grau geral de todas as estruturas analisadas e o grau geral da DAD estão na figura 9. Já os resultados para o grau geral dos compartimentos medial e lateral estão na figura 10. A tabela 2 apresenta os resultados em porcentagem de acometimento de cada estrutura analisada.



**Figura 9:** Média e desvio-padrão das estruturas presentes na articulação femorotibiopatelar e grau geral de doença articular induzida de cães após 60 dias de ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. Legenda: CFM = côndilo femoral medial; CFL = côndilo femoral lateral; PTM = platô tibial medial; PTL = platô tibial lateral; MSM = membrana sinovial medial; MSL =

membrana sinovial lateral; MM = menisco medial; ML = menisco lateral; DAD = doença articular degenerativa; letras iguais não diferem estatisticamente; letras diferentes diferem estatisticamente ( $p < 0,005$ ).



**Figura 10:** *Box plot* dos valores para os compartimentos medial e lateral das estruturas presentes na articulação femorotibiopateral de cães após 60 dias de ruptura experimental do ligamento cruzado cranial como modelo de indução cirúrgica de doença articular degenerativa. Não houve diferença quanto ao grau de acometimento entre os compartimentos ( $P > 0,05$ ).

No presente estudo, a opção pela ruptura do ligamento cruzado cranial como método indutor ocorreu pela alta prevalência que essa lesão apresenta na medicina veterinária, particularmente em cães (COOK, 2010) e que refletisse um desenvolvimento mais natural da doença articular degenerativa.

Ainda se optou, nesse estudo, por seguir o recomendado pela OARSI e abordar a articulação como um órgão. Apesar de inúmeros trabalhos publicados no escopo da doença articular degenerativa, poucos efetivamente usam uma metodologia completa como a proposta por Cook *et al.* (2010). Os próprios autores, ao descrevem a metodologia, citam que há uma dificuldade em utilizá-la integralmente já que, ao se fazer isso, colocar-se-ia sobre alguns componentes articulares um peso maior na análise do grau geral da doença, o que contradiz a própria abordagem da articulação como um órgão, que dá a mesma importância a todos os componentes articulares; porém, ainda neste mesmo trabalho, Cook *et al.* (2010) recomendam

que se opte por aqueles elementos articulares que se relacionam ao objetivo do estudo. Como o objetivo do presente trabalho inclui o estudo do desenvolvimento da doença articular degenerativa abordando tecidos negligenciados, como a membrana sinovial e meniscos, e tecidos classicamente estudados, como a cartilagem articular e osso subcondral, optou-se pelo estudo de todos os componentes a fim de promover um estudo completo do órgão articulação.

**Tabela 2:** Porcentagem e mediana de acometimento de cada região analisada da articulação do joelho de cães após 60 dias da ruptura experimental do ligamento cruzado cranial utilizando o sistema de avaliação proposto pela Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (Adaptado de Cook *et al.*, 2010), bem como o grau geral de doença articular degenerativa encontrado

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Animal 5	Animal 6
CFM	19,70	12,88	10,61	14,39	6,82	11,36
CFL	13,64	12,88	14,39	8,33	6,82	13,64
PTM	22,73	18,18	12,88	15,91	20,45	29,55
PTL	17,42	17,42	12,12	12,12	28,03	17,42
MSM	5,56	44,44	33,33	38,89	38,89	38,89
MSL	11,11	11,11	38,89	50,00	16,67	16,67
MM	52,78	41,67	52,78	55,56	47,22	50,00
ML	69,44	47,22	36,11	61,11	50,00	50,00
DAD	28,30	24,86	23,42	28,02	25,29	28,30

Legenda: CFM = côndilo femoral medial; CFL = côndilo femoral lateral; PTM = platô tibial medial; PTL = platô tibial lateral; MSM = membrana sinovial medial; MSL = membrana sinovial lateral; MM = menisco medial; ML = menisco lateral; DAD = doença articular degenerativa.

## 5. CONCLUSÃO

Aos 60 dias pós-ruptura do ligamento cruzado cranial, os tecidos articulares do joelho dos cães promove, dentro da escala proposta pela OARSI, um grau de lesão discreta, apresentando lesões uniformes, não havendo diferença entre os compartimentos medial e lateral. Além disso, lesões macroscópicas também foram consideradas discretas, com exceção dos meniscos que não apresentaram qualquer sinal de lesão macroscópica. As alterações microscópicas foram percebidas em todos os parâmetros analisados.

A ruptura experimental do ligamento cruzado cranial, aos 60 dias, estimula uma resposta de hipocelularidade mais evidente do que o agrupamento dos condrócitos.

A matriz extracelular cartilaginosa que funciona como um compósito natural do tecido cartilaginoso sofreu alterações consideradas moderadas, sendo o gel proteoglicano mais acometido do que a rede de fibras de colágeno.

Ainda foi possível observar a duplicação da *tidermark* e aumento da espessura da placa óssea subcondral.

Por fim, o modelo de indução por ruptura do ligamento cruzado cranial em cães aos 60 dias não é útil para que o estudo de lesões macroscópicas seja feito, porém, permite avaliar a ocorrência de lesões microscópicas nos componentes articulares da articulação femorotibiopatelar de cães utilizando a abordagem da articulação como um órgão da OARSI.

## REFERÊNCIAS

AIGNER, T.; COOK, J.L.; GERWIN, N.; GLASSON, S.S.; LAVERTY, S.; LITTLE, C.B.; McILWRAITH, W.; KRAUS, V.B. Histopathology atlas of animal model systems e overview of guiding principles. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p.S2-S6, 2010.

ARNER, E.C.; HUGHES, C.E.; DECICCO, C.P.; CATERSON, B.; TORTORELLA, M.D. Cytokine-induced cartilage proteoglycan degradation is mediated by aggrecanase. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.6, p.214–228, 1998.

BERENBAUM, F.; EYMARD, F.; HOUARD, X. Osteoarthritis, inflammation and obesity. **Current Opinion in Rheumatology**, v.25, p.114-118, 2012.

BERTRAND, J.; CROMME, C.; UMLAUF, D.; FRANK, S.; PAP, T. Molecular mechanisms of cartilage remodeling in osteoarthritis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.42, p.1594-1601, 2010.

BILLINGHURST, R.C.; DAHLBERG, L.; IONESCU, M.; REINER, A.; BOURNE, R.; RORABECK, C.; MITCHELL, P.; HAMBOR, J.; DIEKMANN, O.; TSCHESCHE, H.; CHEN, J.; van WART, H.; POOLE, A.R. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, p.1534-45, 1997.

BONDE, H.V.; TALMAN, M.L.M.; KOFOED, H. The area of the tidemark in osteoarthritis – a three-dimensional stereological study in 21 patients. **APMIS**, v.113, p.349-352, 2005.

BOUDERLIQUE, T.; VUPPALAPATI, K.K.; NEWTON, P.T.; LI, L.; BARENIUS, B.; CHAGIN, A.S. Targeted deletion of Atg5 in chondrocytes promotes age-related osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.75, p.627-631, 2016.

CHARLIER, E.; RELIC, B.; DERoyer, C.; MALAISE, O.; NEUVILLE, S.; COLLÉE, J.; MALAISE, M.G.; DE SENY, D. Insights on molecular mechanisms of chondrocytes death in osteoarthritis. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.1-36, 2016.

COOK, J.L. Cranial cruciate ligament disease in dogs: biology versus biomechanics. **Veterinary Surgery**, v.39, p.270-277, 2010.

COOK, J.L.; KUROKI, K.; VISCO, D.; PELLETIER, J.P.; SCHULZ, L.; LAFEVER, F.P.J.G. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the dog. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p.S66-S79, 2010.

DAHLBERG, L.; BILLINGHURST, C.; MANNER, P.; IONESCU, M.; REINER, A.; TANZER, M.; ZUKOR, D.; CHEN, J.; van HART, H.E.; POOLE, A.R. Collagenase-mediated cleavage of type II collagen is selectively enhanced in osteoarthritis cartilage and can be arrested with a synthetic inhibitor which spares collagenase-1 (MMP-1). **Arthritis & Rheumatism**, v.43, p.673,682, 2000.

DAY, J.; DING, M.; van der LINDEN, J. A decreased subchondral trabecular bone tissue elastic modulus is associated with pre-arthritic cartilage damage. **Journal of Orthopaedic Research**, v.19, p.914-918, 2001.

ENGLUND, M.; GUERMAZI, A.; LOHMANDER, L.S. The meniscus in knee osteoarthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v.35, p.579-590, 2009.

ELSAID, K.A.; ZHANG, L. SHAMAN, Z.; PATEL, C.; SCHMIDT, T.A.; JAY, G.D. The impact of early intra-articular administration of interleukin-1 receptor antagonist on lubricin metabolism and cartilage degeneration in an anterior cruciate ligament transection model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.23, p.114-121, 2015.

FELSON, D.T. Osteoarthritis as a disease of mechanics. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.21, p.10-15, 2013.

FIGUEIRA NETO, E.M.; QUELUZ, T.T.; FREIRE, B.F.A. Atividade física e sua associação com qualidade de vida em pacientes com osteoartrite. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.51, p.539-549, 2011.

FRANKLIN, S.P.; GILLEY, R.S.; PALMER, R.H. Meniscal injury in dogs with cranial cruciate ligament rupture. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, v.10, p.E1-E11.

GOGGS, R.; CARTER, S.D.; SCHULZE-TANZIL, G.; SHAKIBAEI, M.; MOBASHERI, A. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, v.166, p.140-158, 2003.

GOLDRING, M.; GOLDRING, S. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1192, p.230-237, 2010.

GOLDRING, S.R. Role of bone in osteoarthritis pathogenesis. **Medical Clinics North America**, v.93, p.25-35, 2009.

GROGAN, S.P.; MIYAKI, S.; ASAHARA, H.; D'LIMA, D.D.; LOTZ, M.K. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.11, p.R85, 2009.

HELLIO, L.G.M.P.; SCIORE, P.; EGGERER, J.; RATTNER, J.P.; VIGNON, E.; BARCLAY, L.; HART, D.A.; RATTNER, J.B. Formation and phenotype of cell clusters in osteoarthritic meniscus. **Arthritis & Rheumatology**, v.44, p.1808-18, 2001.

HOLLANDER, A.P.; HEATHFIELD, T.F.; WEBBER, C.; IWATA, Y.; BOURNE, R.; RORABECK, C.; POOLE, A.R. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic cartilage detected by a new immunoassay. **Journal of Clinical Investigation**, v.93, p.1722-1732, 1994.

HOSHIYAMA, Y.; OTSUKI, S.; ODA, S.; KUROKAWA, Y.; NAKAJIMA, M.; JOTOKU, T.; TAMURA, R.; OKAMOTO, Y.; LOTZ, M.K.; NEO, M. Expression pattern and role of chondrocyte clusters in osteoarthritic human knee cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v.33, p.548-555, 2015.

INTEMA, F.; HAZEWINKEL, H.A.; GOUWENS, D.; BIJLSMA, J.W.; WEINANS, H.; LAFEBER, F.P.; MASTBERGEN, S.C. In early OA, thinning of the subchondral plate is directly related to cartilage damage: results from a canine ACLT-meniscectomy model. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p.691-698, 2010.

KIM, J.H.; LEE, G.; WON, Y.; LEE, M.; KWAK, J.S.; CHUN, C.H.; CHUN, J.S. Matrix cross-linking-mediated mechanotransduction promotes posttraumatic osteoarthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.112, p.9424-9429, 2015.

KOURI, J.B.; JIMENEZ, S.A.; QUINTERO, M.; CHICO, A. Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.4, p.111-125, 1996.

KUROKI, K.; COOK, C.R.; COOK, J.L. Subchondral bone changes in three different canine models of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.19, p.1142-1149, 2011.

LEMBURG, A.K.; MEYER-LINDENBERG, A.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M. Immunohistochemical characterization of inflammatory cell populations and adhesion molecule expression in synovial membranes from dogs with spontaneous cranial cruciate ligament rupture. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.3, p.231-240, 2004.

LI, B.; ASPDEN, R.M. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.12, p.641-651, 1997.

LI, G.; YIN, J.; GAO, J.; CHENG, T.S.; PAVLOS, N.J.; ZHANG, C.; ZHENG, M.H. Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. **Arthritis Research & Therapy**, v.15, p.223-237, 2013.

LOSINA, E.; PALTIEL, A.D.; WEINSTEIN, A.M.; YELIN, E.; HUNTER, D.J.; CHEN, S.P.; KLARA, K.; SUTER, L.G.; SOLOMON, D.H.; BURBINE, S.A.; WALENSKY, R.P.; KATZ, J.N. Lifetime medical costs of knee osteoarthritis management in the United States: impact of extending indications for total knee arthroplasty. **Arthritis Care Research**, v.67, p.203-2015, 2015.

LOTZ, M. Osteoarthritis year 2011 in review: biology. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.20, p.192-196, 2012.

LOTZ, M.K.; OTSUKI, S.; GROGAN, S.P.; SAH, R.; TERKELTAUB, R.; D'LIMA, D. Cartilage cell clusters. **Arthritis & Rheumatism**, v.8, p.2206-2218, 2010.

LYONS, T.J.; McCLURE, S.F.; STODDART, R.W.; McCLURE, J. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v.7, p.52, 2006.

MADRY, H.; LUYTEN, F.P.; FACCHINI, A. Biological aspects of early osteoarthritis. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v.20, p.407-422, 2012.

MADRY, H.; van DIJK, C.N.; MUELLER-GERBL, M. The basic science of the subchondral bone. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v.18, p.419-433, 2010.

MAERZ, T.; NEWTON, M.D.; KURDZIEL, M.D.; ALTMAN, P.; ANDERSON, K.; MATTHEW, H.W.T.; BAKER, K.C. Articular cartilage degeneration following anterior cruciate ligament injury: a comparison of surgical transection and noninvasive rupture as preclinical models of post-traumatic osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.24, p.1919-1927, 2016.

MANSELL, J.P.; BAILEY, A.J. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, p.1596-1603, 1998.

MAPP, P.I.; WALSH, D.A.; BOWYER, J.; MACIEWICZ, R.A. Effects of a metalloproteinase inhibitor on osteochondral angiogenesis, chondropathy and pain behavior in a rat model of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p.593-600, 2010.

MARTIG, S.; KONAR, M.; SCHOMOKEL, H.G.; RYTZ, U.; SPRENG, D.; SCHEIDEGGER, J.; HOHL, B.; KIRCHER, P.P.; BOISCLAIR, J.; LANG, J. Low-field mri and arthroscopy of meniscal lesions in ten dogs with experimentally induced cranial cruciate ligament insufficiency. **Veterinary Surgery**, v.47, p.515-522, 2006.

MILZ, S.; PUTZ, R. Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. **Journal of Anatomy**, v.185, p.103-110, 1994.

MUZZI, L.A.L.; REZENDE, C.M.F.; MUZZI, R.A.L. Fisioterapia após substituição artroscópica do ligamento cruzado cranial em cães. I - avaliação clínica, radiográfica e ultrassonográfica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.805-814, 2009.

MWALE, F.; TCHETINA, E.; WU, C.W.; POOLE, A.R. The assembly and remodeling of the extracellular matrix in the growth plate in relationship to mineral deposition and cellular hypertrophy: an in situ study of collagens II and IX and proteoglycan. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.17, p.275-283, 2002.

NOBLE, J.; HAMBLIN, D.L. The pathology of the degenerate meniscus lesion. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 57, p.180-186, 1975.

OETTMEIER, R.; ABENDROTH, K.; OETTMEIER, S. Analyses of the tidemark on human femoral heads. II. Tidemark changes in osteoarthritis – a histological and histomorphometric study in non-decalcified preparations. **Acta Morphologica Hungarica**, v.37, p.169-180, 1989.

PEIXOTO, S.V.; GIATTI, L.; AFRADIQUE, M.E.; LIMA-COSTA, M.F. Custo das internações hospitalares entre idosos brasileiros no âmbito do Sistema Único de Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.13, p.239-246, 2004.

PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L.; DECAMP, D.C. Ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais. 4ª ed. **São Paulo: Manole**, 2009. 934p.

POOLE, A.R.; KOBAYASHI, M.; YASUDA, T.; LAVERTY, S.; MWALE, F.; KOJIMA, T.; SAKAI, T.; WAHL, C.; EL-MAADAWY, S.; WEBB, G.; TCHETINA, E.; WU, W. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. **Annals of Rheumatic Diseases**, v.61, p.78-81, 2002.

POOLE, C.A. Articular chondrons: form, function and failure. **Journal of Anatomy**, v.191, p.1-13, 1997.

PRITZKER, K.P.H.; GAY, S.; JIMENEZ, S.A.; OSTERGAARD, K.; PELLETIER, J.P.; REVELL, P.A.; SALTER, D.; PATH, F.R.C.; van de BERG, W.B. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.14, p.13-29, 2006.

REDLER, I.; MOW, V.C.; ZIMNY, M.L.; MANSELL, J. The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.112, p.357-362, 1975.

RIZKALLA, G.; REINER, A.; BOGOCH, E.; POOLE, A.R. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis: evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.90, p.2268-2277, 1992.

ROTZER, A.; MOHR, W. 3H-thymidine incorporation into chondrocytes of arthritic cartilage. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v.51, p.172-176, 1992.

ROUGHLEY, P.J. The structure and function of cartilage proteoglycans. **European Cells and Materials**, v.12, p.92-101, 2006.

RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.9, p.267-285, 2005.

SCHMIDT, M.B.; MOW, V.C.; CHUN, L.E.; EYRE, D.R. Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v.8, p.353-363, 1990.

SCHMITZ, N.; LAVERTY, S.; KRAUS, V.B.; AIGNER, T. Basic methods in histopathology of joint tissues. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p.S113-S116, 2010.

SCHUMACHER, B.L.; SU, J.L.; LINDLEY, K.M.; KUETTNER, K.E.; COLE, A.A. Horizontally oriented clusters of multiple chondrons in the superficial zone of ankle, but not knee articular cartilage. **The Anatomical Record**, v.266, p.241-248, 2002.

SHEN, C.; CAI, G.Q.; PENG, J.P.; CHEN, X.D. Autophagy protects chondrocytes from glucocorticoids-induced apoptosis via ROS/Akt/FOXO3 signaling. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.23, p.2279-2287, 2015.

STOPPIELLO, L.A.; MAPP, P.I.; WILSON, D.; HILL, R.; SCAMMELL, B.E.; WALSH, D.A. Structural associations of symptomatic knee osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatology**, v.66, p.3018-3027, 2014.

SURI, P.; MORGENROTH, D.C.; HUNTER, D.J. Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities. **Physical Medicine & Rehabilitation**, v.12, p.1934-1482, 2012.

SURI, S.; WALSH, D.A. Osteochondral alterations in osteoarthritis. **Bone**, v.51, p.204-211, 2012.

TEEPLE, E.; JAY, G.D.; ELSAID, K.A.; FLEMING, B.C. animal models of osteoarthritis: challenges of model selection and analysis. **The APPS Journal**, v.15, p.438-446, 2013.

THIBAUT, M.; POOLE, A.R.; BUSCHMANN, M.D. Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. **Journal of Orthopaedic Research**, v.20, p.1265-73, 2002.

WALSH, D.A.; McWILLIAMS, D.F.; TURLEY, M.J.; DIXON, M.R.; FRANSES, R.E.; MAPP, P.I, WILSON, D. Angiogenesis and nerve growth factor at the osteochondral junction in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v.49, p.1852-1861, 2010.

WANG, Y.; WLUKA, A.E.; PELLETIER, J.P.; MARTEL-PELLETIER, J.; ABRAM, F.; DING, C.; CICUTTINI, F.M. Meniscal extrusion predicts increases in subchondral bone marrow lesions and bone cysts and expansion of subchondral bone in osteoarthritic knees. **Rheumatology (Oxford)**, v.49, p.997-1004, 2010.

WHITE, E.; LOWE, S.W. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. **Genes and Development**, v.23, p.784-787, 2009.

WISE, B.L.; NIU, J.; YANG, M.; LANE, N.E.; HARVEY, W.; FELSON, D.T.; HIEPTAS, J.; NEVITT.; SHARMA, L.; TORNER, J.; LEWIS, C.E.; ZHANG, Y. Patterns of compartment involvement in tibiofemoral osteoarthritis in men and women and in whites and african americans. **Arthritis Care & Research**, v.64, p.847-852, 2012.

WU, W.; TCHETINA, E.; MWALE, F.; HASTY, K.; PIDOUX, I.; REINER, A.; CHEN, J.; van HART, H.E.; POOLE, A.R. Proteolysis involving MMP-13 (collagenase-3) and the expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.17, p.639-651, 2002.

ZAMLI, Z.; SHARIF, M. Chondrocyte apoptosis: A cause or consequence of osteoarthritis? **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 14, p.159-166, 2011.

ZHANG, M.; MANI, S.B.; HE, Y.; HALL, A.M.; XU, L.; LI, Y.; ZURAKOWSKI, D.; JAY, G.D.; WARMAN, M.L. Induced superficial chondrocyte death reduces catabolic cartilage damage in murine posttraumatic osteoarthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v.126, p.2893-2902, 2016.

ZHANG, Y.; VASHEGHANI, F.; LI, Y.H.; BLATI, M.; SIMEONE, K.; FAHMI, H.; LUSSIER, B.; ROUGHELY, P.; LAGARERS, D.; PELLETIER, J.P.; MARTEL-PELLETIER, J.; KAPOOR, M. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.74, p.1432-1440, 2015.