



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
CARLOS**

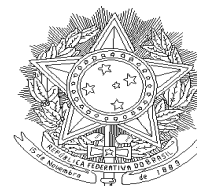
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**

**DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA**

Rod. Washington Luís, Km. 235 – Cx. Postal.  
676

TEL: (016) 3351-8704 Fax: (016) 3351-2081

CEP: 13565-905 – São Carlos – SP



**Investigação das alterações locais e sistêmicas do *onset* da osteoartrite em joelhos de ratos após a transecção do ligamento cruzado anterior**

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisioterapia – Área de Concentração em Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia**

**Aluna: Carolina Náglio Kalil Dias**

**Orientadora: Profa. Dra. Stela Márcia Mattiello**

**São Carlos / SP**

**Fev / 2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

D541ia      Dias, Carolina Náglio Kalil.  
                Investigação das alterações locais e sistêmicas do *onset*  
da osteoartrite em joelhos de ratos após a transecção do  
ligamento cruzado anterior / Carolina Náglio Kalil Dias. --  
São Carlos : UFSCar, 2012.  
                98 f.

                Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2012.

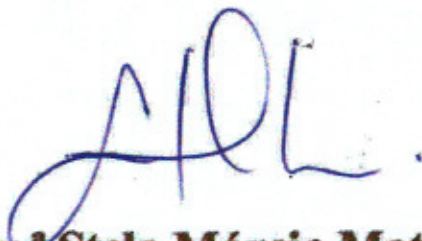
                1. Fisioterapia. 2. Osteoartrite. 3. Ligamento cruzado  
anterior. 4. Apoptose. 5. Citocina. 6. Cartilagem articular. I.  
                Título.

CDD: 615.82 (20<sup>a</sup>)

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da banca examinadora para defesa de tese de doutorado de **CAROLINA NÁGLIO KALIL DIAS**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 28 de Fevereiro de 2012

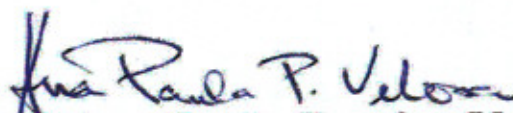
**Banca Examinadora:**



**Prof.ª Dr.ª Stela Márcia Mattiello**  
(UFSCar)



**Prof.ª Dr.ª Laurecir Gomes**  
(UNICAMP)



**Prof.ª Dr.ª Ana Paula Pereira Velosa**  
(USP)



**Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Marqueti**  
(UFSCar)



**Prof.ª Dr.ª Sabrina Peviani Messa**

**DEDICATÓRIA:**

**A DEUS, por me abençoar saúde, força e sabedoria para abraçar as oportunidades concedidas. Por me proteger e guiar durante esses anos de busca pelos meus objetivos.**

*“Aquele que semeia saiu a semear; e, enquanto semeava, uma parte da semente caiu ao longo do caminho...”*

*“... Mas aquele que recebe a semente numa boa terra é aquele que escuta a palavra, que lhe presta atenção e que dá fruto, e rende cento, ou sessenta, ou trinta por um.”*

*(O Evangelho segundo o espiritismo, capítulo 17, item 5)*

**DEDICATÓRIA:**

**AOS MEUS PAIS, ELIZABETH NÁGLIO KALIL DIAS e OSWALDO KALIL DOS SANTOS DIAS, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando, me incentivando e compreendendo. Obrigada pelo exemplo de caráter e honestidade que formaram minha personalidade.**

**Muito obrigada por serem meu apoio em momentos que pensei em desistir. Obrigada pelos conselhos, pelo amor, companheirismo e dedicação durante essa fase que se encerra. Eu amo vocês!!!**

**À MINHA AVÓ DILMA HELENA NÁLIO DIAS (*in memorium*), sempre presente em minha vida, mesmo em pensamento. Meu amor por você é incondicional, e sei que onde quer que hoje você esteja, está muito orgulhosa de mim. Saudade eterna!**

**AO MEU IRMÃO, THIAGO NAGLIO KALIL DOS SANTOS DIAS, por sempre estar ao meu lado, pelo companheirismo e amor sempre. Por me dar abrigo em Ribeirão Preto, servir de “correios” quando precisei, e estar sempre disposto a me ajudar a qualquer momento.**

**À MINHA TIA FLÁVIA NÁLIO DIAS PIMENTA, AO MEU TIO FERNANDO PIMENTA, que estiveram ao meu lado em muitos momentos importantes desta fase que se encerra.**

**AO MEU PRIMINHO HENRIQUE NÁLIO DIAS PIMENTA, que me trouxe muita alegria neste último ano. Meu pequeno príncipe!**

**AGRADECIMENTO ESPECIAL:**

**À Profa. Dra. Stela Márcia Mattiello**

**Pela oportunidade de fazer parte de um Programa de Pós Graduação de excelente qualidade; por me acolher em seu laboratório. Por me orientar neste projeto de pesquisa, por me passar seus conhecimentos não só sobre a cartilagem articular, mas também sobre a Ortopedia. Obrigada por me ajudar a amadurecer como pesquisadora, no conhecimento de novas metodologias, e na escrita de projetos e artigos, e também como pessoa.**

**À Profa. Alexandra Ivo de Medeiros**

**Por colaborar de forma direta com o meu trabalho. Por abrir as portas do seu laboratório e estar disponível para realizar junto comigo parte tão importante e fundamental do meu trabalho. Obrigada pelos conhecimentos transmitidos e pela paciência ao me ensinar.**

**Ao amigo e Prof. Dr. João Luis Quaglioti Durigan**

**Também por colaborar de forma direta com o meu trabalho. Por estar disposto a realizar junto comigo parte tão importante e fundamental do meu trabalho. Obrigada por me ensinar, e por me fazer sentir capaz. Sem você não teria a certeza de que iria conseguir.**

**Muito Obrigada!**

## **AGRADECIMENTOS**

**Às minhas amigas, Jacqueline Bernini e Vivian Arakelian, pela amizade e apoio de sempre, e principalmente pela diversão necessária em vários momentos.**

**Às minhas amigas e colegas de apartamento Renata Nogueron e Andressa Melo, pelo companheirismo, pelo carinho, pelas jantinhas juntas, pelas conversas, conselhos, idas ao shopping e ao cinema. Enfim, obrigada pela amizade.**

**Aos colegas do LAFar Karina Gramani, Paula Regina, Giovanna Lessi, Gisele Garcia Zanca, Luís Fernando Selistre, Zé, pelas risadas compartilhadas no laboratório.**

**Aos colegas Thiago Russo, Sabrina Peviani, Gabriel Delfino, pela ajuda, pelas risadas e companheirismo sempre.**

**À Adriana Renner, pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento do trabalho.**

**À Profa. Tânia de Fátima Salvini, por me abrir as portas de seu laboratório e pelo incentivo a participar de outras pesquisas.**

**À Mônica, funcionária técnica do Departamento de Patologia da FMRP/USP, pela ajuda e ensinamentos passados, de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.**

**À Profa. Ana Claudia Sverzuti, do Departamento de Patologia da FMRP/USP, por abrir as portas de seu laboratório e a sua técnica, Maria Paula pelos ensinamentos passados.**

**Aos funcionários do Biotério Central da UFSCar, Roberto e Revair, por estarem sempre dispostos a fornecerem os ratinhos para a execução deste trabalho.**

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida para a realização desta pesquisa.**

**SUMÁRIO**

<b>Dedicatória.....</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimento Especial.....</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimentos.....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de Figuras – Artigo 1.....</b>	<b>x</b>
<b>Índice de Figuras – Artigo 2.....</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Abreviaturas.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. Contextualização do Tema.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão de Literatura.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Estrutura e função da cartilagem articular.....</b>	<b>2</b>
<b>2.3. Mecanismos responsáveis pela destruição da MEC e progressão da OA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.4. O papel da IL1 e TNF<math>\alpha</math> na degradação da cartilagem articular.....</b>	<b>5</b>
<b>2.5. A apoptose.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Objetivo.....</b>	<b>10</b>
<b>4. Bibliografia.....</b>	<b>11</b>



<b>4. Artigo 1: “Expressão de Caspase 3 na fase aguda da Osteoartrite”</b> .....	<b>18</b>
4.1. Resumo.....	20
4.2. Abstract.....	21
4.3. Introdução.....	22
4.4. Objetivo.....	24
4.5. Material e Métodos.....	24
4.6. Análise Estatística.....	27
4.7. Resultados.....	27
4.8. Discussão.....	31
4.9. Conclusão.....	33
4.10. Agradecimentos.....	34
4.12. Referências Bibliográficas.....	34
<b>5. Artigo 2: “Análise da expressão de TNF<math>\alpha</math> e IL1<math>\alpha</math> local e sistêmicos ma fase aguda da Osteoartrite”</b> .....	<b>37</b>
5. 1. Resumo.....	39
5.2. Abstract.....	40
5.3. Introdução.....	41

<b>5.4. Objetivo.....</b>	<b>42</b>
<b>5.5. Material e Métodos.....</b>	<b>43</b>
<b>5.6. Análise Estatística.....</b>	<b>46</b>
<b>5.7. Resultados.....</b>	<b>46</b>
<b>5.8. Discussão.....</b>	<b>52</b>
<b>5.9. Conclusão.....</b>	<b>55</b>
<b>5.10. Agradecimentos.....</b>	<b>55</b>
<b>5.11 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS –

### **ARTIGO 1: “Expressão relevante da Caspase 3 na fase aguda da Osteoartrite”**

**Figura 1.** Fotomicrografia de imunohistoquímica da cartilagem articular dos côndilos femorais para identificação da expressão de caspase 3 (x 200).....27

**Figura 2.** Análise da média da expressão da caspase 3 pelos condróditos da cartilagem articular.....30

**Figura 3.** Análise da expressão de caspase 3 dos grupos C, S e TLCA, no decorrer de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do LCA.....31

### **ARTIGO 2: “Análise da expressão de TNF $\alpha$ e IL1 $\alpha$ locais e sistêmicos na fase aguda da Osteoartrite”**

**Figura 1.** Fotomicrografia de imunohistoquímica da cartilagem articular dos côndilos femorais (x 200) para e IL1 $\alpha$ .....45

**Figura 2.** Média do número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  nos grupos C, S e TLCA, no decorrer de 24h, 48h, 72h e 7 dias após transecção do LCA.....47

**Figura 3.** Média do número de condrócitos da cartilagem articular que expressaram TNF $\alpha$ .....48

**Figura 4.** Média do número de condrócitos da cartilagem articular que expressaram IL1 $\alpha$ .....50

**Figura 5.** Média do número de condrócitos que expressaram IL1 $\alpha$  nos grupos C, S e TLCA, no decorrer de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do LCA.....51

**LISTA DE TABELAS****ARTIGO 1: “Expressão relevante da Caspase 3 na fase aguda da Osteoartrite”**

**Tabela 1.** Média das espessuras ( $\mu\text{m}$ ) da cartilagem articular dos côndilos femorais dos animais dos grupos controle, sham e TLCA nos diferentes períodos.....28

**Tabela 2.** Média da celularidade da cartilagem articular dos côndilos femorais dos animais dos grupos controle, sham e TLCA nos diferentes períodos..... 28

**ARTIGO 2: “Análise da expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  local e sistêmicos na fase aguda da Osteoartrite”**

**Tabela 1.** Correlação entre a expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  na cartilagem articular.....51

**ANEXOS**

- Anexo I – Figura 1.** Fotomicrografia da cartilagem articular dos cndilos femorais corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) (x 200).....60
- Anexo II - Prancha I.** Fotomicrografia da cartilagem articular do joelho dos ratos, imunomarcada para caspase 3, dos grupos controle, sham e TLCA, nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do ligamento cruzado anterior.....61
- Anexo III – Prancha II.** Fotomicrografia da cartilagem articular do joelho dos ratos, imunomarcada para TNF $\alpha$ , dos grupos controle, sham e TLCA, nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do ligamento cruzado anterior.....62
- Anexo IV – Prancha III.** Fotomicrografia da cartilagem articular do joelho dos ratos, imunomarcada para IL1 $\alpha$ , dos grupos controle, sham e TLCA, nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do ligamento cruzado anterior. Os citoplasmas e periferas dos condrócitos corados em marrom indicam IL1 $\alpha$  positivo.....63
- Anexo V –** Manuscrito enviado ao periódico International Rheumatology.....64
- Anexo VI –** Manuscrito em forma de Brief Report submetido ao periódico Osteoarthritis and Cartilage.....86

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>OA</b>	<b>Osteoartrite</b>
<b>MEC</b>	<b>Matriz extracelular</b>
<b>LCA</b>	<b>Ligamento cruzado anterior</b>
<b>IL1</b>	<b>Interleucina 1</b>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>Fator de necrose tumoral <math>\alpha</math></b>
<b>PG</b>	<b>Proteoglicanos</b>
<b>GH</b>	<b>Hormônio de crescimento</b>
<b>IGF-1</b>	<b>Fator de crescimento insulínico</b>
<b>MMPs</b>	<b>Metaloproteinases</b>
<b>ADAMTS-4</b>	<b>Agrecanase-1</b>
<b>TIMPs</b>	<b>Inibidores teciduais de metaloproteinases</b>
<b>BMP-2</b>	<b>Proteína morfogênica do osso-2</b>
<b>LIF</b>	<b>Fator de indução de leucocemia</b>
<b>PGE2</b>	<b>Prostaglandina E2</b>
<b>NO</b>	<b>Óxido nítrico</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrogênio</b>

<b>IGF-1</b>	<b>Fator de crescimento insulínico-1</b>
<b>MAPK</b>	<b>Map Kinase</b>
<b>ERK</b>	<b>Sinal extracelular regulado pela Kinase</b>
<b>JNK</b>	<b>N-terminal kinase Jun</b>
<b>NFkB</b>	<b>Fator nuclear kapa B</b>
<b>ICAD</b>	<b>Inibidor de DNase caspase-ativada</b>
<b>CAD</b>	<b>Caspase DNA ativada</b>
<b>DNA</b>	<b>Ácido desoxiribonucleico</b>
<b>HE</b>	<b>Hematoxilina e Eosina</b>

## CONTEXTUALIZAÇÃO

A osteoartrite (OA) é um processo multifatorial que se desenvolve lentamente, no qual a idade, fatores genéticos, hormonais e mecânicos são os maiores contribuintes para seu início e progressão. É uma doença progressiva, resultante de eventos mecânicos e biológicos cumulativos, que resulta em destruição da cartilagem articular. Essa destruição é decorrente da falha dos condrócitos em manter o balanço entre síntese e degradação da matriz extracelular (MEC), gerando múltiplas alterações nos componentes articulares como células, MEC e produção molecular, além de remodelamento do osso sub-condral e presença de citocinas inflamatórias no líquido sinovial (POOLE, 2001; GOLDRING, 2004; ISHIGURO, KOJIMA; POOLE, 2002).

A causa da OA pode ser primária, ou seja, sem causa definida, enquanto que a OA secundária pode resultar de mudanças mecânicas, como remoção de menisco, lesão de ligamento cruzado anterior (LCA), instabilidade articular e carga alterada (PELLETIER, MARTEL-PELLETIER; HOWELL, 1997). É a mais comum desordem músculo-esquelética que acomete a população mundial, e está aumentando entre a população idosa, sendo considerada a principal causa de incapacidade, trazendo conseqüências econômicas e sociais para a sociedade (BROOKS, 2002; GHOSH; SMITH, 2002; BREEDVELD, 2004). Em fases avançadas da doença, a incapacidade física está relacionada à presença de dor, inflamação e enrijecimento articular (FELSON, 2000; MASSART, REGINSTER; BRANDI, 2001; SOWERS, 2001). De todas as articulações, o joelho é o mais afetado, o que leva à grande perda na performance funcional e gera alto custo social (FELSON, 1988).

A patogênese da OA vem sendo um desafio para os pesquisadores, pois o seu entendimento poderá ajudar no controle da doença, tanto na sua progressão, assim como no seu tratamento. Estudos têm sido feitos para descobrir o mecanismo molecular inicial da destruição tecidual na OA, utilizando modelos animais de transecção do LCA, que é um modelo da fase aguda da OA (ECHIGO et al, 2006). Devido à recente genômica e dos progressos nos estudos realizados em ratos, este é atualmente o animal ideal para o estudo molecular. Utilizando uma técnica micro cirúrgica para produzir instabilidade nas articulações do joelho de ratos, já estão estabelecidos modelos mecânicos de instabilidade que induzem OA reprodutíveis, e semelhantes nos seres humanos para se analisar as alterações bioquímicas decorrentes da instabilidade articular que levam à OA (KAMEKURA et al, 2005).



O mecanismo que leva à degeneração gradual da cartilagem articular ainda não é completamente entendido (POOLE, 1999; SMITH, 1999; MUTSUZAKI et al, 2007; PRICE et al, 1999). Estudos mostram que um mecanismo molecular parece regular a quebra da cartilagem articular depois de uma lesão, e que a interleucina 1 (IL1) e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) são citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos condrócitos que guiam essa degradação progressiva da cartilagem (GOLDRING, 2000; HEDBOM; HÄUSELMANN, 2002; IRIE, UCHIYAMA, IWASO, 2003; MARKS; DONALDSON, 2005; CUELLAR et al, 2010), e a conseqüente morte de condrócitos é um evento crucial em sua patogênese (BLANCO et al, 1998; HASHIMOTO et al, 1999). Poucos estudos têm investigado o papel dos fatores bioquímicos locais e sistêmicos, e sua ligação potencial com o surgimento da OA (PAGURA et al, 2005; APPLETON, et al, 2007). Entretanto, os estudos encontrados na literatura referentes ao patomecanismo da OA são feitos analisando as alterações inflamatórias e estruturais que ocorrem somente após 1 semana ou mais após a lesão que desencadeia a OA (HATTORI et al, 2007; MUTSUZAKI et al, 2007; QUASNICHKA et al, 2005; APPLETON et al, 2007; NELSON et al, 2006; PRICE et al, 1999). Portanto, uma vez que a OA é uma patologia muito frequente na prática clínica da fisioterapia, tem caráter degenerativo, progressivo e gera incapacidade funcional, a análise de biomarcadores inflamatórios e das alterações estruturais imediatamente após a lesão é de vital importância para o controle da progressão da doença.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### **Estrutura e função da cartilagem articular**

Para entender os mecanismos envolvidos na degeneração da cartilagem articular, é importante conhecer os componentes estruturais deste tecido. Sabe-se que a cartilagem articular é um tecido especializado no suporte de carga na superfície de articulações sinoviais (QUINN; HUNZIKER; HAUSELMANN, 2005). É um tecido avascular e aneural, sendo que as trocas de nutrientes e catabólitos ocorrem através do fluxo transsinovial que ocorre entre os capilares e vasos linfáticos da sinóvia e os condrócitos (GARNERO; ROUSSEAU; DELMAS, 2000). A cartilagem articular é dividida em 4 camadas: (1) superficial, mais fina e próxima à superfície de carga; (2) média, mais espessa, sendo a camada de transição entre a superficial e a profunda,; (3) profunda, também espessa, é a zona de transição entre a camada não calcificada e calcificada; (4)

calcificada, próxima ao osso subcondral e separada da camada não calcificada (3 primeiras camadas) por uma linha de crescimento (ANGEL et al, 2003). É composta por componentes acelulares altamente especializados e organizados, a MEC, e um componente celular esparsos, o condrócito (AIGNER; McKENNA, 2002). A MEC é altamente hidratada, pela presença de proteoglicanos (PGs) constituídos de glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados (sulfato 4 de condroitina, sulfato 6 de condroitina, e queratan sulfato) e não sulfatados (ácido hialurônico), e é também composta por outras proteínas não colagênicas, dentro de uma rede de colágeno tipo II, IX, XI, que garantem a elasticidade do tecido (GOLDRING, 2000; VANWANSILE et al, 2002). O colágeno tipo II é a proteína mais abundante da cartilagem, e junto aos colágenos tipos IX e XI, em menor quantidade, constituem uma rede fibrosa tridimensional, que não só imobiliza as PGs, mas também limita a extensão de sua hidratação. Quando a cartilagem é lentamente comprimida pela carga mecânica fisiológica imposta a ela, as moléculas de água e solutos são liberadas da matriz até o balanço das forças repulsivas entre as moléculas de PG e a carga aplicada. Quando a carga é removida, as PGs re-hidratam e restauram o formato original da cartilagem articular. Enquanto pequenas moléculas nutrientes se difundem livremente para dentro e para fora da cartilagem, a carga e a falta de carga são importantes para a troca de nutrientes e solutos entre a matriz e o condrócito (URBAN, 1979; MOW, 1992; O'HARA, 1990; GOLDRING, 2000).

Sabe-se que a quebra da rede de colágeno, irá alterar o ambiente de água/PGs na matriz da cartilagem, levando a mudanças no comportamento biomecânico do tecido. O dano na rede de fibras colagênicas precede a perda de PG, começando nas zonas superficial e média alta. Porém, o marco inicial onde ocorrem essas alterações ainda não está claro. A quebra da integridade da rede de fibras colagênicas, como ocorre no início da OA, permite uma hiper-hidratação da cartilagem articular, tornando-a mais macia. Quando ocorre a perda de PGs, a cartilagem menos elástica é mais susceptível ao dano molecular adicional da rede de colágeno, que leva à deterioração progressiva da integridade do tecido (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006; GOLDRING, 2000).

Os condrócitos, únicas células presentes na cartilagem articular, responsáveis pelo metabolismo da MEC sintetizam PGs, colágeno, fibronectina, integrinas e outras proteínas adesivas que são necessárias para a manutenção de altas forças tensivas e baixa compressibilidade sob carga (ISHIGURO, KOJIMA; POOLE, 2002). Os

condrócitos são responsáveis pela homeostase da cartilagem articular através de um balanço altamente regulado entre a síntese e a degradação dos vários componentes da matriz, repondo continuamente as macromoléculas perdidas durante o turnover normal. A presença de substâncias de caráter anabólico na cartilagem articular são importantes na síntese e manutenção do tecido. O hormônio de crescimento (GH) e o fator de crescimento insulínico-1 (IGF-1) atuam como agentes anabólicos na cartilagem articular e têm um importante papel na manutenção do músculo e osso, e regula o metabolismo de gordura, e desta maneira a função física (WOODHOUSE et al, 1999). Acredita-se que o IGF-1 tem papel na patogênese da osteoartrite, sendo um dos únicos fatores de crescimento capazes de estimular ou manter condrócitos *in vitro* (GOLDRING, 2000).

Sabe-se que na OA o equilíbrio entre anabolismo e catabolismo da cartilagem articular é altamente ponderado em favor da degradação tecidual (GOSH; SMITH, 2002), por meio do aumento da atividade das proteases (metaloproteinases – MMPs - e agreganase 1 - ADAMTS-4). A cascata proteolítica que degrada colágenos e PGs na OA envolve a produção pelos condrócitos de enzimas conhecidas como collagenases, como a metaloproteinase-1 (MMP-1) (colagenase intersticial), MMP-8 (colagenase neutrofila) e MMP-13 (colagenase-3), gelatinases (MMP-9 e MMP-2), e estromelisinases, em particular MMP-3 (estromelisinase-3). Para tentar retomar a homeostase tecidual, os condrócitos produzem inibidores de MMP, denominados TIMPs inibindo os efeitos catabólicos das MMPs, (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006).

### **Mecanismos responsáveis pela destruição da MEC e progressão da OA**

A OA vem sido caracterizada como uma artropatia inflamatória, já que respostas inflamatórias na membrana sinovial causadas pela perturbação biomecânica direta ou pela reação aos produtos de degradação da matriz da cartilagem podem contribuir para a progressão da doença. A presença da inflamação sinovial vem justificando para o estudo de citocinas pro-inflamatórias, apesar de saber-se que a produção desta citocinas é secundária à liberação de produtos de quebra da MEC no fluido sinovial. Desta forma, os maiores eventos na patogênese da OA estão localizados dentro da própria cartilagem, onde citocinas exercem seu efeito via mecanismo **parácrino**, onde os produtos de uma célula modulam as atividades de células adjacentes ou próximas, ou via mecanismo **autócrino**, onde os produtos de uma célula agem diretamente na mesma célula. Um mecanismo adicional é o **justócrino**, onde as citocinas produzidas pela célula

permanecem associadas à sua superfície, e interagem com receptores de células adjacentes, modulando a função celular (SMITH et al, 1997; GOLDRING; GOLDRING, 2004).

Fortes evidências mostram que citocinas pró-inflamatórias adicionais na cartilagem articular contribuem para sua degeneração na OA, sendo que as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) desempenham um papel central nesta degradação, agindo via autócrina e parácrina nos condrócitos (GOLDRING, 2000; HANS et al, 2002; GOLDRING; GOLDRING, 2004; NELSON et al, 2006; AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006). O TNF $\alpha$  tem ação 100 a 1000 vezes mais fraca que a IL1, porém ambas tem um forte efeito sinérgico. A presença de TNF- $\alpha$  é suficiente para guiar o *onset* da OA, enquanto a IL1 tem o papel central em sustentar a inflamação e a erosão da cartilagem (VAN DEN BERG, 2001). Apesar disso, estudos devem ser feitos para determinar como o sinergismo de ambas se estende na OA. Além do mais, ainda não se sabe o momento exato em que estas citocinas estão expressas na cartilagem articular após uma lesão.

### **O papel da IL1 e TNF $\alpha$ na degradação da cartilagem articular**

A IL1 é uma citocina pró-inflamatória de grande importância na degeneração da cartilagem articular. Pode estar presente na membrana e líquido sinovial, no pannus (hiperplasia da membrana sinovial na periferia das articulações na OA avançada), e nos condrócitos. Possui múltiplos efeitos nos condrócitos articulares: (1) deprimem a expressão dos mais abundantes componentes da MEC, o agrecano e o colágeno tipo II; (2) contrabalançam os efeitos dos fatores anabólicos (GH e IGF-1) para síntese de MEC; (3) induzem a expressão de enzimas de degradação da matriz, as MMPs 1, 3 e 13, e de agrecanase 1 (ADAMTS-4), principais atuantes da degradação dos componentes da matriz. A IL1 também é capaz de estimular a produção de outras citocinas de efeito sinérgico, como a IL6 (efeito similar à IL-1, sendo necessária em uma supressão de PG prolongada pela IL1, por ter efeito mais fraco) e do Fator de indução de leucocemia (LIF) (aumenta a produção de MMP-13, e inibe produção de PG) (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006). Na presença de morte celular, a IL1 atua de uma forma autócrina e parácrina no condrócito, sendo produzida pelo próprio condrócito, e pelos adjacentes a ele. Em condições fisiológicas, a IL1 induz a produção de BMP-2 (proteína morfogênica do osso-2) que estimula o anabolismo do condrócito, mantendo assim o

*turnover* normal da cartilagem (GOLDRING; GOLDRING, 2004). O estudo de Werman et al (2004) mostram que a forma precursora da IL1 $\alpha$  pode ser translocada do citoplasma para o núcleo, ativando a transcrição de genes pró-inflamatórios, sugerindo um mecanismo que pode ter um papel importante na produção molecular do condrócito.

Outra citocina envolvida no mecanismo de degeneração da cartilagem articular é o TNF- $\alpha$ , que possui efeitos similares no condrócito, incluindo estimulação da produção de proteinases de degradação de matriz e supressão de síntese de matriz da cartilagem. Além do efeito catabólico da IL1 e do TNF- $\alpha$ , estas citocinas isoladas ou associadas entre si inibem a síntese de PGs e de colágeno tipo II.

A IL1 e o TNF- $\alpha$  juntos induzem os condrócitos a sintetizarem prostaglandina E2 (PGE2) e óxido nítrico (NO), e vários outros produtos que agem na atividade anabólica e catabólica dos condrócitos. O NO aumenta a predisposição do condrócito à lesão por oxidantes como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e contribui para a resistência a efeitos anabólicos do IGF-1. Além do mais, o NO também tem sido considerado como um importante mediador da apoptose em condrócitos (GOLDRING; GOLDRING, 2004).

O conhecimento do efeito da IL1 e TNF- $\alpha$  na expressão gênica celular, dos mecanismos moleculares de ambas, e a transdução de sinal no condrócitos é muito importante. Apesar dos receptores celulares para a IL1 e o TNF- $\alpha$  e suas moléculas adaptadoras serem distintas, eles compartilham alguns dos mesmos caminhos de sinalização (GOLDRING; BERENBAUM, 2004). A IL1 e o TNF- $\alpha$  agem através de 3 clássicos caminhos da sinalização da MAPK, chamados (1) ERK, sinal extracelular regulado pela Kinase; (2) p38; (3) JNK, N-terminal kinase Jun, assim como o NF $\kappa$ B (fator nuclear kapa B). Os caminhos ERK parecem ser particularmente importantes para a indução de outras citocinas como IL6 e LIF, enquanto ERK e NF $\kappa$ B juntos regulam genes anabólicos e catabólicos como os do colágeno tipo II e MMP-1 e -13. A MMP-13 parece também implica na sinalização através do p38 (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006). Segundo Goldring e Berenbaum (2004), esta cascata de sinalização é importante para a IL1 e o TNF- $\alpha$  mediar a indução da expressão de prostaglandina E<sub>2</sub>, que regula a transcrição de colágeno II, e MMP-13 nos condrócitos.

## A apoptose

A apoptose é a morte celular programada, que necessita de energia e síntese protéica para a sua execução, e mantém a homeostase em condições fisiológicas dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose (BRAS et al, 2005). As células que sofrem apoptose se diferem daquelas que morrem pelo processo de necrose. Células em apoptose desenvolvem um processo ativo de fragmentação, com condensação da cromatina, vacuolização da membrana, e contração da célula com formações de extrusões em sua superfície (zeiose). Os fragmentos resultantes dessa membrana encapsulada são chamados de corpos apoptóticos. A apoptose é caracterizada pela fragmentação (cariorexis) ou encarquilhamento do núcleo celular (picnose), ou a sua dissolução lenta no citoplasma, sem fenômenos abruptos que caracterizam a lise celular (KERR, WYLLIE; CURRIE et al, 1972; CLARKE, 1990; TERAOKI; SHIOHARA, 1999). A apoptose ainda se difere da necrose por ser um processo ativo e silencioso, já que as células em apoptose não desencadeiam um processo inflamatório, como fazem aquelas em processo de necrose. Em geral as células apoptóticas são ingeridas por macrófagos antes que se desintegram, evitando o derrame de conteúdo celular e impedindo a inflamação e lesão do tecido, garantindo o seu funcionamento normal (MEAGHER et al, 1992; COHEN, 1993; FADOK; HENSON, 1998).

Certas proteases, denominadas caspases, são de grande importância na apoptose. As caspases são enzimas intracelulares ricas em cisteínas que podem ser ativadas intrínseca ou extrinsecamente. Podem ser divididas em caspases inflamatórias ou apoptóticas, sendo as apoptóticas subdivididas em iniciadoras e efetoras. Desta forma, uma caspase iniciadora ao ser ativada, cliva outras caspases em cascata até gerar uma caspase executora, a qual destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas, ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose, levando à morte celular (CREAGH, CONROY; MARTINS, 2003). Esta cascata desempenha um papel vital na indução, transdução, amplificação e execução de sinais apoptóticos dentro da célula (MUSUMECI et al, 2011).

Podem ser reconhecidos diferentes tipos de caspases, divididas em 3 grupos: iniciadoras de apoptose (caspases 2, 8, 9 e 10); executoras de apoptose (caspases 3, 6 e 7); e processadoras de citocinas (caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13, e 14). A caspase 3 é uma caspase ativada por cada uma das vias de morte celular, e em sua forma ativa é um dos

mediadores chaves da apoptose em sua fase de execução (THOMAS et al, 2007), cliva a proteína chamada ICAD (inhibitor of caspase-activated DNase), normalmente ligada a uma endonuclease (CAD) no citoplasma, ativando essa enzima, que entra no núcleo e começa a clivar o DNA (ENARI et al, 1998). A técnica de TUNEL também é utilizada para avaliação da morte celular, porém, deve ser feita com precaução, uma vez que sinais positivos para esta coloração detectam também células necróticas e em processo fisiológico de diferenciação (HATAWAY; KUELCH, 2002).

A morte de condrócitos é um evento crucial na patogênese da OA (BLANCO 1998, HASHIMOTO 1998). A necrose celular era considerada o caminho predominante da morte celular na OA. No entanto, recentes estudos mostram que a morte de condrócitos ocorre primeiramente por apoptose (THOMAS et al, 2007; LOTZ, HASHIMOTO; KÜHN, 1999, WENG et al, 2009; MUSUMECI et al, 2001). Segundo Lotz, Hashimoto e Kühn (1999), duas características são importantes para considerar a morte de condrócitos: (1) a cartilagem articular não possui células fagocíticas para a retirada das células mortas da MEC, o que potencialmente afeta a estrutura e função dos condrócitos remanescentes; (2) a cartilagem articular por não ser vascularizada e não possuir células-tronco mesenquimais, apresenta dificuldade na reposição celular, o que pode prejudicar a habilidade da cartilagem em manter e reparar a MEC.

A perda de PG e da rede de colágeno são as maiores características da degeneração da cartilagem, e causam grande desarranjo na ancoragem dos condrócitos na MEC, e estes dependem do fenômeno de ancoragem para sobreviver, desempenhar sua função e crescer, caso contrário, entram em apoptose (AIGNER; KIM, 2002). Thomas et al (2007) mostram que existe grande correlação entre a apoptose de condrócitos e a degradação da cartilagem articular, pois a maior incidência de apoptose de condrócitos ocorre em cartilagem em maior grau de degradação. Entretanto, ainda não está claro, se a morte de condrócitos é causa ou o resultado da quebra da MEC.

Estudos (MUTSUZAKI et al, 2007; HATTORI et al, 2007; SABATINI et al, 2000) mostram que a apoptose de condrócitos na lesão de LCA tem papel importante na indução de mudanças histológicas e histoquímicas degenerativas na cartilagem articular. Porém, ainda não se sabe se imediatamente após a lesão e até uma semana depois, já ocorre o aparecimento de apoptose de condrócitos no tecido lesado.

Embora muitos detalhes da patogênese da OA em seres humanos têm permanecido evasivos, parece claro que este é um processo complexo, multi-fatorial, que envolve o anabolismo e catabolismo da cartilagem, bem como a sua evolução em outras estruturas articulares, como a membrana sinovial, osso subcondral e tendões. Atualmente, não existe tratamento para modificar a OA. Embora tratamentos disponíveis para o início da OA, que é uma doença degenerativa irreversível, baseiam-se no alívio sintomático, e quando em fase mais avançada, onde o alívio da dor não é mais conseguido, normalmente requer-se intervenção cirúrgica (condroplastia, *shaving*) para aliviar a dor e melhorar a função comum (HAYAMI et al, 2006).

Desta forma, o estudo da presença de apoptose de condrócitos, e de citocinas inflamatórias locais e sistêmicas imediatamente após a lesão é de vital importância para que se intervenha precocemente, como por exemplo, a administração de inibidores de MMPs nos primeiros dias após a lesão, caso essas MMPs já estejam presentes no tecido, para prevenir a progressão dessa doença que é irreversível (PRICE et al, 1999).



**OBJETIVOS**

Investigar o mecanismo patogênico da osteoartrite por meio de análises histoquímicas e inflamatórias, locais e sistêmicas, que ocorrem na cartilagem articular, 24horas, 48horas, 72 horas e 1 semana após a transsecção do ligamento cruzado anterior de joelhos de ratos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIGNER, T.; KIM, H. A. Apoptosis and cellular vitality: issues in osteoarthritic cartilage degeneration. **Arthritis Rheum.** 46(8), 1986-96, 2002.

AIGNER, T; McKENNA, L. A. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritis cartilage. **Cell Mol Life Sci.** 59, 5-18, 2002.

AIGNER, T.; SOEDER, S.; HAAG, J. IL-1 $\beta$  and BMPs – Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **Eur Cells Materials.** 12, 49-56, 2006.

ANGEL, J.; RAZZANO, P.; GRANDE, D. Defining the challenge: The basic science of articular cartilage repairs and response injury. **Spo Me Arthrosc Rev.** 11(3), 168-18, 2003.

APPLETON, C. T. G.; McERLAIN, D. D.; PITELKA, V.; SCHWARTZ, N.; BERNIER, S. M.; HENRY, J. L. et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. **Arthritis Res Ther.** 9(1), 3-15, 2007.

BLANCO, F. J.; GUITIAN, R.; VAZQUEZ-MARTUL, E.; DE TORO, F. J.; GALDO, F. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. **Arthritis Rheum.** 41,284-289, 1998.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIS, S. A. Programed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry.** 70(2), 231-239, 2005.

BREEDVELD, F. C. Osteoarthritis – the impact of a serious disease. **Rheumatology.** 43, 14-18, 2004.

BROOKS, P. M. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. **Curr Opin Rheumatol.** 14, 573-577, 2002.

CLARKE, P. G. H. Developmental cell death: morphological and multiples mechanisms. **Anat Embryol.** 138, 195-213, 1990.

CREAGH E. M.; CONROY, H.; MARTINS, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. **Immunol Rev.** 193, 10-21, 2003.

CUELLAR, V. G.; CUELLAR, J. M.; GOLISH, S. M.; YEOMANS, D. C.; SCUDERI G. J. Cytokine profile in acute anterior cruciate ligament injury. **Arthroscopy: J Arthrosc Rel Sur.** 26(10), 1296-1301, 2010.

ECHIGO, R.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Suppressiv effects of hyaluronan on chondrocyte apoptosis in experimentally induced acute osteoarthritis in dogs. **J Vet Med Sci.** 68, 8, 899-902, 2006.

ENARI, M.; SAKAHIRA, H.; YOKOYAMA, H.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature.** 391, 43-50, 1998.

FADOK, V. A.; HENSON, P. M. Getting rid of the bodies. **Curr Biol.** 8(19), R693-695, 1998.

FELSON, D. T. Epidemiology of hip and knee osteoarthritis. **Epidemiol Rev.** 10, 1-28, 1988.

FELSON, D. T. Epidemiology of the rheumatic diseases. In: *Arthritis and allied conditions: A textbook of rheumatology.* 14h Edition. Koopman, W. J., Williams & Wilkins, Baltimore, 2000.

GARNERO, P.; ROUSSEAU, J. C.; DELMAS, P. D. Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone cartilage and synovium in joint diseases. **Arthritis Rheum.** 43(5), 953-968, 2000.

GHOSH, P.; SMITH, M. Osteoarthritis, genetic and molecular mechanisms. **Biogerontology.** 3, 85-88, 2002.

GOLDRING, M. B.; BERENBAUM, F. The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators. **Clin Orthop Rel Res.** 427S, S37-S46, 2004.

GOLDRING, M. B. The role of chondrocytes in osteoarthritis. **Arthritis Rheum.** 43(9), 1916-1926, 2000.

GOLDRING, S. R.; GOLDRING, M. B. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. **Clin Orthop Rel Res.** 427S, S27-S36, 2004.

HANS B.; COLE, A. A.; SHEN, Y.; BRODIE, T.; WILLIAMS, J. M. Early alterations in the collagen meshwork and lesions in the ankles are associated with spontaneous osteoarthritis in guinea-pigs. **Osteoarthritis Cartilage.** 10, 778-784, 2002.

HASHIMOTO, S.; OCHS, R. L.; KOMIYA, S.; LOTZ, M. Linkage of chondrocytes apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. **Arthritis Rheum.** 41, 1632-1638, 1998.

HATHAWAY, T. R.; KUELCH, M. K. Apoptosis and cutaneous biology. **Adv Dermatol.** 18, 287-311, 2002.

HATTORI, S.; SAKANE, M.; MUTSUZAKI, H.; TANAKA, J.; OCHIAI, N.; NAKAJIMA, H. Chondrocyte apoptosis and decrease of glycosaminoglycan in cranial cruciate ligament insertion after resection in rabbits. **J Vet Med Sci.** 69(3), 253-258, 2007.

HAYAMI, T.; PICKARSKI, M.; ZHUO, Y.; WESOLOWSKI, G. A.; RODAN, G. A.; DUONG, L. T. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone.** 38, 234–243, 2006.

HEDBOM, E.; HÄUSELMANN, H. J. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role in inflammation. **CMLS Cell. Mol. Life Sci.** 59, 45-53, 2002.

IRIE, K.; UCHIYAMA, E.; IWASO, H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. **Knee.** 10, 93-96, 2003.

ISHIGURO, N.; KOJIMA, T.; POOLE, R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. **J Med Sci,** 65, 73-84, 2002.

KAMEKURA, S.; HOSHI, K.; SHIMOAKA, T.; CHUNG, U.; CHIKUDA, H.; YAMADA, T. et al. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. **Osteoarthritis Cartilage.** 13, 632–41, 2005.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. 26(4), 239-257, 1972.

LOTZ, M.; HASHIMOTO, S.; KÜHN K. Mechanisms of chondrocyte apoptosis. **Osteoarthritis Cartilage**. 7, 389-391, 1999.

MARKS, P. H.; DONALDSON, M. L. C. Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee. **Arthroscopy: J Arthrosc Rel Sur**. 21(11), 1342-1347 2005.

MASSART, F.; REGINSTER, J. Y.; BRANDI, M. L. Genetics of menopause associate disease. **Maturitas**. 40, 103-116, 2001.

MEAGHER, SAVILL, J. S.; BAKER, A.; FULLER, R. W.; HASLETT, C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. **J Leukoc Biol**. 52(3), 269-273, 1992.

MOW, V. C.; RATCLIFFE, A.; POOLE, A. R. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. **Biomaterials**. 13, 67-97, 1992.

MUSUMECI, G.; LORETO, C.; CARNAZZA, M. L.; MARTINEZ, G. Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**. 19, 307-313, 2011.

MUTSUZAKI, H.; SAKANE, M.; IKEDA, K.; ISHII, T.; HATTORI, S.; TANAKA, J. et al. Histological changes and apoptosis of cartilage layer in human anterior cruciate ligament tibial insertion after rupture. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**. 15, 602-609, 2007.

NELSON, F.; BILLINGHURST, R. C.; PIDOUX, I.; REINER, A.; LANGWORTHY, M.; McMERMOTT, M. et al. Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of anterior cruciate ligament. **Osteoarthritis Cartilage**. 14, 114-119, 2006.

O'HARA, B. P.; URBAN, J.; MAROULDAS, A. Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. **Ann Rheum Dis.** 49, 536-539, 1990.

PAGURA, S. M. C.; THOMAS, S. G.; WOODHOUSE, L. J.; EZZAT, S.; MARKS, P. Circulating and synovial levels of IGF-I, cytokines, physical function and anthropometry differ in women awaiting total knee arthroplasty when compared to men. **J Orthop Res.** 23, 397-405, 2005.

PELLETIER, J. P.; MARTEL-PELLETIER, J.; HOWELL, D. S. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. Arthritis and allied conditions. Baltimore: Williams and Wilkins, 1969-1984, 1997.

POOLE, A. R. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. **Front Biosci.** 15, 662-670, 1999.

POOLE, A. R. Cartilage in health and disease. In Koopman W. Arthritis and allied conditions: a text book of rheumatology. 14th edit., Philadelphia. Lippincott Williams e Wilkins. 226-284, 2001

PRICE, J. S.; TILL, S. H.; BICERSTAFF, D. R.; BAYLISS, M. T.; HOLLANDER, A. P. Degradation of cartilage type II collagen precedes the onset of osteoarthritis following anterior cruciate ligament rupture. **Arthritis Rheum.** 42(11), 2390-2398, 1999.

QUASNICHKA, H. L.; ANDERSON-MACKENZIE, J. M.; TARLTON, J. F.; SIMS, T. J.; BILLINGHAM, M. E. J.; BAILEY, A. J. Cruciate ligament laxity and femoral intercondylar notch narrowing in early-stage knee osteoarthritis. **Arthritis Rheum.** 52(10), 3100-09, 2005.

QUINN, T. M.; HUNZIKER, B. E.; HÄUSELMANN, H-J. Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee. **Osteoarthritis Cartilage.** 13, 672-678, 2005.

SABATINI, M.; ROLLAND, G.; LÉONCE, S.; THOMAS, M.; LESUR, C.; PÉREZ, V. et al. Effects of ceramide on apoptosis, proteoglycan degradation, and matrix

metalloproteinase expresión in rabbit articular cartilage. **Biophys Res Commun.** 267, 438-444, 2000.

SMITH, L. Degradative enzymes in osteoarthritis. **Front Biosci.** 15, 74-712, 1999.

SMITH, M. D.; TRIANTAFILLOU, S.; PARKER, A.; YOUSSEF, P.P.; COLEMAN, M. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. **J Rheumatol.** 24, 365-371, 1997.

SOWERS, M. Epidemiology of risk factors of osteoarthritis: systemic factors. **Curr Opin Rheumatol.** 13, 447-51, 2001.

TERAKI, Y.; SHIOHARA, T. Apoptosis and Skin. *Eur J Dermatol.* 9(5), 413-425, 1999.

THOMAS, C. M.; FULLER, C. J.; WHITTLES, C. E.; SHARIF, M. Chondrocyte apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. **Osteoarthritis Cartilage.** 15, 27-34, 2007.

URBAN, J.; MAROULDAS, A.; BAYLISS, M. T.; DILLON, J. Swelling pressure of proteoglycans at the concentrations found in cartilaginous tissues. **Biorheology.** 16, 447-464, 1979.

VAN DEN BERG, W.B. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. **Arthritis Res.** 3, 18-26, 2001.

VANWANSEELE, B.; LUCCHINETTI, E.; STÜSSI, E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. **Osteoarthritis Cartilage.** 10, 408-419, 2002.

WENG, L. H.; WANG, C. J.; KO, J. Y.; SUN, Y. C.; SU, Y. S.; WANG, F. S. Inflammation induction of Dickkopf-1 mediates chondrocyte apoptosis in osteoarthritic joint. **Osteoarthritis Cartilage.** 17, 933-943, 2009.

WERMAN, A.; WERMAN-VENKERT, R.; WHITE, R.; LEE, J. K.; WERMAN, B.; KRELIN, Y. et al. The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 101(8), 2434-2439, 2004.

WOODHOUSE, L. J.; ASA, S. L.; THOMAS, S. G.; EZZAT, S. Measures of submaximal aerobic performance evaluate and predict functional response to growth hormone (GH) treatment in GH-deficient adults [see comments]. **J Clin Endocrinol Metab.** 84, 4570-4577, 1999.



**ARTIGO 1: “Expressão relevante da Caspase 3 na fase aguda da Osteoartrite”**

## **Expressão relevante da Caspase 3 na fase aguda da Osteoartrite**

†Carolina Náglio Kalil Dias, †Fernando Augusto Vasilceac, ††João Luiz Quaglioti  
Durigan, ††† Mario Ferreti, †Stela Márcia Mattiello

† Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, brasil

†† Departamento de Fisioterapia, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil

††† Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo,  
Brasil

**Endereço para correspondência:**

**Profa. Dra Stela Márcia Mattiello**

**Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos**

**Rodovia Washington Luis, Km 235**

**CEP: 13565-905**

**São Carlos, São Paulo, Brasil**

**Tel: (16) 3351-8039**

**Fax: (16) 3361-2081**

**E-mail: stela@ufscar.br**

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar a presença de apoptose pela expressão de caspase 3 e sua relação com a celularidade e espessura do tecido cartilaginoso em joelhos de ratos, na fase aguda após transecção do ligamento cruzado anterior (LCA), como modelo experimental de Osteoartrite (OA).

**Material e Métodos:** Setenta e dois ratos *Wistars* adultos foram divididos em 3 grupos: Grupo Transecção do LCA (TLCA); Grupo Controle (C); e Grupo Sham (S). Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos: 24hs, 48hs, 72hs e 1 semana, período após os procedimentos realizados. Os joelhos esquerdos dos animais foram utilizados para análise dos côndilos femorais. O material foi processado em parafina e corado com HE para a análise da celularidade e espessura da cartilagem por meio de morfometria. Também foi realizada análise imunohistoquímica para a expressão de caspase 3. A análise estatística foi realizada por meio dos testes de Kolmogorov-Smirnov, para avaliar a normalidade dos dados, e posteriormente ANOVA com *post hoc* de Duncan.

**Resultados:** Não houve diferença estatística para a celularidade e espessura da cartilagem articular entre os grupos estudados. Com relação à presença de caspase 3, todos os grupos tiveram maior expressão que os C. Os grupos TLCA 24h e TLCA 48h tiveram maior expressão de caspase-3 que seus respectivos C e S. O TLCA 72h não foi diferente do S 72h, e apresentou uma menor expressão de caspase 3 com relação aos outros grupos. O TLCA 7dias e S 7 dias tiveram maior expressão de caspase 3 que todos os outros grupos.

**Conclusão:** A apoptose de condrócito está presente desde o início da OA, quando se usa a transecção do LCA como modelo experimental, entretanto as mudanças com relação à celularidade e espessura do tecido poderão se modificar numa fase mais tardia.

**Palavras-Chave:** Cartilagem articular; Osteoartrite; Ligamento Cruzado Anterior; Condrócito; Apoptose

## Abstract

**Objective:** To evaluate the chondrocytes apoptosis by caspase 3 expression and its relation with the knee articular cartilage thickness and cellularity, at the acute phase after anterior cruciate ligament (ACL) transection, as the experimental model of osteoarthritis (OA). **Material and Methods:** Seventy two male *Wistars* rats were divided into 3 groups: ACL transection group (ACLT); control group (C); and sham group (S). Each group was subdivided into 4 subgroups: 24h, 48h, 72h and 1 week, according to the period following the procedures performed. The medial condyles of the left knees were processed in paraffin and stained with HE for cartilage thickness and cellularity analysis, by morphometry. Caspase 3 expression was evaluated through immunohistochemical method. Statistical analysis was performed by using the Kolmogorov-Smirnov test to assess the normality of the data, and then ANOVA with *post hoc* Duncan. **Results:** There was no statistical difference for articular cartilage thickness and cellularity between the groups. Regarding the caspase 3 expression, the C had smaller expression than the other groups. The ACLT 24h and ACLT 48h groups had increased expression of caspase-3 than their respective C and S. The ACLT 72h was not different from S 72h, and presented a lower caspase 3 expression compared to the other groups. The ACLT 7days and S 7days groups had higher expression than any other group. **Conclusion:** The chondrocyte apoptosis present since the OA beginning, using the ACL transection model of OA, however the articular cartilage thickness and cellularity changes can be modified at a later stage.

**Key-words:** Articular cartilage; Osteoarthritis; Anterior Cruciate Ligament; Chondrocyte; Apoptosis

## **Introdução**

Os condrócitos são as únicas células presentes na cartilagem articular, e sob condições fisiológicas, são responsáveis pelo equilíbrio entre a síntese e degradação que mantém a estrutura e integridade funcional de sua matriz extracelular (MEC) (GOLDRING; GOLDRING, 2004). A perda da homeostase dos condrócitos em favor das atividades catabólicas, leva à lenta e progressiva destruição da cartilagem articular, que caracteriza a doença articular degenerativa e progressiva, denominada Osteoartrite (OA). Conseqüentemente, a morte de condrócitos é vista como evento crucial na patogênese da OA (BLANCO 1998; HASHIMOTO 1998).

Detecção de morte celular tem sido feita em tecidos incluídos em parafina pelo método TUNEL, que se baseia na desfragmentação celular. No entanto, os resultados obtidos por este método devem ser interpretados com cautela, já que sinais positivos para a coloração de TUNEL também podem apontar para células necróticas e células em processo fisiológico de diferenciação. Para minimizar os erros na interpretação dos resultados, têm-se usado a imunolocalização de diferentes tipos de caspases (HATHAWAY; KUELCH, 2002). As caspases um grupo de cisteínas –enzimas intracelulares - que, quando ativada intrínseca ou extrinsecamente, promovem uma cascata de eventos que levam à apoptose. Esta cascata desempenha um papel vital na indução, transdução, ampliação e execução de sinais apoptóticos dentro da célula (MUSUMECI et al, 2011). A caspase 3 é uma caspase que e em sua forma ativa é um dos mediadores chaves da apoptose em sua fase de execução (THOMAS et al, 2007). Assim, a expressão de caspase 3 pelo condrócitos indica um processo apoptótico iminente.

Alterações bioquímicas importantes como a presença de apoptose de condrócitos são encontradas juntamente com alterações histológicas decorrentes da lesão do ligamento cruzado anterior (LCA) (MUTSUZAKI et al 2007; SABATINI et al, 2000; HATTORI et al 2006). No entanto, a relação tempo-dependente entre a apoptose de condrócitos e as alterações histológicas da cartilagem articular nas fases iniciais da OA ainda não são claras, necessitando de estudos para uma intervenção precoce na progressão da doença.

Estudos têm sido feitos para encontrar os possíveis mecanismos moleculares iniciais da destruição tecidual na OA, utilizando o modelo animal de transecção de LCA, uma vez que este promove alterações biomecânicas no joelho, que associadas a fatores bioquímicos, levam ao processo degenerativo do tecido (PRICE et al, 1999; STOOP et al, 2000; STOOP et al, 2001; QUASNICHKA et al, 2005; CLARK et al, 2006; HAYAMI et al, 2006; APPLETON et al, 2007). A transecção do LCA é um modelo da fase aguda da OA (LORENZ et al, 2005; ECHIGO et al, 2006). A grande preocupação em identificar quando a doença inicia se deve ao fato da maioria dos pacientes receberem tratamento somente quando sua função articular já está comprometida ou quando há dor, o que ocorre numa fase tardia da doença, onde alterações morfológicas e bioquímicas já ocorreram. (CLARK, 2006). O tratamento da OA inclui uma combinação de terapia não-farmacológica, farmacológica, e em alguns casos, cirurgia, onde a terapia farmacológica é paliativa para dor e proteção da degeneração da cartilagem (American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. 2000).

Sabe-se que os componentes da MEC são comprometidos na fase inicial da OA (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006; NELSON et al, 2006). Estudos têm mostrado que pode ocorrer uma adaptação do tecido cartilaginoso, com relação à quantidade de condrócitos, espessura da cartilagem e componentes da MEC, entretanto não está claro qual é a relação tempo-dependente para que estas mudanças ocorram, dificultando o tratamento e prevenção das alterações degenerativas da cartilagem (STOOP et al, 2001; GALOIS et al, 2004; CLARK et al, 2006; HAYAMI et al, 2006; HATTORI et al, 2006; THOMAS et al, 2007; MUTSUZAKI et al, 2007; SAKANE et al, 2009; THOMAS et al, 2010; MUSUMECI et al, 2011). Uma vez ocorrida as alterações moleculares e celulares, teremos o iminente desenvolvimento da OA. Assim, é importante identificar quais as alterações iniciais da cartilagem articular, após um evento traumático, caracterizado como uma das causas da OA nos indivíduos mais jovens.

Os estudos referentes ao patomecanismo da OA têm sido realizados após uma semana ou mais da lesão que desencadeia a OA, e identificaram que neste período já existem alterações da MEC e apoptose de condrócitos (PRICE et al, 1999; QUASNICHKA et al, 2005; NELSON et al, 2006; HATTORI et al, 2007; MUTSUZAKI et al, 2007; APPLETON et al, 2007). Neste sentido, é importante

investigar se imediatamente após a transecção do LCA, como modelo experimental de OA, eventos celulares já são visíveis, especialmente a apoptose de condrócito. Desta forma, quanto mais cedo for identificado o início de eventos celulares melhor poderá ser o prognóstico e as possibilidades de tratamento da doença.

## **Objetivos**

Avaliar a presença de apoptose pela expressão de caspase 3 e sua relação com a celularidade e espessura do tecido cartilaginoso em joelhos de ratos, na fase aguda após transecção do LCA, como modelo experimental de OA.

## **Material e Métodos**

### **Animais**

Setenta e dois ratos machos *Wistars* adultos, com aproximadamente  $293 \pm 21.05$ g, permaneceram agrupados em gaiolas plásticas (n=3) e tiveram livre acesso à água e ração e condições ambientais controladas.

O experimento foi conduzido de acordo com recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996) e foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Protocolo no. 015/2008).

Os animais foram divididos em 3 grupos (n=24): Grupo Transecção do LCA (TLCA); Grupo Controle (C); e Grupo Sham (S). Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos (n= 6): 24hs, 48hs, 72hs e 1 semana. Os animais dos subgrupos C não sofreram nenhum tipo de intervenção; os dos subgrupos TLCA foram submetidos à cirurgia de transecção do ligamento sob anestesia; e os animais do subgrupo S à intervenção cirúrgica, porém sem a transecção do ligamento. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram soltos na gaiola, de acordo com o período especificado para cada grupo.

## **Cirurgia de transecção do LCA**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados com os animais anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xylazina 12 mg/Kg/peso corporal e ketamina 95 mg/Kg/peso corporal). Foi realizada a tricotomia da região e uma incisão de aproximadamente 1cm na região medial do joelho esquerdo, ao lado da patela foi realizada. Posteriormente o joelho foi fletido e o ligamento patelar foi deslocado lateralmente para evidenciar-se a localização do LCA. Com uma tesoura oftálmica o LCA foi transeccionado. Durante todo o procedimento a articulação foi irrigada com solução fisiológica. Após, os tecidos rompidos foram suturados para o fechamento da região. Nenhuma medicação anti-inflamatória ou antibiótica foi administrada aos animais.

## **Preparo das peças para análise histológica**

A eutanásia foi realizada com os animais previamente anestesiados, por deslocamento cervical. O joelho esquerdo foi removido, a pele retirada e o material fixado em formol a 10% até seu processamento histológico. Os côndilos femorais foram descalcificados em Ácido Nítrico a 7,5% acrescido de glicerina na mesma concentração durante, aproximadamente, 10 dias. O côndilo medial foi separado do côndilo lateral, e esse material foi processado e embocado em parafina. O côndilo medial foi utilizado para as posteriores análises.

Cortes sagitais de 5µm de espessura foram feitos em intervalos de 50 µm de distância entre um e outro por meio do Micrótomo Leica RM2145.

## **Avaliação dos cortes histológicos**

As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para análise da celularidade e espessura da cartilagem articular, por meio de morfometria. Para isto foram feitas 3 fotos em um aumento de 100x, utilizando o software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss), ao longo de toda a extensão da cartilagem articular do côndilo femoral. As células de todo o campo da foto foram contadas manualmente (ANEXO 1, figura 1A), e foi feita a média da quantidade de células dos 3 campos. Para verificação da espessura, foi realizada uma medida central, desde o osso subcondral até a superfície da



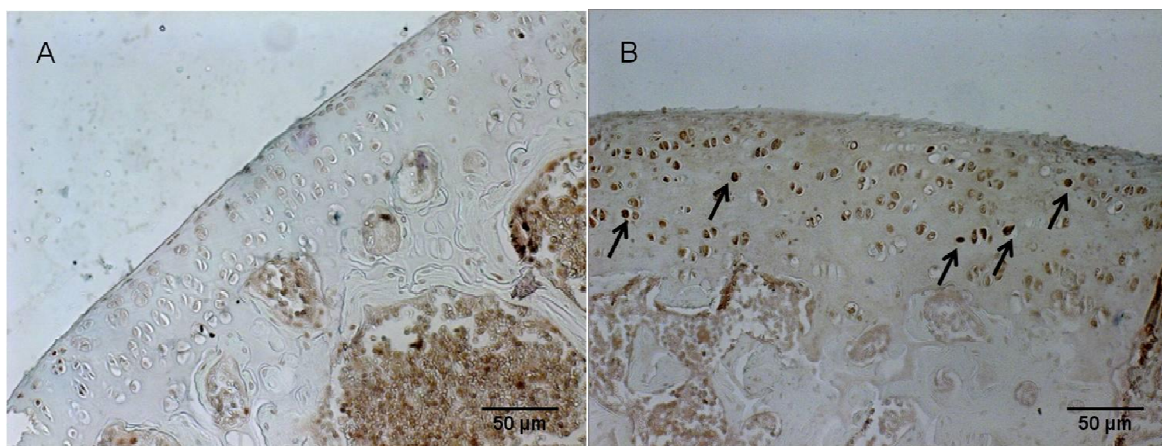
cartilagem, e a partir dessa, mais duas outras avaliações para a esquerda e para a direita foram feitas a cada 300  $\mu\text{m}$ , da mesma forma (ANEXO 1, figura 1B). Foi feita a média das 3 medidas de cada foto, e após obtivemos a média da espessura de cada campo da cartilagem articular.

## **Imunohistoquímica**

### **Análise da apoptose de condrócitos**

A análise da presença de apoptose de condrócitos na cartilagem articular, foi feita por imunohistoquímica por meio da expressão de caspase-3, utilizando o Kit ABC Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA), segundo as instruções do fabricante. Os cortes foram desparafinados e hidratados. Foi feita a recuperação antigênica com Condroitinase ABC (0.25 U/ml em PBS, pH 8.0; Sigma, St. Louis, MO, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente. Foi usado 0.2% de Triton X-100 em PBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) para adquirir a permeabilidade do tecido. As ligações não específicas foram bloqueadas usando o soro de cavalo por 30 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram incubados “overnight” à 4°C em câmara úmida com o anticorpo primário Affinity-Purified Rabbit Anti-human/mouse Caspase e active (R&D Systems, Abington, UK) diluído em uma concentração de 1:500. Foi utilizado o anticorpo secundário de cabra biotilado (Vectastain Universal ABC kit) por 45 minutos em temperatura ambiente. O sistema de detecção da Avidina Biotina foi utilizado segundo as instruções do Kit, por 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada usando o Kit substrato DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 10 minutos. Após, as lâminas foram contra-coradas com Methyl green por 10 minutos. As lâminas então foram desidratadas e montadas com Permount (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

Para análise dos resultados, foram feitas 5 fotos em um aumento de 200x, utilizando o software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss), ao longo de toda a extensão do tecido. Os núcleos corados em marrom escuro indicam caspase 3 positiva (figura 1b). As células positivas foram contadas, por dois avaliadores cegados, ao longo de todo o campo das 5 fotos, e foi obtida a média das células marcadas positivamente nestes 5 campos.



**Figura 1.** Fotomicrografia de imunohistoquímica da cartilagem articular dos côndilos femorais para identificação da expressão de caspase 3 (x 200). (A) Grupo Controle, com pouca expressão de caspase 3; (B) Grupo TLCA 7 dias, com maior expressão de caspase 3, indicada pela coloração marrom dos núcleos dos condrócitos (setas).

### **Análise estatística**

A correlação entre observadores para a análise da expressão de caspase-3, foi feita por meio do teste de Spearman ( $R \geq 0.8$  and  $p \leq 0.05$ ). Para análise da celularidade, espessura, e expressão da caspase 3, foi feito o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, e após a detecção da normalidade do dados foi utilizado o teste paramétrico ANOVA com *post hoc* de Duncan para avaliação das diferenças entre os grupos. O nível de significância foi considerado com  $\alpha$  de 5%.

### **Resultados**

Após a cirurgia, os animais se recuperaram rapidamente, e não houveram problemas de cicatrização visíveis. A análise dos joelhos dos ratos no momento da retirada das articulações após a eutanásia mostrou que não houve nenhum tipo de lesão macroscópica visível na superfície articular em nenhum grupo estudado.

### **Análise morfométrica de espessura**

Como mostra na tabela 1, não houve diferença estatística significativa entre os grupos com relação à espessura da cartilagem articular ( $p = 0,54$ ).

**Tabela 1.** Média das espessuras ( $\mu\text{m}$ ) da cartilagem articular dos côndilos femorais dos animais dos grupos controle, sham e TLCA nos diferentes períodos

<b>Subgrupo/grupo</b>	<b>controle</b>	<b>sham</b>	<b>TLCA</b>
<b>24h</b>	205,53 $\pm$ 36,56	179,07 $\pm$ 28,29	192,64 $\pm$ 24,8
<b>48h</b>	204,13 $\pm$ 29,32	204,36 $\pm$ 17,07	188,51 $\pm$ 28,31
<b>72h</b>	192,24 $\pm$ 39,65	197,27 $\pm$ 20,52	188,53 $\pm$ 35,3
<b>7 dias</b>	188,97 $\pm$ 38,62	188,26 $\pm$ 27,47	181,63 $\pm$ 21,14

### **Análise morfométrica de celularidade**

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos quanto à celularidade da cartilagem articular ( $p=0,51$ ) (tabela 2).

**Tabela 2.** Média da celularidade da cartilagem articular dos côndilos femorais dos animais dos grupos controle, sham e TLCA nos diferentes períodos

<b>Subgrupo/grupo</b>	<b>controle</b>	<b>sham</b>	<b>TLCA</b>
<b>24h</b>	420,99 $\pm$ 92,45	382,33 $\pm$ 39,21	315,33 $\pm$ 70,78
<b>48h</b>	473,33 $\pm$ 56,49	468,06 $\pm$ 78,19	404,11 $\pm$ 64,93
<b>72h</b>	405,46 $\pm$ 110,8	416,16 $\pm$ 74,86	443,94 $\pm$ 83,99
<b>7 dias</b>	404,8 $\pm$ 85,2	425,55 $\pm$ 79,81	413,38 $\pm$ 29,31

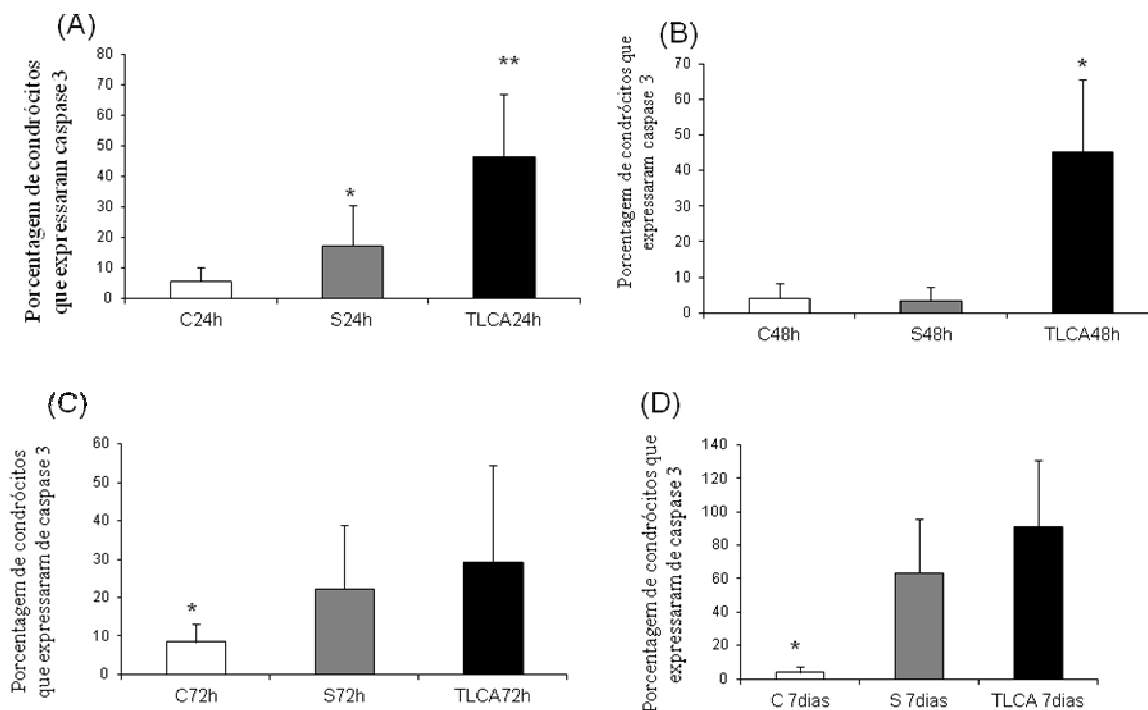
### **Análise da expressão de caspase 3**

A expressão de caspase 3 pelos condrócitos da cartilagem articular dos animais dos grupos C, S e TLCA nos diferentes períodos analisados pode ser vistos na prancha 1 (ANEXO 2).

Pôde-se observar que após 24h da transecção do LCA, os grupos C, S, e TLCA foram diferentes entre si, tendo o grupo S ( $17,35 \pm 13,47$  %) maior expressão que o grupo C ( $5,76 \pm 4,42$  %), e o TLCA ( $46,42 \pm 20,59$ ) maior expressão de caspase 3 que o grupo S. Após 48h da transecção do LCA, o grupo TLCA ( $45,33 \pm 20,22$  %) teve maior expressão de caspase 3 que o S ( $3,36 \pm 3,7$  %) e o C ( $4,18 \pm 4,1$  %) (figura 2B). No período de 72h após a transecção do LCA, pôde-se observar que os grupos TLCA ( $29,31 \pm 25,22$  %) e o S ( $22,31 \pm 16,5$  %) tiveram maior expressão de caspase 3 que o C ( $8,44 \pm 4,59$  %) (figura 2C). Sete dias após a transecção do LCA, os grupos TLCA ( $91,19 \pm 39,31$  %) e o S ( $63,36 \pm 32,5$  %) tiveram maior expressão de caspase 3 que o C ( $3,97 \pm 3,03$  %) (figura 2D).

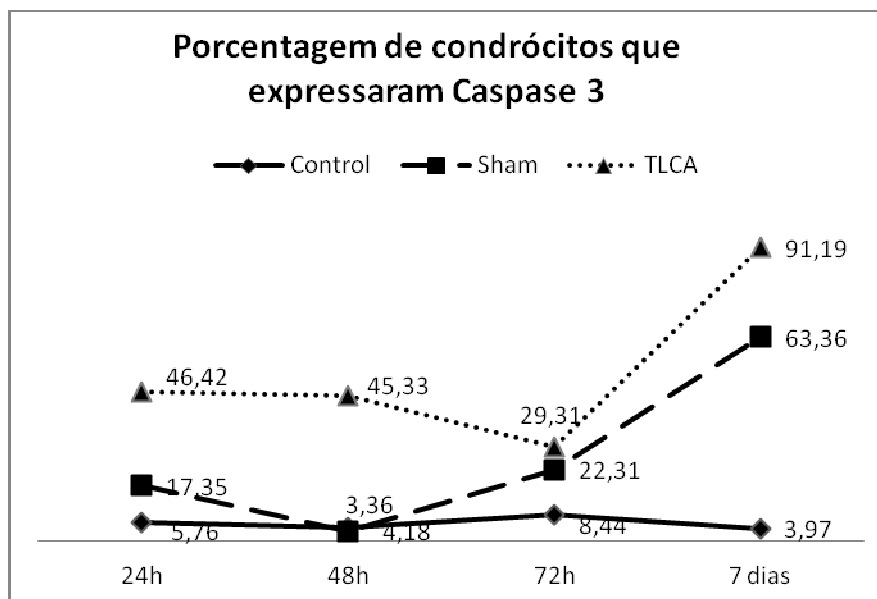
Como pode ser visto na figura 3, com o decorrer do tempo de 24h, 48h, 72h, e 7 dias, apenas o grupo C manteve a mesma média de expressão de caspase 3, inferior ao grupo S nos períodos de 24h, 72h e 7 dias e ao grupo TLCA em todos os períodos analisados. O grupo S mostrou expressão de caspase 3 em 24h, e em 48h a expressão foi pequena, sem diferença estatística com relação ao grupo C. Em 72h a expressão de caspase 3 no grupo S votou a subir, tendo o pico de expressão em 7 dias. O grupo TLCA teve a maior expressão de caspase 3, não sendo diferente estatisticamente do grupo S nos períodos de 72h e 7dias, com uma queda significativa na expressão em 72h, e tendo o pico de expressão em 7 dias após a transecção do ligamento.

### Expressão de Caspase 3



**Figura 2.** Análise da média da expressão da caspase 3 pelos condrócitos da cartilagem articular. (A) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 24h após a transecção do ligamento. O grupo TLCA teve maior expressão de caspase 3 que o C ( $p=0,00$ ) e o S ( $p=0,00$ ). O S teve maior expressão que o C ( $p=0,01$ ). (B) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 48h após a transecção do ligamento. O grupo TLCA teve maior expressão de caspase 3 que o S ( $p=0,00$ ) e o C ( $p=0,00$ ). (C) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 72h após a transecção do ligamento, onde os grupos TLCA e o S tiveram maior expressão de caspase 3 que o grupo C ( $p=0,00$ ). (D) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 7 dias após a transecção do ligamento. Os grupos TLCA e o S tiveram maior expressão de caspase 3 que o grupo C ( $p=0,00$ ).

Legenda dos grupos: C= Controle; S = Sham; TLCA = Transecção do LCA



**Figura 3.** Análise da expressão de caspase 3 dos grupos C, S e TLCA, no decorrer de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do LCA.

## Discussão

O achado mais importante do presente estudo foi o aparecimento de apoptose de condrócitos na cartilagem articular logo nas primeiras horas após a transecção do LCA, sugerindo um processo inflamatório articular inicial, que progride para o início da OA. A apoptose de condrócitos é um evento crucial na patogênese da OA (LOTZ, HASHIMOTO; KÜHN, 1999; BLANCO et al 1998, MUTSUZAKI et al, 2007; THOMAS et al, 2007). No entanto, ainda não está claro se a apoptose de condrócitos é causa ou resultado da quebra da MEC da cartilagem articular, pois os estudos realizados até o momento avaliam a cartilagem articular em estágios mais avançados da OA (THOMAS et al, 2007; MUTSUZAKI et al, 2007). Assim, a apoptose de condrócitos deve ser analisada muito precocemente, no período agudo da OA. Em vista disso, ressalta-se a importância do presente estudo, que mostrou a presença de apoptose na cartilagem articular nas primeiras 24h, 48h, 72h e 7dias após a lesão do LCA, assim como no grupo S, mostrando que a morte de condrócitos ocorre de forma aguda no período analisado.

Os resultados apresentados na figura 3, mostram que 24h após a transecção do LCA, houve uma maior expressão de caspase 3 pelos condrócitos da cartilagem

articular, sugerindo que a morte de condrócitos ocorre agudamente à lesão gerada. Nos períodos de 48h e 72h após a transecção do ligamento ocorreu uma redução significativa na expressão de caspase 3, que volta a aumentar de forma mais exacerbada no período entre 72h e 7 dias. Isto sugere que provavelmente a instabilidade mecânica gerada pela transecção do LCA leva a alterações nos padrões de marcha dos animais, e sobrecarrega constantemente a articulação, o que perpetua a presença de morte de condrócitos no tecido. Tais acontecimentos contribuem para a degeneração progressiva da cartilagem articular que ocorre na OA.

Pode-se observar também, que nos períodos de 24h, 72h e 7dias após a transecção do LCA, houve um aumento na expressão de caspase 3 no grupo S quando comparado ao grupo C. Sabe-se que em fases agudas e subagudas após uma lesão, citocinas inflamatórias afetam a apoptose de condrócitos e a degradação da MEC (HIROTA et al 2006). Acredita-se que apenas a intervenção cirúrgica pode ter gerado um processo inflamatório nos animais, que pode ter desencadeado o processo de morte celular. Outro fator que pode ter gerado a apoptose de condrócitos no grupo S após 48h até 7 dias de lesão é o fator da alteração de marcha dos animais decorrente do possível processo inflamatório gerado pela cirurgia, porém, neste estudo não foi analisado o padrão de marcha dos animais. Vale salientar que os estudos encontrados na literatura usando esse modelo como indutor de OA utilizam o grupo Sham como único controle, ou a pata contralateral operada, porém sem a transecção do ligamento (HATTORI et al, 2006; HAYAMI ET AL 2006; SAKANE et al 2009). Essa forma de análise não permite a visualização dos efeitos da cirurgia sobre o tecido cartilaginoso como pôde ser visto no nosso estudo. O modelo experimental utilizado pode ter sido agressivo e ter afetado a cartilagem de forma indireta.

Outro achado importante do presente estudo foi o fato da apoptose de condrócitos preceder as alterações histológicas avaliadas – celularidade e espessura - pois, apesar de haver apoptose nas primeiras 24h após a transecção do LCA, não houve nenhuma alteração na quantidade de condrócitos ou na espessura da cartilagem nos grupos analisados. Alguns estudos também sugerem que a apoptose de condrócitos precedem ou induzem alterações histológicas degenerativas da cartilagem articular frente a estímulo de lesão: Mutsuzaki et al (2007) observaram apoptose de condrócitos entre 19 e 206 dias na região de inserção do LCA após a sua transecção, e o número de

condrócitos e a quantidade de GAG da MEC diminuíram com o tempo. Hattori et al (2006), observaram que a apoptose de condrócito precedeu a perda de GAG na região de inserção do LCA após sua transecção. Sakane et al (2009) observou apoptose de condrócitos em 1 e 2 semanas após transecção do LCA, e diminuição de GAG após 1 a 6 semanas na região da cartilagem calcificada, e na região da cartilagem não-calcificada a apoptose ocorreu entre 2-4 semanas, e a perda de GAG após 6 semanas da transecção do LCA. Como visto nestes estudos, a partir de 1 semana após a transecção do LCA já começam a aparecer alterações histológicas na cartilagem articular, que são precedidas pela apoptose de condrócitos. Desta forma nosso estudo ajuda a compreender a patologia da OA, e destaca a importância da apoptose de condrócitos ocorrer em um período onde ainda não houveram alterações nas estruturas analisadas. Desta forma, de 24h até 7dias após lesão do LCA é um período chave para o controle da apoptose de condrócitos, para tentar diminuir a progressão da doença.

Uma limitação do nosso estudo foi não avaliar marcadores inflamatórios, como  $TNF\alpha$ , MMPs, e COMP (cartilage oligomeric matrix protein), já que são enzimas essenciais para o remodelamento e homeostase da MEC, assim como componentes da MEC como colágeno e proteoglicanos, para identificar se estes componentes são comprometidos juntamente com a morte de condrócitos neste período após a transecção do LCA. Estudos futuros com avaliação de marcadores inflamatórios e outros componentes da MEC como proteoglicanos e colágeno devem ser feitos para complementar os achados sobre a apoptose de condrócitos em todos os períodos analisados após a transecção do LCA. Também, a avaliação da cartilagem articular após 2 semanas, poderia esclarecer o aparecimento de apoptose no grupo S.

## **Conclusão**

Os resultados deste estudo mostram que a apoptose de condrócitos acontece nas primeiras 24 h após transecção do LCA, ou seja, na fase aguda da OA. Desta forma, o intervalo entre 24h e 7 dias pode ser um período chave importante para o controle desse evento celular, bem como para propor uma intervenção terapêutica no tratamento da OA.



## **Agradecimentos**

Agradecemos à Adriana Frias Renner, pela colaboração nos procedimentos cirúrgicos, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **Referências Bibliográficas**

1. Goldring SR, Goldring MB: The role of cytokines in Cartilage Matrix Degeneration in Osteoarthritis. *Clin Orthop Rel Res* 2004; 427S:27-36.
2. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F: Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 1998; 41:284-289.
3. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M: Linkage of chondrocytes apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:1632-1638.
4. Lotz M, Hashimoto S, Kühn K: Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7:389-391.
5. Hathaway TR, Kuelch MK: Apoptosis and cutaneous biology. *Adv Dermatol* 2002; 18:287-311.
6. Musumeci G, Loreto C, Carnazza ML, Martinez G: Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011; 19:307-313.
7. Thomas CM Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M: Chondrocyte apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15:27-34.
8. Mutsuzaki H, Sakane M, Ikeda K, Ishii T, Hattori S, Tanaka J et al: Histological changes and apoptosis of cartilage layer in human anterior cruciate ligament tibial insertion after rupture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007; 15, 602-609.
9. Sabatini M, Rolland G, Léonce S, Thomas M, Lesur C, Pérez V et al: Effects of ceramide on apoptosis, proteoglycan degradation, and matrix metalloproteinase expression in rabbit articular cartilage. *Biophys Res Commun* 2000; 267:438-444.
10. Hattori S, Sakane M, Mutsuzaki H, Tanaka J, Ochiai N, Nakajima H: Chondrocyte apoptosis and decrease of glycosaminoglycan in cranial cruciate ligament insertion after resection in rabbits. *J Vet Med Sci* 2006; 69, 3: 253-258.

11. Price JS, Till SH, Bicerstaff DR, Bayliss MT, Hollander AP: Degradation of cartilage type II collagen precedes the onset of osteoarthritis following anterior cruciate ligament rupture. *Arthritis Rheum* 1999; 42, 11:2390-98.
12. Stoop R, Buma P, Van Der Kraan PM, Hollander AP, Billingham RC, Poole AR et al: Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rats stifle joints after cranial cruciate ligament transaction. *Arthritis Rheum* 2000; 43,9: 2121-2131.
13. Stoop R, Buma P, Van Der Kraan PM, Hollander AP, Billingham RC, Meijers THM et al: Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transaction in rats. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 308-315.
14. Quasnicka HL, Anderson-Mackenzie JM, Tarlton JF, Sims TJ, Billingham MEJ, Bailey AJ: Cruciate ligament laxity and femoral intercondylar notch narrowing in early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52, 10:3100-09.
15. Clark AL, Leonard TR, Barclay LD, Matyas JR, Herzog W: Heterogeneity in patellofemoral cartilage adaptation to anterior cruciate ligament transaction; chondrocyte shape and deformation with compression. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14:120-130.
16. Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duon LT: Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transaction and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 2006; 38:234-243.
17. Appleton CTG, Mcerlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL et al: Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9, 1:3-15.
18. Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W: Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R156-65.
19. Echigo R, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki, N: Suppressive effects of hyaluronan on chondrocyte apoptosis in experimentally induced acute osteoarthritis in dogs. *J Vet Med Sci* 2006; 68, 8:899-902.

20. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1905-15.
21. Aigner T, Soeder S, Haag J: IL-1 $\beta$  and BMPs – Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *European Cells and Materials* 2006; 12:49-56.
22. Nelson F, Billingham RC, Pidoux I, Reiner A, Langworthy M, Mcmerritt M et al: Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of anterior cruciate ligament. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14:114-119.
23. Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-Pinzano A, Courni-Henrionnet C, Loeuille D et al: Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12:779-786.
24. Sakane M, Mutsuzaki H, Hattori S, Nakajima H, Ochiai N: Time dependence of changes of two cartilage layers in anterior cruciate ligament insertion after resection on chondrocyte apoptosis and decrease in glycosaminoglycan. *Sports Med Arthro Rehab Ther Technol* 2009; 11, 27:1-6.
25. Thomas CM, Whittles CE, Fuller CJ, Sharif M: Variations in chondrocytes apoptosis may explain the increased prevalence of osteoarthritis in some joints. *Rheumatol Int* 2010; 31(10):1341-8.
26. NATIONAL RESEARCH COUNCIL Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington DC 1996.
27. Hirota Y, Habu M, Tominaga K, Sukedai M, Matsukawa A, Nishihara T et al: Relationship between TNF-alpha and TUNEL-positive chondrocytes in antigen-induced arthritis of the rabbits temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med* 2006; 35:91-98.

**ARTIGO 2: “Análise da expressão de TNF- $\alpha$  e IL1 $\alpha$  locais e sistêmicos na fase aguda da osteoartrite “**

**Análise da expressão de TNF- $\alpha$  e IL1 $\alpha$  locais e sistêmicos na fase aguda da osteoartrite**

†Carolina Náglio Kalil Dias, †Fernando Augusto Vasilceac, ††João Luiz Quaglioti Durigan, ††† Alexandra Ivo de Medeiros, †Stela Márcia Mattiello

† Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil

†† Departamento de Fisioterapia, Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil

††† Departamento de Farmácia, Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil

**Endereço para correspondência:**

**Profa. Dra Stela Márcia Mattiello**

**Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos**

**Rodovia Washington Luis, Km 235**

**CEP: 13565-905**

**São Carlos, São Paulo, Brasil**

**Tel: (16) 3351-8039**

**Fax: (16) 3361-2081**

**E-mail: stela@ufscar.br**

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar a presença de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  circulantes no sangue e na cartilagem articular de joelhos de ratos, na fase aguda após transecção do ligamento cruzado anterior (LCA). **Material e Métodos:** Setenta e dois ratos machos *Wistars* adultos foram divididos em 3 grupos: Grupo Transecção do LCA (TLCA); Grupo Controle (C); e Grupo Sham (S). Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos: 24hs, 48hs, 72hs e 7 dias, período após os procedimentos realizados. Imediatamente antes da eutanásia, os animais foram anestesiados e foi coletado o sangue intra-cardíaco para avaliação das citocinas inflamatórias IL1- $\alpha$  e TNF-  $\alpha$  sistêmicas, utilizando o método ELISA. Após a eutanásia, a porção distal dos fêmures esquerdos foram removidos e processados em parafina para a análise imunohistoquímica da presença das citocinas inflamatórias IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$  na cartilagem articular. A análise estatística utilizou o teste de Spearman para a correlação dos resultados inter-observadores, o teste de Kolmogorov-Smirnov avaliou a normalidade dos dados, e os testes de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Newman-Keuls avaliaram os resultados entre os grupos. **Resultados:** A análise da cartilagem articular mostrou que o grupo TLCA teve um aumento no número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  em 24h, havendo uma queda após 48h, e voltado a subir após 72h, tendo o maior número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  em 7 dias após a transecção do LCA. O número de condrócitos que expressaram IL1 $\alpha$  foi maior no grupo TLCA em 24h e 48h após a transecção LCA, havendo uma queda após 72h e 7 dias da transecção. O grupo S teve o mesmo comportamento de expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  que o grupo TLCA, porém em menor proporção. Não houve correlação entre TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  presentes na cartilagem articular. Não houve expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  no soro em nenhum grupo. **Conclusão:** As citocinas TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  ligadas a degradação da cartilagem estão expressas na cartilagem articular na fase aguda da OA em modelo experimental de transecção do LCA, entretanto sua expressão sistêmica não se manifesta no mesmo período, apontando que o aparecimento das mesmas ocorre primeiramente apenas na cartilagem articular.

**Palavras-Chave:** Osteoartrite; TNF $\alpha$ ; IL1 $\alpha$ ; cartilagem articular; ligamento cruzado anterior

## Abstract

**Objective:** To evaluate the presence of TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  circulating in the blood and in the articular cartilage of rat knees in the acute phase after anterior cruciate ligament transection (ACLT). **Material and Methods:** Seventy two male *Wistars* rats were divided into 3 groups: ACL transection group (ACLT); control group (C); and sham group (S). Each group was subdivided into 4 subgroups: 24h, 48h, 72h and 1 week, according to the period following the procedures performed. Immediately before sacrifice, animals were anesthetized and the intra-cardiac blood was collected to assess IL1- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  by using the ELISA method. After sacrifice, medial condyles of the left knees were processed in paraffin for immunohistochemical analysis of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  in articular cartilage. Statistical analysis was performed by using the Kolmogorov-Smirnov test to assess the normality of the data, the Spearman test for the inter-observer correlation, and Kruskal-Wallis tests with *post hoc* Newman-Keuls to analyze the results among groups. **Results:** The articular cartilage analysis showed that the TLCA group had an increase in the number of chondrocytes that express TNF in 24 hours. After 48 hours this expression decreased, and rise again after 72 hours, with the greatest number of chondrocytes that expressed TNF $\alpha$  in 7 days after ACL transection. The number of chondrocytes that expressed IL1 $\alpha$  in TLCA group was higher at 24h and 48h after ACL transection, and start to decrease until 72h after ACL transection. The S group had the same pattern of TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression that in the TLCA group, but in a lesser extent. There was no correlation between TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  present in articular cartilage. There was no expression of TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  in the blood serum in any group. **Conclusion:** The TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  linked to cartilage degradation are expressed in articular cartilage in the acute phase after ACL transection, as an experimental model of OA, but its systemic expression does not occur in the same period, indicating that they are first present only in articular cartilage.

**Keywords:** Osteoarthritis; TNF; IL1 $\alpha$ ; Articular Cartilage, Anterior Cruciate Ligament

## Introdução

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa, lenta e progressiva, resultante de eventos mecânicos e biológicos cumulativos. A patologia desta doença resulta em destruição da cartilagem articular, decorrente da falha dos condrócitos em manter o balanço entre síntese e degradação da matriz extracelular, promovendo múltiplas alterações nos componentes articulares como células e matriz, além de alterar a produção molecular, com presença de citocinas pró-inflamatórias, e gerar remodelamento do osso sub-condral (POOLE, 2001; GOLDRING, 2000; ISHIGURO, KOJIMA; POOLE, 2002).

A inflamação na OA tem sido investigada no processo de degradação da cartilagem articular. O catabolismo excessivo da cartilagem antes de gerar os sintomas da OA, resulta em liberação de produtos de quebra da MEC no fluido sinovial e leva à resposta inflamatória da membrana sinovial, onde os macrófagos recrutam neutrófilos da circulação, promovendo uma sinovite e liberando citocinas proinflamatórias, prostaglandina E2 (PGE2), proteinases e radicais oxigênio-livres nos tecidos adjacentes e no fluido sinovial. Estes mediadores ativam os condrócitos da cartilagem e os fibroblastos sinoviais, modificando a biosíntese de PGs, colágeno e ácido hialurônico, e promovendo a liberação de mediadores catabólicos na cartilagem articular (GHOSH; SMITH, 2002). Assim, os maiores eventos na patogênese da OA estão localizados dentro da própria cartilagem (CALICH, DOMICIANO; FULLER, 2010).

Citocinas inflamatórias desenvolvem um papel chave no *onset* da OA. A IL1 é uma citocina pró-inflamatória de grande importância na degeneração da cartilagem articular. Possui múltiplos efeitos nos condrócitos articulares: deprime a regulação da expressão de agrecano e o colágeno tipo II; contrabalança os efeitos dos fatores anabólicos de síntese de matriz; e induz a expressão das principais enzimas de degradação dos componentes da matriz, as metaloproteinases (MMPs) 1, 3 e 13 (AIGNER, SOEDER; HAAG, 2006). Outra citocina envolvida no mecanismo de degeneração da cartilagem articular é o TNF- $\alpha$ , que possui efeitos similares no condrócito, incluindo estimulação da produção de proteinases de degradação de matriz e supressão de síntese de matriz da cartilagem. Além do efeito catabólico da IL1 e do TNF- $\alpha$ , contrário aos efeitos da atividade sintética do condrócito, estas citocinas



isoladas ou associadas entre si inibem a síntese de proteoglicanas e de colágeno tipo II. Porém não existe um consenso que determine se a IL1 e o TNF- $\alpha$  agem sinergicamente ou em tempos diferentes, e se o efeito sinérgico de ambas agrava a OA (GOLDRING, 2000). Segundo Van Den Berg (2001), a presença de TNF- $\alpha$  é suficiente para guiar o *onset* da OA, enquanto o IL1 tem o papel central em sustentar a inflamação e a erosão da cartilagem. Da mesma forma, não se sabe o momento exato em que estas citocinas estão expressas na cartilagem articular em situação de degradação.

Os estudos realizados para determinar as citocinas inflamatórias presentes na OA avançada em humanos geralmente analisam o líquido sinovial (MARKS; DONALDSON, 2005; IRIE, UCHIYAMA; IWASO, 2002; CUELLAR et al, 2010), o soro sanguíneo (PAGURA et al, 2005) e urina (STREICH et al, 2010). Desta forma, estudos em modelos experimentais de transecção do ligamento cruzado anterior (LCA) na fase aguda da OA têm sido utilizados, entretanto avaliando as alterações inflamatórias e estruturais que ocorrem somente 1 semana ou mais após a lesão que desencadeia a OA (APPLETON, et al, 2007; HATTORI et al, 2007; MUTSUZAKI et al, 2007; QUASNICHKA et al, 2005; NELSON et al, 2006; PRICE et al, 1999). Todd e colaboradores (2011) afirmam que a fase inicial de lesões agudas do joelho representa a melhor oportunidade para o tratamento biológico no intuito de promover a cura ou desacelerar/prevenir a cascata do processo articular destrutivo que leva à OA.

Desta forma, o presente estudo buscou investigar a expressão de citocinas inflamatórias na cartilagem articular de joelhos de ratos, e sua presença no soro dos animais a fim de entender se estas agem concomitante na fase aguda da OA.

## **Objetivos**

Avaliar a expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  circulantes no sangue, e expressas na cartilagem articular o joelho de ratos, 24h, 48h, 72h e 7 dias após transecção do LCA, como modelo experimental de Osteoartrite (OA).

## **Material e Métodos**

### **Animais**

Setenta e dois ratos machos *Wistars* adultos, com aproximadamente  $293 \pm 21.05\text{g}$ , permaneceram agrupados em gaiolas plásticas ( $n=3$ ) e tiveram livre acesso à água e ração e condições ambientais controladas.

O experimento foi conduzido de acordo com recomendações éticas internacionais (National Research Council, 1996) e foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFSCar (Protocolo no. 015/2008).

Os animais foram divididos em 3 grupos: Grupo Transecção do LCA (TLCA); Grupo Controle (C); e Grupo Sham (S). Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos: 24hs, 48hs, 72hs e 7 dias. Os animais dos subgrupos C não sofreram nenhum tipo de intervenção; os dos subgrupos TLCA foram submetidos à cirurgia de transecção do ligamento sob anestesia; e os animais do subgrupo S à intervenção cirúrgica, porém sem a transecção do ligamento. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram soltos na gaiola, de acordo com o período especificado para cada grupo.

### **Cirurgia de transecção do LCA**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados com os animais anestesiados (injeção intraperitoneal de solução de xylazina  $12\text{ mg/Kg/peso corporal}$  e ketamina  $95\text{ mg/Kg/peso corporal}$ ). Foi realizada a tricotomia da região e uma incisão de aproximadamente  $1\text{cm}$  na região medial do joelho esquerdo, ao lado da patela foi realizada. Posteriormente o joelho foi fletido e a patela foi deslocada lateralmente para evidenciar-se a localização do LCA. Com uma tesoura oftálmica o LCA foi transecionado. Durante todo o procedimento a articulação foi irrigada com solução fisiológica. Após, os tecidos rompidos foram suturados para o fechamento da região. Nenhuma medicação anti-inflamatória ou antibiótica foi administrada aos animais.

### **Preparo das peças para análise histológica**

A eutanásia foi realizada com os animais previamente anestesiados, por deslocamento cervical. O joelho esquerdo foi removido, a pele retirada e o material fixado em formol a 10% até seu processamento histológico. Os cêndilos femorais foram

descalcificados em Ácido Nítrico a 7,5% acrescido de glicerina na mesma concentração durante, aproximadamente, 10 dias. O côndilo medial foi separado do côndilo lateral, e esse material foi processado e emblocado em parafina. O côndilo medial foi utilizado para as posteriores análises.

Cortes sagitais de 5µm de espessura foram feitos em intervalos de 50 µm de distância entre um e outro por meio do Micrótomo Leica RM2145.

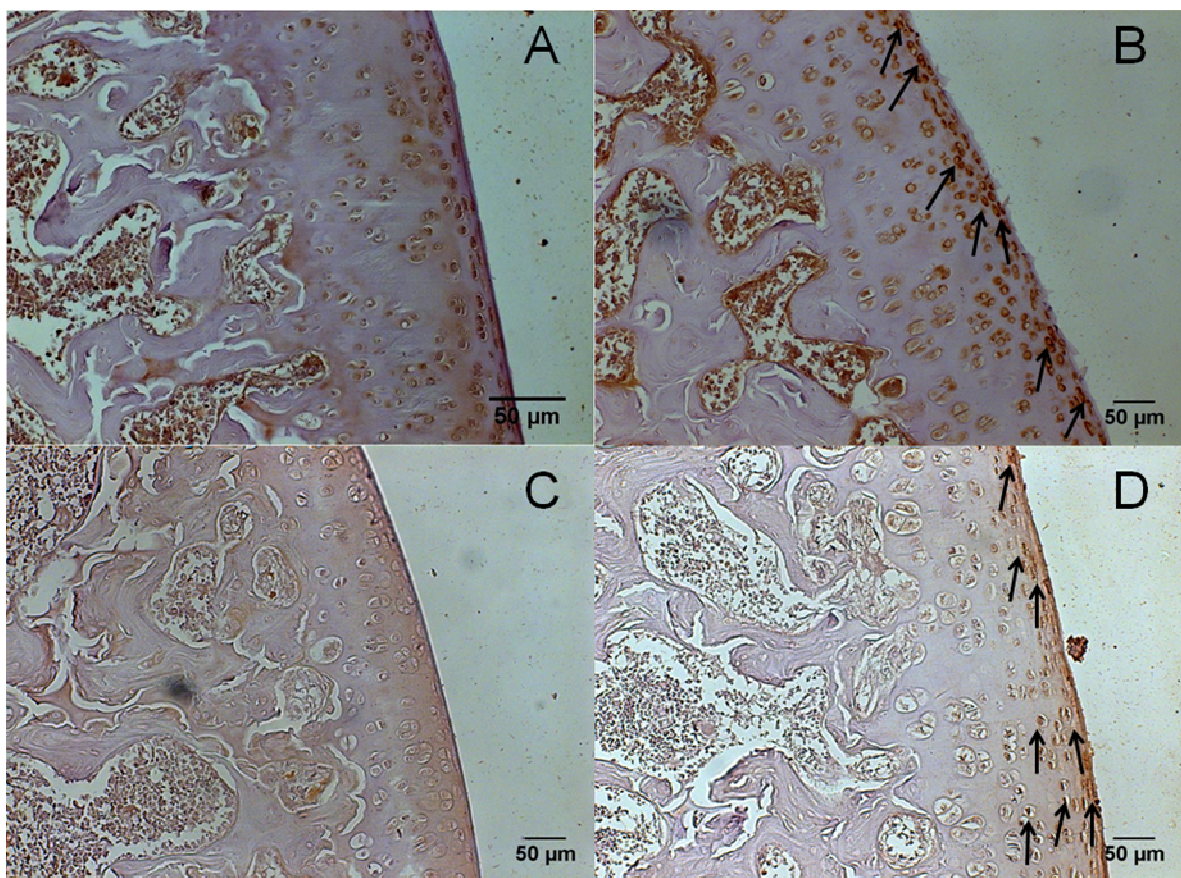
## **Imunohistoquímica**

### **Análise da expressão de TNF $\alpha$ e IL1 $\alpha$ pelos condrócitos**

A análise da expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  pelos condrócitos da cartilagem articular foi feita por imunohistoquímica, utilizando o Kit ABC Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, CA), segundo as instruções do fabricante. Foram utilizadas lâminas de Poli-L-lysina, e os cortes foram desparafinados e hidratados. Foi feita a recuperação antigênica com Tampão Citrato, pH 6.0, em microondas, e a permeabilidade foi adquirida usando 0.2% de Triton X-100 em PBS (Sigma, St. Louis, MO, USA). As ligações não específicas foram bloqueadas usando soro de cavalo por 30 minutos, em temperatura ambiente. Os cortes foram incubados overnight à 4°C em câmara úmida com seus respectivos anticorpos primários: Rabbit Polyclonal TNF- $\alpha$  (Abcam Inc., Cambridge, MA) diluído em uma concentração de 1:2000; e Mouse monoclonal IL1  $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology Inc, California, USA) diluído em uma concentração de 1:50. Foi utilizado o anticorpo secundário biotilado de cabra por 45 minutos em temperatura ambiente. O sistema de detecção da Avidina Biotina foi utilizado segundo as instruções do Kit, por 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada usando o Kit substrato DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 10 minutos. Após, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina. As lâminas então foram desidratadas e montadas com Permount (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

Para análise dos resultados, foram capturadas 5 imagens das lâminas imunomarcadas por TNF $\alpha$  e 5 imagens das lâminas imunomarcadas por IL1 $\alpha$ , ao longo de toda a extensão do tecido em um aumento de x200, utilizando o software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss). Foram consideradas positivas as marcações por TNF $\alpha$  quando os

citoplasmas e periferia dos condrócitos foram marcados em marrom escuro como ilustra a Figura 1b. Da mesma forma, as células imunomarcadas por IL1 $\alpha$  também possuíam seu citoplasma e periferia corados em marrom escuro (figura 1d). A análise das lâminas de TNF e das lâminas de IL1 foi feita separadamente. As células positivamente marcadas por cada citocina foram contadas manualmente, por dois avaliadores cegados, ao longo de todo o campo das 5 imagens, e a média das células marcadas positivamente nestes 5 campos foi obtida.



**Figura 1.** Fotomicrografia de imunohistoquímica da cartilagem articular dos côndilos femorais (x 200) para TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  (A) TNF $\alpha$  no grupo Controle; (B) TNF $\alpha$  no grupo TLCA, 7 dias após a transecção do LCA, com muitos condrócitos expressando TNF $\alpha$  (setas); (C) IL1 $\alpha$  no grupo Controle; (D) IL1 $\alpha$  no grupo TLCA, 48h após a transecção do LCA, com muitos condrócitos expressando IL1 $\alpha$  (setas).

### **Análise da expressão de TNF $\alpha$ e IL1 $\alpha$ circulantes no sangue**

O sangue intra-cardíaco colhido antes do sacrifício permaneceu armazenado em geladeira por 4 horas para sedimentação. Posteriormente, foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos e o soro foi congelado a -80°C. As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  foram quantificadas no soro pelo método ELISA (Duoset ELISA Development System, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA), de acordo com instruções do fabricante, utilizando anticorpos específicos para cada uma. A leitura das amostras foi feita em filtro de 445 nm.

### **Análise estatística**

Foi feita correlação entre observadores para a análise da expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  na cartilagem articular, utilizando o teste de Spearman ( $r \geq 0,8$  e  $p \leq 0,05$ ). Foi feito o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para todos os dados, e após a detecção da normalidade dos dados foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis com *post hoc* de Newman-Keuls para avaliação das diferenças entre os grupos. O nível de significância foi considerado com  $\alpha$  de 5%.

### **Resultados**

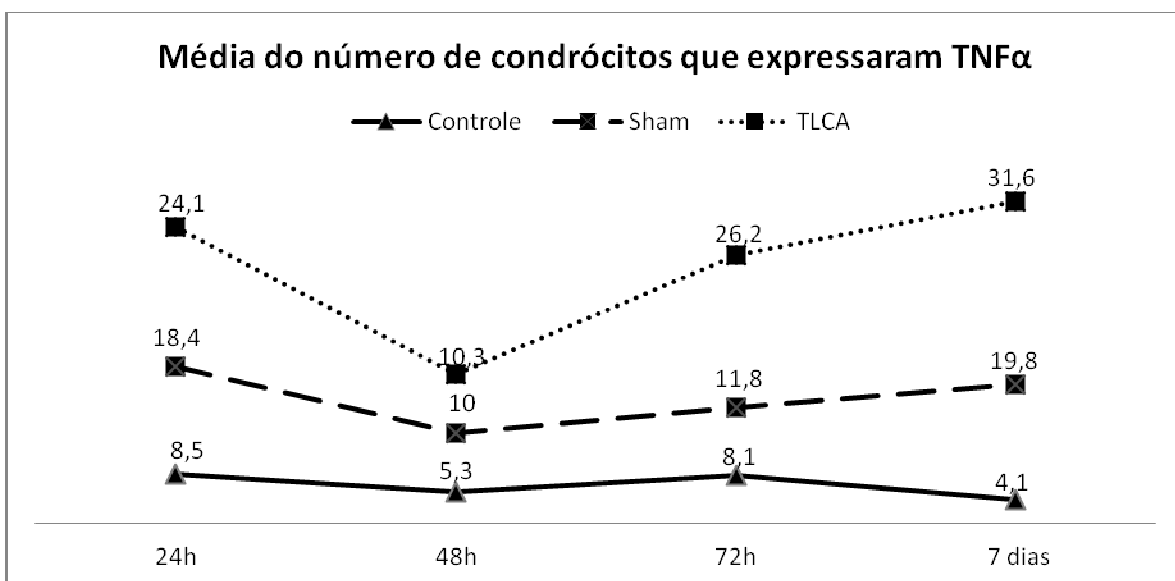
Os animais se recuperaram rapidamente, não havendo intercorrências com as cirurgias. A análise dos joelhos dos ratos no momento da retirada das articulações após a eutanásia mostrou que não houve nenhum tipo de lesão macroscópica visível na superfície articular em nenhum grupo estudado.

### **Expressão de TNF $\alpha$ pelos condrócitos da cartilagem articular**

A expressão de TNF $\alpha$  pelos condrócitos da cartilagem articular dos animais dos grupos C, S, e TLCA nos diferentes períodos analisados pode ser vista na prancha 2 (ANEXO 3). Quando comparamos todos os grupos foi possível identificar, ao longo do experimento que apenas o grupo C manteve a mesma média de condrócitos que

expressaram TNF $\alpha$ , menor que os grupos S e TLCA (figura 2). O grupo TLCA teve um aumento no número de condrócito que expressaram TNF $\alpha$  24h após a transecção LCA, e a quantidade de condrócitos que expressaram esta citocina diminuiu significativamente em 48h ( $p<0,05$ ), aumentando novamente após 72h da transecção, sendo o período de 7 dias com o maior número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  na cartilagem articular ( $p<0,05$ ) (figura 2). O grupo S também teve um aumento no número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  quando comparado ao grupo C nos períodos de 24h, 48h, e 7 dias ( $p<0,05$ ) após a transecção do LCA, porém o número de condrócitos que expressaram TNF foi menor que no grupo TLCA (figura 2).

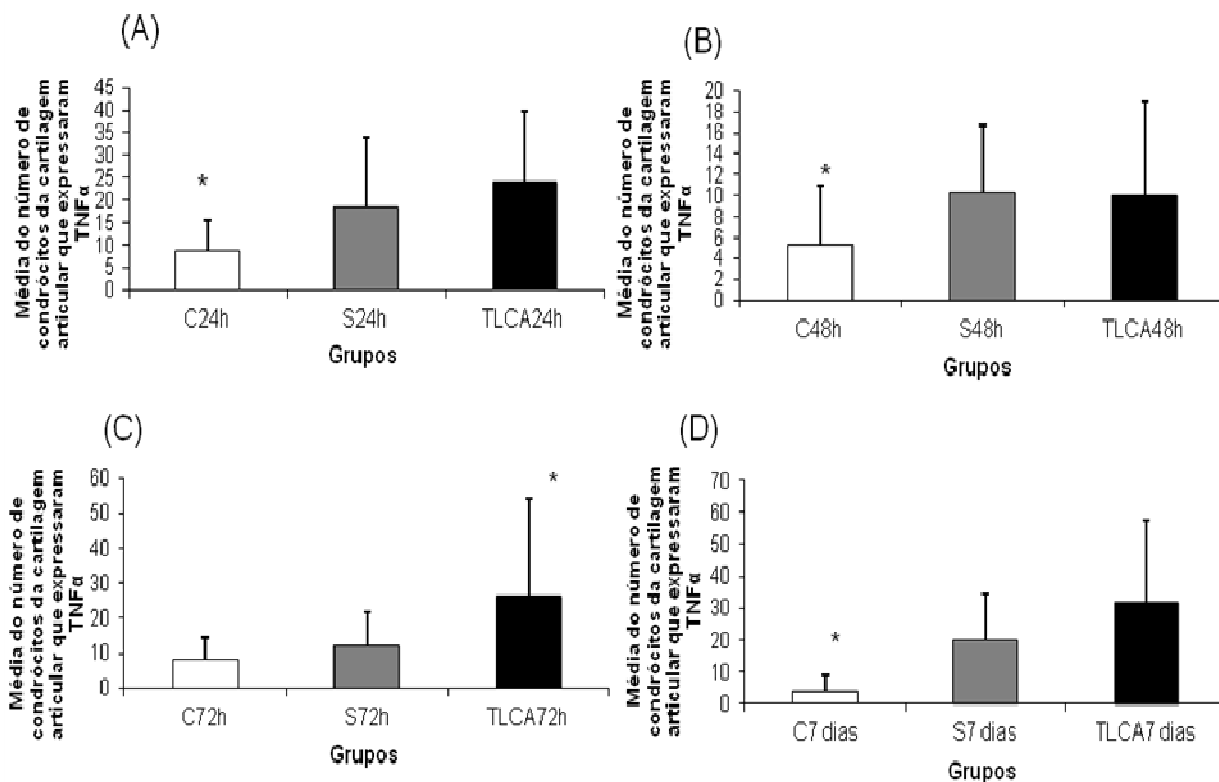
A figura 3 mostra as diferenças entre os grupos C, S, e TLCA nos diferentes períodos analisados.



**Figura 2.** Média do número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  nos grupos C, S e TLCA, no decorrer de 24h, 48h, 72h e 7 dias após transecção do LCA.

Legenda dos grupos: TLCA = grupo Transecção do LCA; S = grupo Sham; C = grupo Controle

### Expressão de TNF $\alpha$ pelos condrócitos da cartilagem articular



**Figura 3.** Média do número de condrócitos da cartilagem articular que expressaram TNF $\alpha$ . (A) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 24h após a transecção do LCA. Os grupos S e TLCA tiveram maior número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  comparado ao grupo C. (B) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 48h após a transecção do LCA. Os grupos S e TLCA tiveram maior número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  comparado ao grupo C ( $p=0,04$ ). (C) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 72h após a transecção do LCA, onde o grupo TLCA teve maior número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  comparado aos grupos C ( $p < 0,01$ ) e S ( $p=0,02$ ). (D) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 7 dias após a transecção do LCA. Os grupos S e TLCA tiveram maior número de condrócitos que expressaram TNF $\alpha$  comparado ao grupo C ( $p < 0,01$ ).

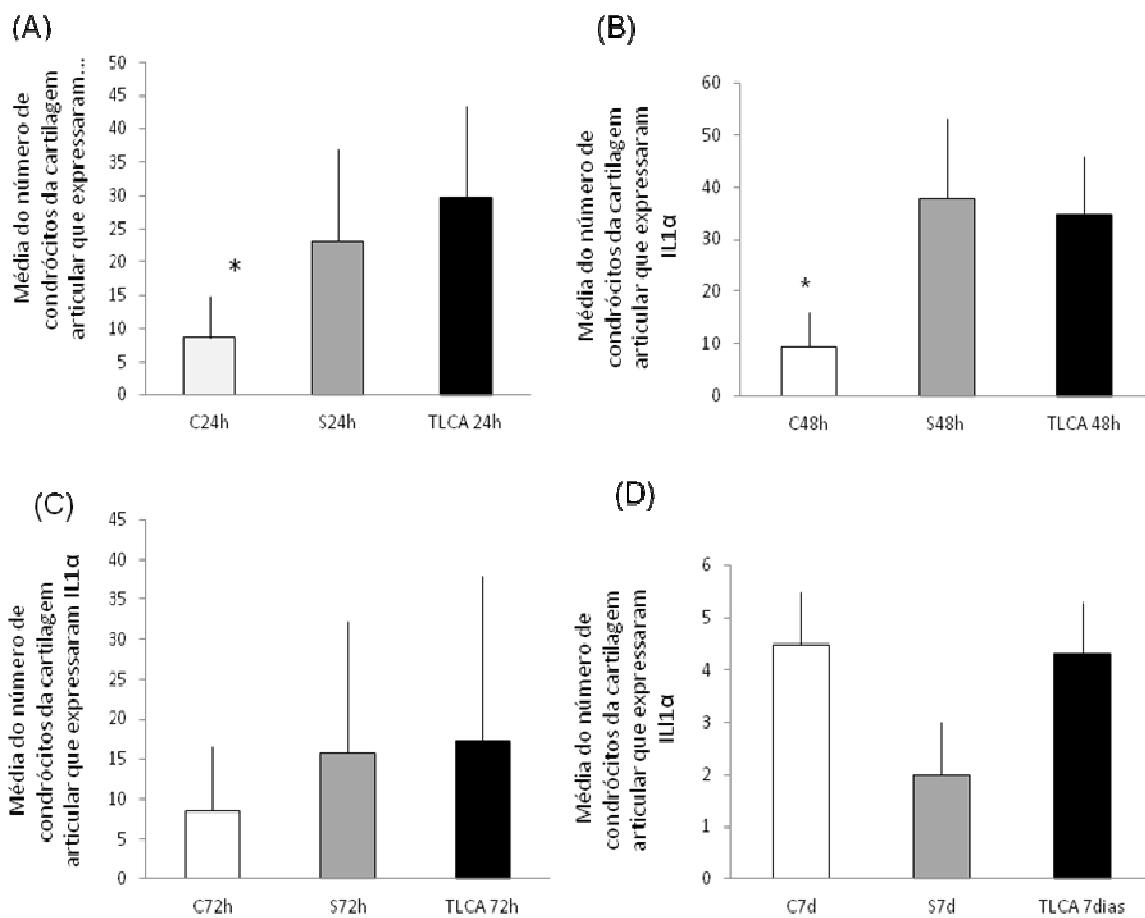
Legenda dos grupos: TLCA = Transecção do LCA; S = Sham; C = Controle

### **Expressão de IL1 $\alpha$ pelos condrócitos**

A expressão de IL1 $\alpha$  pelos condrócitos da cartilagem articular dos animais dos grupos C, S, e TLCA nos diferentes períodos analisados pode ser vista na prancha 3 (ANEXO 4). Houve um aumento no número de condrócitos que expressaram IL1 $\alpha$  nos grupos TLCA e S quando comparados ao grupo C nos períodos de 24h e 48h após a transecção do ligamento (figura 4A e 4B). Não houve diferença estatística entre nenhum grupo após 72h e 7 dias da transecção do LCA (Figuras 4C e 4D). Pode-se observar que o grupo TLCA 7dias teve uma diminuição significativa do número de condrócitos que expressaram IL1 $\alpha$  com relação aos outros períodos analisados ( $p < 0,05$ ), chegando próximo ao nível do grupo C, seguido pelo grupo TLCA 72h que também teve uma diminuição significativa no número de condrócitos que expressaram esta citocina, com relação aos grupos TLCA24h e TLCA 48h ( $p < 0,05$ ). O grupo S teve o mesmo comportamento com relação à quantidade de condrócitos que expressaram IL1 $\alpha$  quando comparado ao grupo TLCA, porém em menor proporção (figura 5).

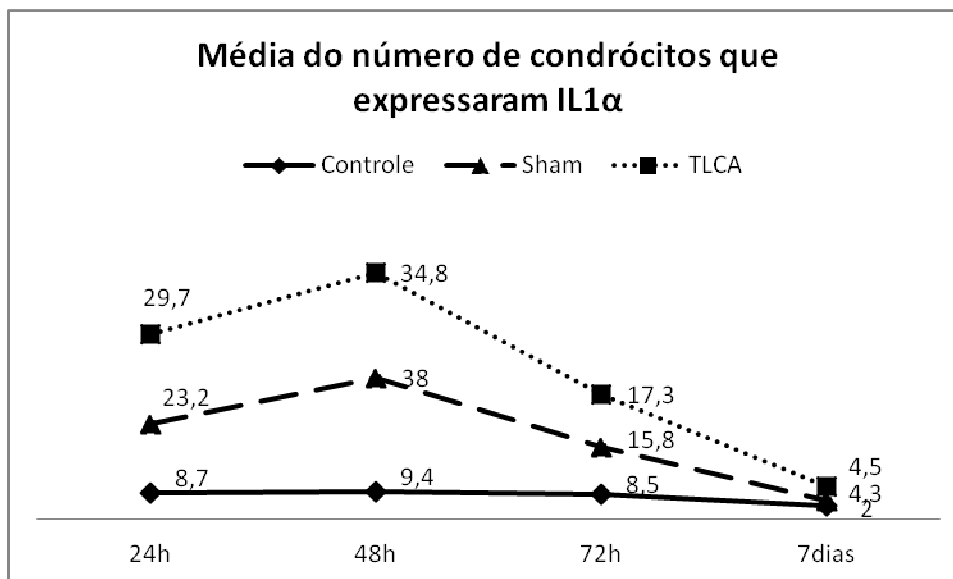


### Expressão de IL1 $\alpha$ pelos condrócitos da cartilagem articular



**Figura 4.** Média do número de condrócitos da cartilagem articular que expressaram IL1 $\alpha$ . (A) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 24h após a transecção do LCA. Os grupos S e TLCA tiveram maior número de condrócitos que expressaram IL1 $\alpha$  comparado ao grupo C ( $p= 0,00$ ). (B) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 48h após a transecção do LCA. Os grupos S e TLCA tiveram maior número de condrócitos que expressaram IL1 $\alpha$  comparados ao grupo C ( $p= 0,04$ ). (C) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 72h após a transecção do LCA. Não houve diferença estatística entre nenhum grupo. (D) Comparação entre os grupos C, S e TLCA no período de 7 dias após a transecção do LCA. Não houve diferença estatística entre nenhum grupo.

Legenda dos grupos: TLCA = Transecção do LCA; S = Sham; C = Controle



**Figura 5.** Média do número de condrócitos que expressaram IL1 $\alpha$  nos grupos C, S e TLCA, no decorrer de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do LCA.

Legenda dos grupos: TLCA = Transecção do LCA; S = Sham; C = Controle

### Correlação entre a expressão de TNF $\alpha$ e IL1 $\alpha$ na cartilagem articular

Não houve correlação entre a presença de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  na cartilagem articular entre nenhum grupo analisado, considerando ( $r \geq 0,8$  e  $p \leq 0,05$ ), como pode ser visto na tabela 1.

**Tabela 1.** Correlação entre a expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  na cartilagem articular

	24h	48h	72h	7 dias
<b>Controle</b>	p = 0,13 r = 0,22	p = 0,38 r = 0,12	p = 0,28 r = 0,15	p = 0,19 r = 0,20
<b>Sham</b>	p = 0,68 r = 0,05	p = 0,93 r = 0,01	p = 0,92 r = 0,01	p = 0,47 r = - 0,10
<b>TLCA</b>	p = 0,62 r = 0,07	p = 0,55 r = - 0,09	p = 0,11 r = - 0,237	p = 0,15 r = - 0,19

Nível de significância:  $r \geq 0,8$  e  $p \leq 0,05$

### **Expressão de TNF $\alpha$ e IL1 $\alpha$ circulantes no sangue**

Não foram detectados níveis de TNF $\alpha$  ou IL1 $\alpha$  circulantes no sangue em nenhum grupo analisado, sendo a densidade óptica expressa pela IL1 $\alpha$  inferior à sensibilidade do teste, que foi de 0,01, assim com a densidade óptica expressa pelo TNF $\alpha$  foi inferiores à sensibilidade do teste, que foi de 0,41.

### **Discussão**

O achado mais importante do nosso estudo foi que apesar das citocinas inflamatórias consideradas como chave para a patogênese da OA, TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$ , não serem expressas no soro sanguíneo dos animais nos diferentes períodos analisados, houve uma grande expressão destas citocinas na cartilagem articular no período de até 7 dias, principalmente em 24h após a transecção do LCA. Estes dados mostram o quanto é precoce é a reação do condrócitos da cartilagem articular frente a um estímulo lesivo, no caso, a transecção do LCA.

O fato de não haver expressão de citocinas TNF $\alpha$  e a IL1 $\alpha$  no soro sanguíneo dos animais pode reforçar a idéia da OA ter caráter inflamatório sistêmico numa fase mais tardia da doença, gerada por alterações teciduais locais, com expressão de citocinas inflamatórias liberadas pelos condócitos, como visto neste estudo, ou pela sinóvia (GOLDRING; OTERO, 2011). Pagura et al (2005) avaliaram o estágio avançado de OA e não encontraram citocinas catabólicas (TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , e IL1 $\beta$ ) no soro sanguíneo e líquido sinovial de pacientes. No entanto, fatores de crescimento foram encontrados no líquido sinovial, indicando que o ambiente local possui uma tentativa regenerativa em grau avançados da OA.

O presente estudo é o primeiro a avaliar as citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  locais e sistêmicos num período precoce de 24h, 48h, 72h e 7 dias após a transecção do LCA, e esta investigação é de fundamental importância para a prevenção

da cascata sinalizadora que leva à destruição da cartilagem articular e conseqüente OA, já que esta é uma doença degenerativa e progressiva, de difícil tratamento. O resultado encontrado que aponta haver expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  na cartilagem articular já em 24h após a transecção do LCA, pode ser útil para a aplicação de terapias anti-TNF e anti-IL1, com o intuito de prevenir ou desacelerar a progressão da doença. Cuellar et al (2010) investigaram o complexo inflamatório presente em 6 semanas após a lesão do LCA, e encontraram a presença de IL6, Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), MCP-1 e MIP-1 $\beta$ . Marks e Donaldson (2005) avaliaram lesão do LCA após uma média de 3 anos (6 meses – 12 anos após a lesão) do trauma e encontraram presença das citocinas inflamatórias TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  no líquido sinovial dos pacientes, e associaram as maiores concentrações destas citocinas com a severidade da lesão condral. Irie, Uchiyama e Iwaso (2003) avaliaram a presença de várias citocinas inflamatórias, dentre elas TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , no líquido sinovial de paciente em um período entre 24h e 21 dias após a lesão do LCA, e encontraram o maior nível de expressão das citocinas em 24h após lesão, sendo que em 7 dias, quase todas as citocinas retornaram aos níveis encontrados no grupo com OA crônica. Como visto, os estudos têm a preocupação de investigar o comportamento de citocinas inflamatórias no *onset* da OA, mas apenas o estudo de Irie, Uchiyama e Iwaso (2003) avaliou o período inferior a 7 dias após a lesão ligamentar, e este corrobora com os resultados encontrados na presente investigação, onde 24h após a lesão ligamentar já estão presentes citocinas inflamatórias dentro da articulação.

Goldring e Goldring (2004) afirmam que as citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$ , sozinhas ou associadas, desregulam a função do condrócito levando à progressiva degeneração da cartilagem articular, estimulando os condrócitos a produzir muitas outras citocinas pró-inflamatórias. Além disso, Hedbom e Häuselmann (2002) afirmam

que o TNF $\alpha$  está envolvido no *onset* da degeneração da cartilagem, enquanto a IL1 guia essa destruição, e a presença direta de IL1 ocorre na completa ausência de TNF $\alpha$ . Goldring e Goldring (2004) afirmam também, que a IL1 é 100 a 1000 vezes mais potente que o TNF $\alpha$ . Desta forma conseguimos explicar o comportamento não sincrônico de ambas as citocinas na cartilagem articular no *onset* da OA no presente estudo. Em 24h após a transecção do LCA foi encontrada grande expressão de ambas as citocinas no tecido. Após 48h, como a IL1 $\alpha$  tem ação mais agressiva na destruição do tecido, e ainda permanece elevada, o TNF $\alpha$  torna-se pouco expresso. Nos períodos de 72h e 7 dias, o comportamento entre as duas citocinas se altera novamente, tendo a IL1 $\alpha$  uma queda na expressão, e o TNF $\alpha$  um novo aumento em sua expressão, e provavelmente estimula assim a cascata degenerativa da cartilagem articular, que envolve múltiplos outros fatores. Provavelmente também por este motivo não houve correlação entre as duas citocinas no presente estudo.

Curiosamente observou-se o mesmo comportamento de expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  no grupo S, ou seja, quando aumenta a expressão no grupo TLCA, também aumenta no grupo S, e vice versa. Isto mostra que apenas a intervenção cirúrgica pode interferir na expressão destas citocinas inflamatórias, por ser um procedimento invasivo.

Os estudos encontrados na literatura usando a lesão do LCA como indutor de OA utilizam o joelho contralateral, o grupo Sham, ou a pata contralateral operada, porém sem a transecção do ligamento, como grupo controle ou um grupo de OA crônico para comparação dos resultados (IRIE, UCHIYAMA; IWASO, 2002; MARKS; DONALDSON, 2005). Considerando os achados deste estudo onde identificamos que o grupo sham sofre as mesmas mudanças, vale salientar a importância do grupo C para a comparação com o S e o TLCA.

Uma limitação do nosso estudo foi não avaliar outros marcadores inflamatórios, como a IL1 $\beta$ , a IL6, fatores anabólicos como a IGF1, o TGF- $\beta$ , também relacionado

s com o *onset* da OA, para uma maior avaliação do comportamento inflamatório e de reparação da cartilagem articular e no sangue neste período após a transecção do LCA. Estudos futuros com avaliação de outros marcadores inflamatórios devem ser feitos para complementar os achados sobre as citocinas envolvidas no *onset* da OA nos períodos de 24h, 48h, 72h e 7 dias após transecção do LCA. Da mesma forma, estudos avaliando a resposta da cartilagem articular após 2 semanas, poderiam clarificar os resultados encontrados neste estudo com relação ao grupo S, a fim de identificar as mudanças na expressão de TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  que foram observadas nesta investigação, assim como o comportamento destas citocinas em um período mais tardio com relação à lesão.

De acordo com os achados desta investigação é importante se pensar na modulação dos mecanismos moleculares responsáveis pela quebra da cartilagem articular num período tão precoce quanto 24h após uma lesão ligamentar, de forma a complementar procedimentos reconstrutivos no tratamento de lesões articulares agudas e prevenir o desenvolvimento da OA relacionada à lesão.

## **Conclusão**

Os resultados do presente estudo mostram que em 24h, 48h, 72h e 7 dias após a transecção do LCA já há expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL1 $\alpha$  na cartilagem articular, o que pode nortear o tratamento da OA com terapias anti-TNF $\alpha$  e anti-IL1 $\alpha$  em ocasiões de lesões traumáticas de forma precoce, prevenindo ou retardando a progressão da doença.

## **Agradecimentos**

Agradecemos à Adriana Frias Renner, pela colaboração nos procedimentos cirúrgicos, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Referências Bibliográficas

POOLE, A. R. Cartilage in health and disease. In Koopman W. Arthritis and allied conditions: a text book of rheumatology. 14th edit., Philadelphia. Lippincott Williams e Wilkins. 226-284, 2001.

GOLDRING, M. B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. **Arthritis Rheum.** 43, 1916-1926, 2000.

ISHIGURO, N.; KOJIMA, T.; POOLE, R. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis. **J Med Sci.** 65, 73-84, 2002.

GHOSH, P.; SMITH, M. Osteoarthritis, genetic and molecular mechanisms. **Biogerontology.** 3, 85-88, 2002.

CALICH, A.L.G.; DOMICIANO, D.S.; FULLER, R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? **Clin Rheumatol.** 29, 451-455, 2010.

AIGNER, T.; SOEDER, S.; HAAG, JOCHEN. IL-1 $\beta$  and BMPs – Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. **Eur Cells Materials.** 12, 49-56, 2006.

VAN DEN BERG, W.B. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. **Arthritis Res.** 3,18-26, 2001.

MARKS, P.H.; DONALDSON, M.L.C. Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery.** 21(11), 1342-1347, 2005.

IRIE, K.; UCHIYAMA, E.; IWASO, I. Intraarticular inflammatory cytokines in acute cruciate ligament injured knee. **Knee.** 10, 93-96, 2002.

CUELLAR, V.G.; CUELLAR, J.M.; GOLISH, S.R.; YEOMANS, D.C.; SCUDERI, G.J. Cytokine profile in acute anterior cruciate ligament injury. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery.** 26 (10), 1296-1301, 2010.

PAGURA, S. M. C.; THOMAS, S. G.; WOODHOUSE, L. J.; EZZAT, S.; MARKS, P. Circulating and synovial levels of IGF-I, cytokines, physical function and anthropometry differ in women awaiting total knee arthroplasty when compared to men. **J Orthop Res.** 23, 397-405, 2005.

STREICH, N.A.; ZIMMERMANN, D.; SHMTT, H.; BODE, G. Biochemical markers in the diagnosis of chondral defects following anterior cruciate ligament insufficiency. *International Orthopaedics (SICOT)*. 2011.

APPLETON, C.T.G.; McERLAIN, D.D.; PITELKA, V.; SCHWARTZ, N.; BERNIER, S.M.; HENRY, J.L. et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 9(1),3-15, 2007.

HATTORI, S.; SAKANE, M.; MUTSUZAKI, H.; TANAKA, J.; OCHIAI, N.; NAKAJIMA, H. Chondrocyte apoptosis and decrease of glycosaminoglycan in cranial cruciate ligament insertion after resection in rabbits. *J Vet Med Sci*. 69(3), 253-258, 2007.

MUTSUZAKI, H.; SAKANE, M.; IKEDA, K.; ISHII, T.; HATTORI, S.; TANAKA J et al. Histological changes and apoptosis of cartilage layer in human anterior cruciate ligament tibial insertion after rupture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 15, 602-609, 2007.

QUASNICHKA, H. L.; ANDERSON-MACKENZIE, J. M.; TARLTON, J. F.; SIMS, T. J.; BILLINGHAM, M. E. J.; BAILEY, A. J. Cruciate ligament laxity and femoral intercondylar notch narrowing in early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 52(10), 3100-09, 2005.

NELSON, F.; BILLINGHURST, R. C.; PIDOUX, I.; REINER, A.; LANGWORTHY, M.; McMERMOTT, M. et al. Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of anterior cruciate ligament. *Osteoarthritis Cartilage*. 14, 114-119, 2006.

PRICE, J. S.; TILL, S. H.; BICERSTAFF, D. R.; BAYLISS, M. T.; HOLLANDER, A. P. Degradation of cartilage type II collagen precedes the onset of osteoarthritis following anterior cruciate ligament rupture. *Arthritis Rheum*. 42(11), 2390-98, 1999.

TODD, J.; LAWRENCE, R.; BIRMINGHAM, J.; TOTH, A.P. Prevention of posttraumatic through interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha inhibition. *Clin Orthop Relat Res*. 469(12), 3522-3526, 2011.



NATIONAL RESEARCH COUNCIL Guide for the care and use of laboratory animals. Nationalarthritis Academy Press, Washington DC 1996.

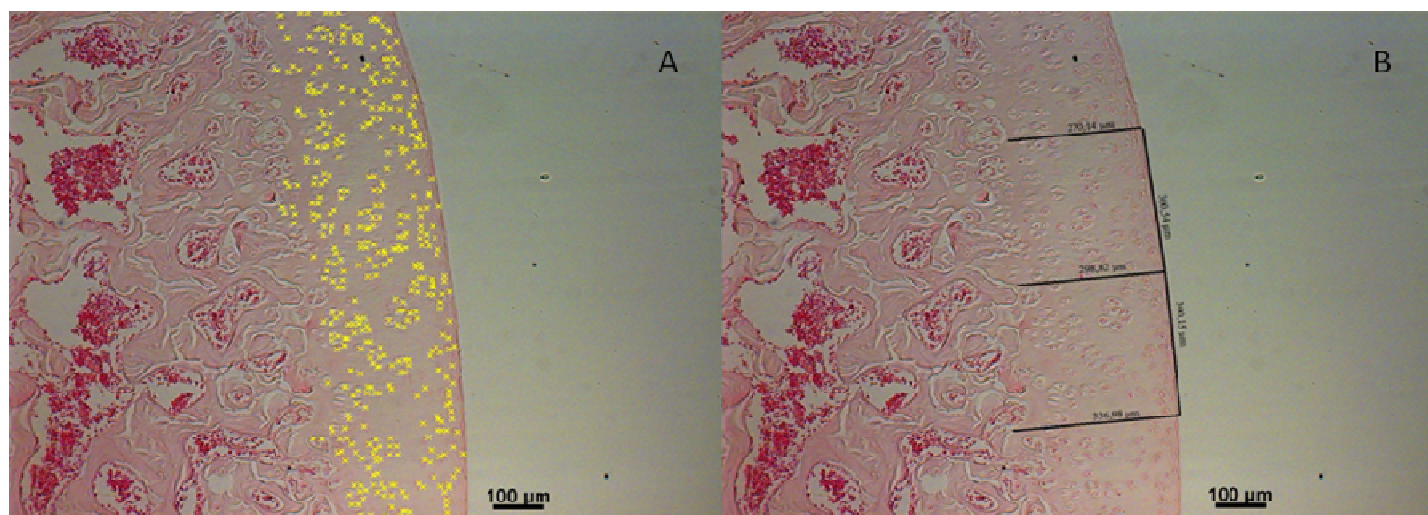
GOLDRING, M.B.; **OTERO**, M. Inflammation in osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol.** 23(5), 471-8, **2011**.

GOLDRING, S. R.; GOLDRING, M. B. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. **Clin Orthop Rel Res.** 427S, S27-S36, 2004.

HEDBOM, E.; HÄUSELMANN, H. J. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role in inflammation. **CMLS Cell. Mol. Life Sci.** 59, 45-53, 2002.

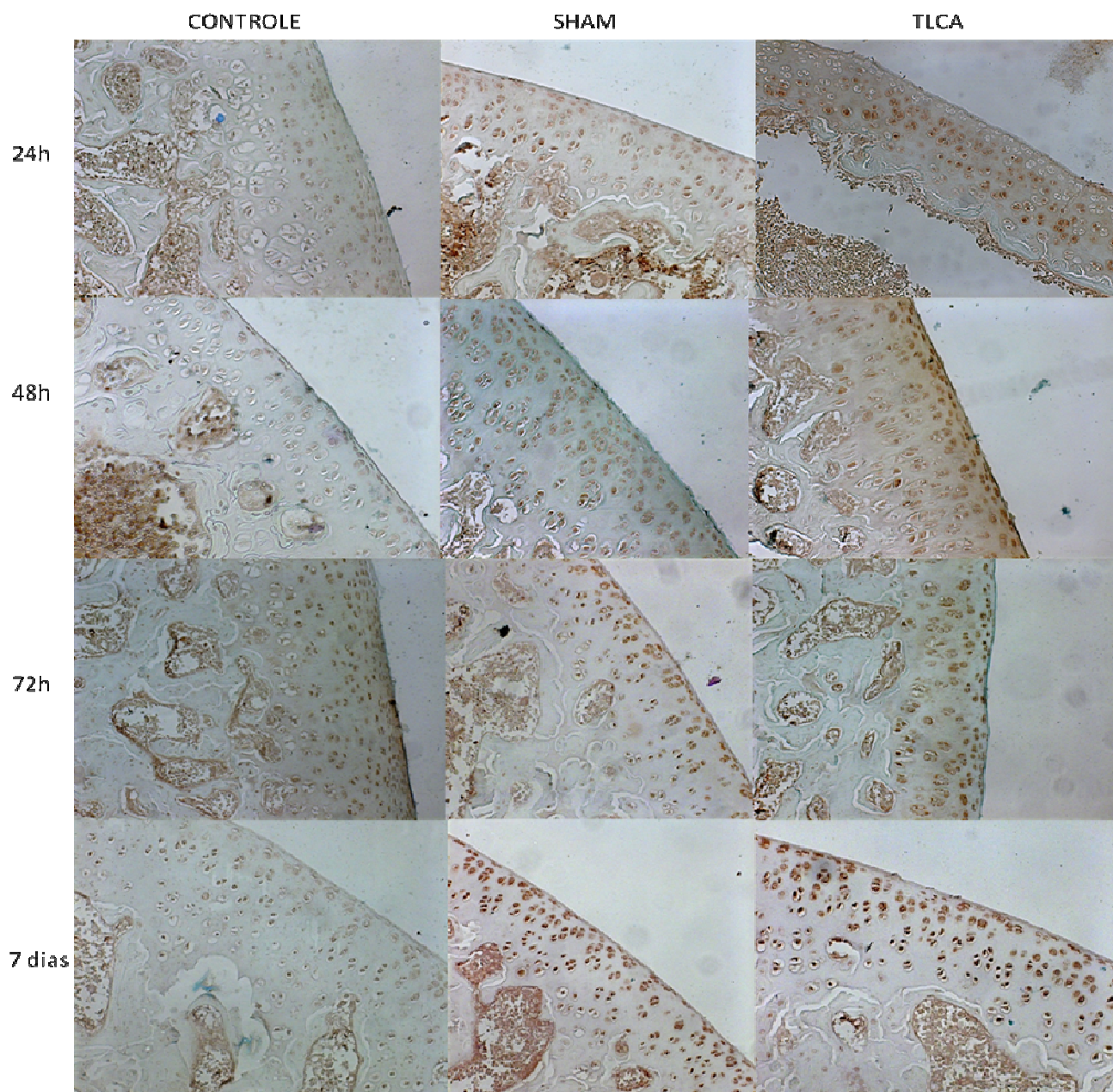
**ANEXOS**

## ANEXO I –



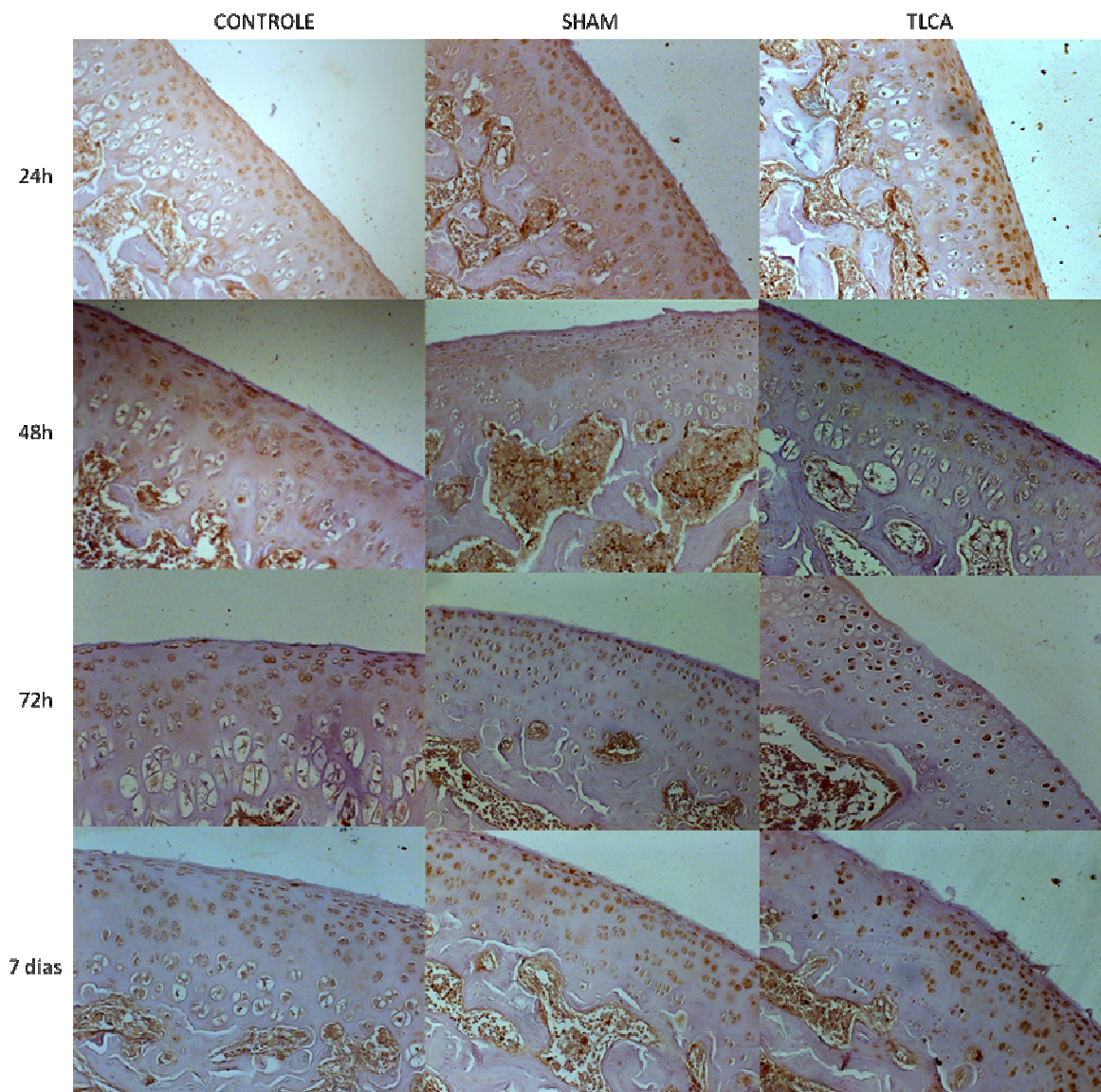
**Figura 1.** Fotomicrografia da cartilagem articular dos cndilos femorais corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) (x 200). (A) Análise morfométrica da celularidade: contagem manual por meio do software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss) (B) Análise morfométrica da espessura da cartilagem articular por meio do software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss).

## ANEXO II -



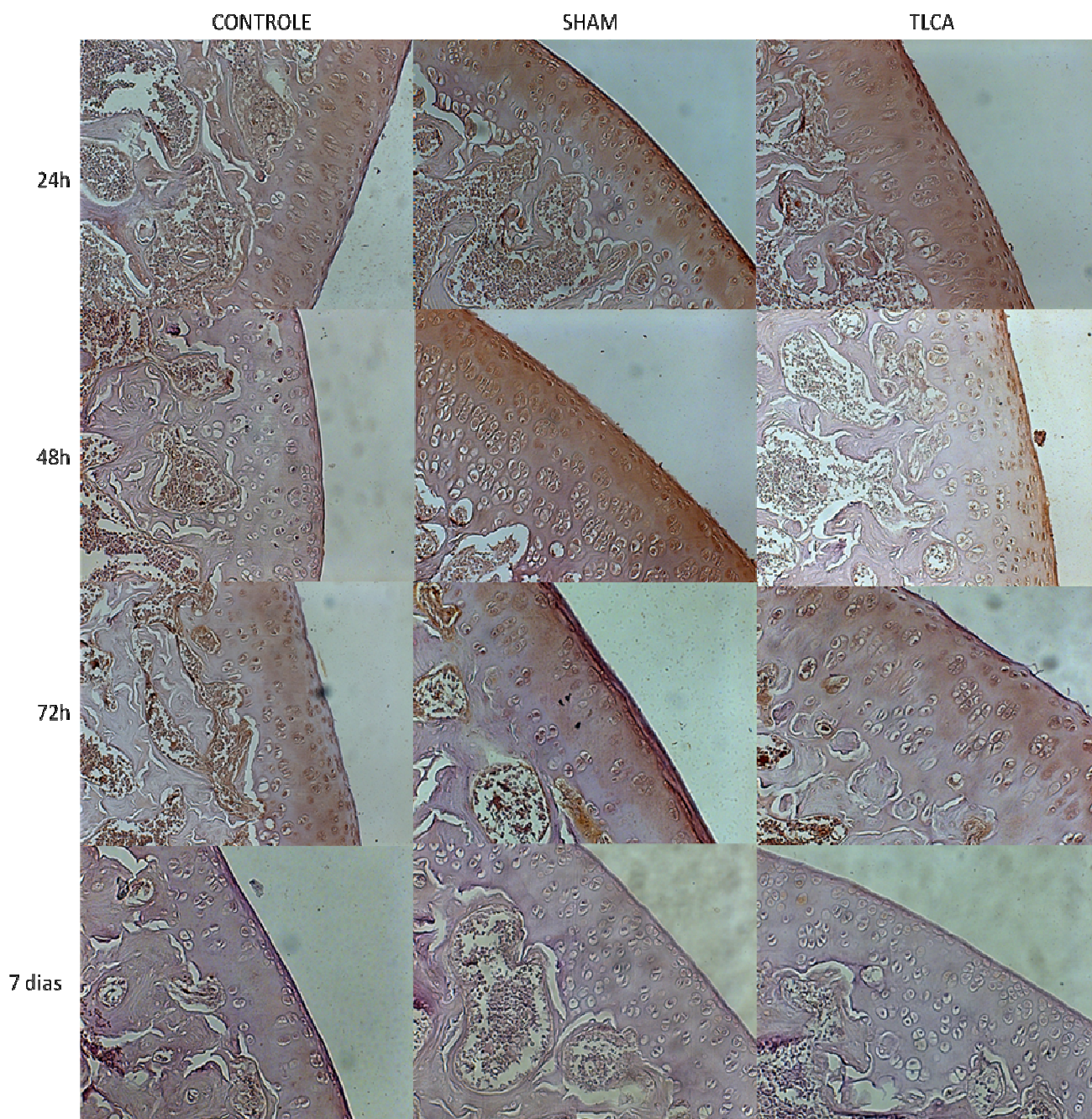
**Prancha I.** Fotomicrografia da cartilagem articular do joelho dos ratos, imunomarcada para caspase 3, dos grupos controle, sham e TLCA, nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do ligamento cruzado anterior.

## ANEXO III –



**Prancha II.** Fotomicrografia da cartilagem articular do joelho dos ratos, imunomarcada para TNF $\alpha$ , dos grupos controle, sham e TLCA, nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do ligamento cruzado anterior. Os citoplasmas e periferias dos condrócitos corados em marrom indicam TNF $\alpha$  positivo.

## ANEXO IV -



**Prancha III.** Fotomicrografia da cartilagem articular do joelho dos ratos, imunomarcada para IL1 $\alpha$ , dos grupos controle, sham e TLCA, nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 7 dias após a transecção do ligamento cruzado anterior. Os citoplasmas e periferias dos condrócitos corados em marrom indicam IL1 $\alpha$  positivo.

**Relevant caspase 3 expression in the acute fase of experimental Osteoarthritis**

**Running Title: Caspase 3 expression in acute OA**

**†Carolina Náglio Kalil Dias, M.D., †Fernando Augusto Vasilceac, †, ††João Luiz Quaglioti Durigan, Ph.D., ††† Mario Ferreti, Ph.D., †Stela Márcia Mattiello Ph.D.**

**† Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil**

**†† Department of Physiotherapy, University of Brasília, Brasília, Brazil**

**††† Department of Orthopaedics and Traumatology, Federal University of São Paulo, Brazil**

**Address to correspondence and reprint request to:**

**Dr Stela Márcia Mattiello, Ph.D.,**

**Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos**

**Via Washington Luis, Km 235**

**Zip code: 13565-905**

**São Carlos, São Paulo, Brazil**

**Tel: 55-16-3351-8039**

**Fax: 55-16-3361-2081**

**E-mail: [stela@ufscar.br](mailto:stela@ufscar.br)**

## Abstract

**Objective:** To evaluate the chondrocytes apoptosis by caspase 3 expression and its relationship with the knee articular cartilage thickness and cellularity in the acute phase of experimental osteoarthritis (OA) after anterior cruciate ligament (ACL) transection.

**Material and Methods:** Sixty four male *Wistars* rats were divided into 3 groups: ACL transection group (ACLT); control group (C); and sham group (S). Each group was subdivided into 4 subgroups: 24h, 48h, 72h and 1 week, according to the period following the procedures performed. The medial condyles of the left knees were stained with HE for cartilage thickness and cellularity analysis, by morphometry. Caspase 3 expression was evaluated through immunohistochemical method. Statistical analysis was performed by using the Kolmogorov-Smirnov test to assess the normality of the data, and then ANOVA with *post hoc* Duncan ( $P < 0.05$ ). **Results:** There was no statistical difference for articular cartilage thickness and cellularity amongst groups. Regarding the caspase 3 expression, the C had smaller expression than the other groups. The ACLT 24h and ACLT 48h groups had increased expression of caspase-3 than their respective C and S. The ACLT 72h was not different from S 72h, and presented a lower caspase 3 expression compared to the other groups. Both ACLT and S 7days groups had higher expression than any other group. **Conclusion:**

The study indicates that chondrocyte apoptosis occurred in the initial phase of experimental OA, however the articular cartilage thickness and cellularity changes can be modified at a later stage.

**Key-words:** Articular cartilage; Osteoarthritis; Anterior Cruciate Ligament; Chondrocyte; Apoptosis



## **Introduction**

Chondrocytes are the only cells present in articular cartilage, and under physiological conditions, are responsible for the balance between synthesis and degradation that maintains the structure and functional integrity of its extracellular matrix (ECM) [1]. The loss of chondrocytes homeostasis in favor of catabolic activities, leading to slow and progressive destruction of articular cartilage, which features a progressive and degenerative joint disease, is named osteoarthritis (OA). Moreover, chondrocyte death is seen as a crucial event in the pathogenesis of OA [2, 3].

Detection of cell death has been done by TUNEL on paraffin tissues, which is based on cell defragmentation. However, the results obtained by this method should be interpreted with caution, since positive signals for TUNEL staining can also point to necrotic cells and cells in the physiological process of differentiation. To minimize errors in interpreting these results, it has been used immunolocalization of different caspase types [5]. The caspases are a group of cysteines - intracellular enzymes - which, when activated intrinsically or extrinsically, promoting a cascade of events leading to programmed cell death. This cascade plays a vital role in the induction, transduction, amplification and execution of apoptotic signals within the cell [6]. Different types of caspases are recognize, divided into 3 groups: initiators of apoptosis (caspases 2, 8, 9 and 10), executors of apoptosis (caspases 3, 6 and 7), and cytokine processors (caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13, and 14). Caspase 3, in its active form, is a key mediator of apoptosis in their execution phase [7]. Thus, the caspase 3 expression by chondrocytes indicates an imminent apoptotic process.

The presence of apoptosis in chondrocytes is found together with histological changes, resulting from damage to the anterior cruciate ligament (ACL) [8, 9, 10].

Studies [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17] have been done to investigate the possible molecular mechanisms of the initial tissue destruction in OA, using the animal model of ACL transection. This experimental model promotes biomechanical changes in the knee that lead to the articular cartilage degenerative process. Therefore, the transection of the ACL is a model of the acute phase of OA [18, 19]. In humans, is very difficult to identify the beginning stage of OA disease, once these patients commonly receive treatment at a late stage of disease, where morphological and biochemical changes have already occurred, leading to harmful of joint function and pain [15]. Therefore, the time-dependent relationship between apoptosis of chondrocytes and histologic changes of articular cartilage in the early stages of OA are still unclear, and studies are needed for early intervention in disease progression.

It is well described that ECM components are affected in early stage of OA [21, 22]. Studies [6, 7, 9, 10, 13, 15, 16, 23, 24, 25] have shown that cartilaginous tissue can suffer adaptation related to cells and tissue thickness, however it is unclear the time-dependent relationship for these changes, which difficult the treatment and prevention of degenerative cartilage changes. After the trigger of the molecular and cellular changes, there is an exponential development of OA. Thus, it is important to identify the early changes of articular cartilage after a traumatic event, characterized as a cause of OA in younger individuals.

The studies [9, 10, 11, 14, 17, 22] regarding the *onset* of OA have been conducted at 1 week or more after injury that leads to the OA, and found that 1 week after trauma there are already changes in the ECM and apoptosis of chondrocytes. Thus, it is important to investigate the possible cartilage molecular and cellular events until 1

week after ACL transection as an experimental model of OA, especially regarding chondrocyte apoptosis.

### **Objectives**

To evaluate the presence of apoptosis by caspase 3 expression and its relationship with the cartilage thickness and cellularity in the knee of rats in the acute phase after ACL transection, as an experimental model of OA.

### **Material and Methods**

#### **Animals**

The study was conducted in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals [26], as well as with the Ethics Committee of the Federal University of Sao Carlos.

Sixty four male adult *Wistar* rats, weighing  $293 \pm 21.05\text{g}$ , were maintained under controlled environmental conditions and free access to standard food and water. The animals were randomly distributed into three groups: C- Control (n=5), S- Sham (n=5), and ACLT- ACL Transection (n=6). Each group was divided into four subgroups: 24 hours, 48 hours, 72 hours and 1 week. The animals of the subgroups C did not suffer any intervention; the animals of the subgroups ACLT underwent surgical transection of the ligament under anesthesia; and the animals of the subgroup S surgical intervention, but without the transection of the ligament. After surgical procedures, the

animals were free to move into the cage, according to the period specified for each subgroup.

### **ACL transection surgery**

All experimental procedures were performed with animal anesthetized (intraperitoneal injection of xylazine solution of 12 mg / kg / body weight and ketamine 95 mg / kg / body weight). The left knees were operated. An approximately 1 cm incision on the medial knee, next to the patellar ligament was performed. Later the knee was flexed and the patellar ligament was displaced laterally to show up the location of the ACL. The ACL was transected with a scissors ophthalmic. Throughout the procedure, the joint was irrigated with saline solution. After that, the tissues were sutured to close the region. None anti-inflammatory or antibiotic drug was administered to the animals.

### **Sample preparation**

The euthanasia of the animals was performed by cervical dislocation. The left knees were removed, skinned and fixed in 10% formalin. The femoral condyles were decalcified for 10 days using 7.5% nitric acid and the same concentration of glycerin. The medial condyle was separated from the lateral condyle, and this material was then dehydrated and processed in paraffin. Sagittal sections of 5 $\mu$ m thickness and 50 $\mu$ m between each section were applied to the full extension of the tissue through Microtome (Leica RM2145).

## **Histological and Analysis**

The sections were stained with hematoxylin and eosin (H & E) for articular cartilage thickness and cellularity analysis by morphometry. For this, 3 photos were taken under 100x of magnification, using the Image Analysis software (Axiovision 4.7, Carl Zeiss, Germany), along the entire length of the articular cartilage of the femoral condyle. In the whole field of the photo the cells were counted manually, and were made the average of the number of cells in the 3 photos. To check the thickness, was made a central measure, from the subchondral bone to the surface of cartilage, and after that, two more measures were done, 300µm to the left and 300µm to the right, in the same way. It was made the average of 3 measurements of each photo, and after we obtained the mean thickness of each photo of articular cartilage.

## **Imunohistochemistry**

### **Analyses of chondrocytes apoptosis**

The analysis of chondrocytes apoptosis in articular cartilage was performed by immunohistochemical expression of caspase-3, using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to manufacturer's instructions. Tissue sections were deparaffinized and rehydrated. The sections were pretreated with chondroitinase ABC (0.25 U/ml in PBS, pH 8.0; Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min at room temperature. Permeability was enhanced by using 0.2% Triton X-100 in PBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating sections with freshly prepared 3% hydrogen peroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Non-specific staining was blocked by incubation of the sections

with horse serum supplied by Vectastain Universal ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA), for 30 min. Sections were incubated overnight at 4°C with Affinity-Purified Rabbit Anti-human/mouse Caspase 3 active (R&D Systems, Abington, UK) primary antibody diluted at 1:500, in a humidified chamber. A biotinlabelled goat anti-rabbit IgG (Vectastain Universal ABC kit) was used as a secondary antibody for 45 min at room temperature. A biotiny avidin detection system (Vectastain Universal ABC kit) was used according to the manufacturer's recommendations, for 30 min at room temperature. The peroxidase was detected using liquid diaminobenzidine substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA), for 10 min. After counterstaining with methyl green, slides were dehydrated and mounted with Permount (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).

To analyze the results, were made 5 pictures under 200x magnification, using the software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss) across the entire length to the tissue. The nuclei stained dark brown indicate caspase 3 positive (Figure 1b). The total number of chondrocytes and the number of chondrocytes staining positive for caspase 3 were counted, by two blinded observers over the entire field of 5 photos, and the percentage of dual stained cells in each image was calculated.

### **Statistical Analysis**

The Spearman test ( $R \geq 0.8$  and  $p \leq 0.05$ ) was used to check the correlation between the observers for the caspase 3 expression analysis. The Shapiro-Wilk Test ( $p \geq 0.05$ ) was used to evaluate the normality of the variables, and the Levene Test ( $p \geq 0.05$ ) to evaluate the homogeneity of the data. The ANOVA with Duncan's *post hoc* ( $p \leq$

0.05) was used to compare the different groups regarding the morphometric cell count, the articular cartilage thickness, and caspase 3 expression.

## **Results**

After surgery, the animals recovered rapidly, and there were no visible problems with healing. The analysis of rat's knees at the withdrawal of joints showed that there was no type of macroscopic lesion visible on the articular surface in any group studied.

### **Morphometric analysis of articular cartilage thickness and cellularity**

As shown in Table 1, there was no statistically significant difference amongst groups regarding to the articular cartilage thickness ( $p > 0,05$ ). Similar results were found to the cellularity of articular cartilage ( $p > 0,05$ ) (Table 2).

### **Analysis of caspase 3 expression**

It can be noted that after 24 hours of ACL transection, the C, S and ACLT were different, with the S group ( $17,35 \pm 13,47$  %) with higher percentage of caspase 3 expression than the C group ( $5,76 \pm 4,42$  %), and the ACLT group ( $46,42 \pm 20,59$  %) with a higher percentage of caspase 3 expression than the S and C groups. 48h after ACL transection, the ACLT group ( $45,33 \pm 20,22$  %) had a greater percentage of caspase 3 expression than the S ( $3,36 \pm 3,7$  %) and C ( $4,18 \pm 4,1$  %) groups (fig. 2B). In the 72h period after the ACL transection, it was observed that the S ( $22,31 \pm 16,5$  %) and ACLT ( $29,31 \pm 25,22$  %) groups had higher percentage of caspase 3 expression

than the C group ( $8,44 \pm 4,59$  %) (fig. 2C). At 7 days after ACL transection, the S ( $63,36 \pm 32,5$  %) and ACLT ( $91,19 \pm 39,31$  %) groups had higher percentage of caspase 3 expression than the C group ( $3,97 \pm 3,03$  %) (fig. 2D).

As can be seen in Figure 3, over the course of 24h, 48h, 72h and 7 days only the C group maintained the same percentage of caspase 3 expression average, lower than the S group at 24h ( $p = 0,01$ ), 72h ( $p < 0,01$ ) e 7 dias ( $p < 0,01$ ) and ACLT group at all periods analyzed ( $p < 0,01$ ). The S group had a percentage of caspase 3 expression at 24h after the ACL transection, with a reduction nearly to the C group level of expression ( $p = 1,00$ ) at 48h, and at 72h after ACL transection the caspase 3 expression increase again ( $p < 0,01$ ), with a higher amount after 7 days of ACL transaction ( $p < 0,01$ ). The ACLT group had the highest percentage of caspase 3 expression compared to the S and C groups, with a decrease at 48h to climb back within 72h, with an expression peak at 7 days after ligament transection.

## Discussion

This is the first study that analyze the period of 24h, 48h, 72h and 7 days after transection of the ACL. The most important finding of this study was the *onset* of chondrocytes apoptosis in articular cartilage in the first few hours after ACL transection, suggesting an initial joint inflammation which progresses to the *onset* of OA. Most authors demonstrated that chondrocytes apoptosis is a crucial event in the OA pathogenesis [2, 3, 7, 10]. However, some studies did not associate the chondrocytes apoptosis to be a cause or a result of the ECM breakdown in articular cartilage, since these studies evaluated the articular cartilage in the late stages of OA [10]. Thus,



chondrocytes apoptosis must be analyzed very early in the acute period of OA. In this way, it emphasizes the importance of this study, which showed the presence of apoptosis in the articular cartilage in the first 24h, 48h, 72h and 7 days after the ACL injury, showing that chondrocyte death occurs acutely in the period analyzed.

It is important to emphasize the greater expression of caspase 3 by chondrocytes of articular cartilage observed after 24 hours of ACL transection, suggesting that chondrocyte death occurs acutely to the injury generated. At 48h and 72h after the ligament transection there was a significant reduction in the caspase 3 expression, but an exacerbated increase was showed at 7 days. It is possible to speculate that due to mechanical instability created by ACL transection, there is some changes in animals gait patterns, which can lead to overload in the knee joint, thus perpetuating the presence of chondrocytes death in the tissue. This fact, probably, have contribute to the onset and progression of the articular cartilage degeneration that occurs in OA.

It may also be noted that during 24h, 72h and 7 days after ACL transection, there was an increased of caspase 3 expression in the S group compared to the C group. It is known that in acute and subacute stages after injury, inflammatory cytokines affect the chondrocytes apoptosis and the ECM degradation [27]. It is believed that only the surgery could have caused an inflammatory process in animals that may have triggered the cell death process. Another factor that may have caused the chondrocytes apoptosis in the S group after 72h and 7 days after injury is the change in motion of the animals due to the inflammatory process, that can be generated by the surgery, but this study did not analyze the gait pattern of animals. Future studies should consider a follow up of animals to access movement restriction during the inflammation process correlating these finds with cartilage tissue adaptation.

It should be emphasized that studies in the literature using this model as an inducer of OA, used the Sham group or the operated contralateral limb without transection of the ligament as the only control [9, 16, 24]. These analyses do not allow the visualization of the surgery effects on cartilage tissue, which can be seen in this study. So, it is important to emphasize the importance of group C compared to the S and ACLT, as this is the only way to identify whether the surgery intervention not alter the tissue environment assessed. It must be considered that the experimental model used in this study may have been aggressive and have affected the cartilage indirectly.

Another important finding of this study was that chondrocytes apoptosis precede the histological changes evaluated (cellularity and thickness). Although there was apoptosis in the first 24 hours after ACL transection, there was no change in the chondrocytes number or in the cartilage thickness in any group analyzed. Some studies also suggest that chondrocytes apoptosis preceded or induced histological changes that lead to the articular cartilage degeneration in response to the injury stimuli. In line of this, Mutsuzaki and colleagues [10] observed chondrocytes apoptosis at the insertion of ACL between 19 and 206 days after the transection, and the chondrocytes number and the amount of GAG in the ECM decreased with time. Hattori and co-workers [9], observed that chondrocyte apoptosis preceded the loss of GAG at the insertion after ACL transection. Sakane et al [24] observed chondrocytes apoptosis at 1 and 2 weeks after ACL transection, and a GAG decrease after 1 to 6 weeks in the region of calcified cartilage. In the region of non-calcified cartilage, apoptosis occurred between 2-4 weeks, and the loss of GAG after 6 weeks of ACL transection. Collectedly, it was demonstrated that histological changes of articular cartilage occur from 1 week after ACL transection, which are preceded by chondrocytes apoptosis. Thus our study adds

new knowledge to understand the OA pathology, and highlights the importance of the chondrocytes apoptosis appear in a period where there were no further changes in the analyzed structures. Thus, 24 hours to 7 days after ACL injury is a key period for the control of chondrocytes apoptosis in attempt to control the progression of the disease.

A limitation of this study was not to evaluate inflammatory markers such as TNF, MMPs, and COMP (cartilage oligomeric matrix protein), since these enzymes are essential for homeostasis and remodeling of the ECM. In addition ECM components such as collagen and proteoglycans should be evaluated to identify whether these structures are compromised with the chondrocytes death after ACL transection. Further studies with assessment of inflammatory markers and other ECM components such as proteoglycans and collagen should be made to complement the findings on the chondrocytes apoptosis in the periods of 24h, 48h, 72h and 7 days after ACL transection. Similarly, studies evaluating the articular cartilage response 2 and 3 weeks after ACL transection could clarify the results found in this study with respect to the Sham group, to identify changes in apoptosis were observed in this investigation, as well as the correlation about the cellularity and percentage of apoptosis.

## **Conclusion**

The results of this study show that chondrocytes apoptosis occurs in the first 24 h after ACL transection, i.e., in the acute phase of OA. Thus, the interval between 24 hours to 7 days can be an important key period for the control of chondrocyte apoptosis and therapeutic approaches in the treatment of OA.

**Acknowledgements**

The authors acknowledge Dr. Adriana Frias Renner, Department of Physiotherapy, Federal University of Sao Carlos for her assistance in the surgeries; Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for its financial support.

**Conflict of interest statement**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Goldring SR, Goldring MB (2004) The role of cytokines in Cartilage Matrix Degeneration in Osteoarthritis. *Clin Orthop Rel Res* 427S:27-36.
2. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Martul E, de Toro FJ, Galdo F (1998) Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum* 41:284-289.
3. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M (1998) Linkage of chondrocytes apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41:1632-1638.
4. Lotz M, Hashimoto S, Kühn K (1999) Mechanisms of chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 7:389-391.
5. Hathaway TR, Kuelch MK (2002) Apoptosis and cutaneous biology. *Adv Dermatol* 18:287-311.
6. Musumeci G, Loreto C, Carnazza ML, Martinez G (2011) Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19:307-313.
7. Thomas CM Fuller CJ, Whittles CE, Sharif M (2007) Chondrocyte apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 15:27-34.
8. Sabatini M, Rolland G, Léonce S, Thomas M, Lesur C, Pérez V et al (2000) Effects of ceramide on apoptosis, proteoglycan degradation, and matrix metalloproteinase expresión in rabbit articular cartilage. *Biophys Res Commun* 267:438-444.

9. Hattori S, Sakane M, Mutsuzaki H, Tanaka J, Ochiai N, Nakajima H (2006) Chondrocyte apoptosis and decrease of glycosaminoglycan in cranial cruciate ligament insertion after resection in rabbits. *J Vet Med Sci* 69, 3: 253-258.
10. Mutsuzaki H, Sakane M, Ikeda K, Ishii T, Hattori S, Tanaka J et al (2007) Histological changes and apoptosis of cartilage layer in human anterior cruciate ligament tibial insertion after rupture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 15, 602-609.
11. Price JS, Till SH, Bicerstaff DR, Bayliss MT, Hollander AP (1999) Degradation of cartilage type II collagen precedes the onset of osteoarthritis following anterior cruciate ligament rupture. *Arthritis Rheum* 42, 11:2390-98.
12. Stoop R, Buma P, Van Der Kraan PM, Hollander AP, Billingham RC, Poole AR et al (2000) Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rats stifle joints after cranial cruciate ligament transaction. *Arthritis Rheum* 43, 9: 2121-2131.
13. Stoop R, Buma P, Van Der Kraan PM, Hollander AP, Billingham RC, Meijers THM et al (2001) Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transaction in rats. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 308-315.
14. Quasnicka HL, Anderson-Mackenzie JM, Tarlton JF, Sims TJ, Billingham MEJ, Bailey AJ (2005) Cruciate ligament laxity and femoral intercondilar notch narrowing in early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52, 10:3100-09.
15. Clark AL, Leonard TR, Barclay LD, Matyas JR, Herzog W (2006) Heterogeneity in patellofemoral cartilage adaptation to anterior cruciate ligament transaction; chondrocyte shape and deformation with compression. *Osteoarthritis Cartilage* 14:120-130.

16. Hayami T, Pickarski M, Zhuo Y, Wesolowski GA, Rodan GA, Duon LT (2006) Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transaction and meniscectomized models of osteoarthritis. *Bone* 38:234-243.
17. Appleton CTG, Mcerlain DD, Pitelka V, Schwartz N, Bernier SM, Henry JL et al (2007) Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 9, 1:3-15.
18. Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W (2005) Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther* 7:R156–65.
19. Echigo R, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki, N (2006) Suppressive effects of hyaluronan on chondrocyte apoptosis in experimentally induced acute osteoarthritis in dogs. *J Vet Med Sci* 68, 8:899-902.
20. American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines (2000) Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee. *Arthritis Rheum* 43:1905-15.
21. Aigner T, Soeder S, Haag J (2006) IL-1 $\beta$  and BMPs – Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *European Cells and Materials* 12:49-56.
22. Nelson F, Billingham RC, Pidoux I, Reiner A, Langworthy M, Mcmerrmott M et al (2006) Early post-traumatic osteoarthritis-like changes in human articular cartilage following rupture of anterior cruciate ligament. *Osteoarthritis Cartilage* 14:114-119.

23. Galois L, Etienne S, Grossin L, Watrin-Pinzano A, Courni-Henrionnet C, Loeuille D et al (2004) Dose-response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. *Osteoarthritis Cartilage* 12:779-786.
24. Sakane M, Mutsuzaki H, Hattori S, Nakajima H, Ochiai N (2009) Time dependence of changes of two cartilage layers in anterior cruciate ligament insertion after resection on chondrocyte apoptosis and decrease in glycosaminoglycan. *Sports Med Arthro Rehab Ther Thecno* 11, 27:1-6.
25. Thomas CM, Whittles CE, Fuller CJ, Sharif M (2010) Variations in chondrocytes apoptosis may explain the increased prevalence of osteoarthritis in some joints. *Rheumatol Int* 31(10):1341-8.
26. National research council guide for the care and use of laboratory animals. National Academy Press, Washington DC 1996.
27. Hirota Y, Habu M, Tominaga K, Sokedai M, Matsukawa A, Nishihara T et al (2006) Relationship between TNF-alpha and TUNEL-positive chondrocytes in antigen-induced arthritis of the habbits temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med* 35:91-98.

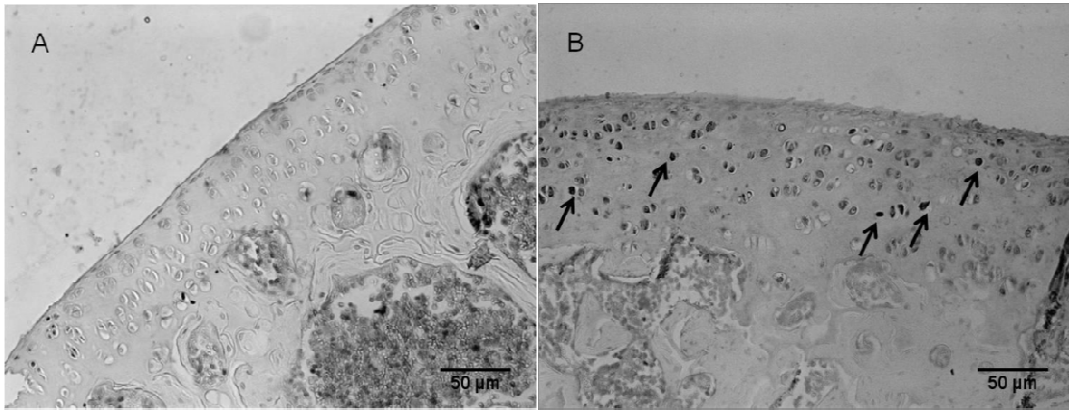


**Table 1.** Average of the articular cartilage thickness of the C group, S and ACLT in the different periods

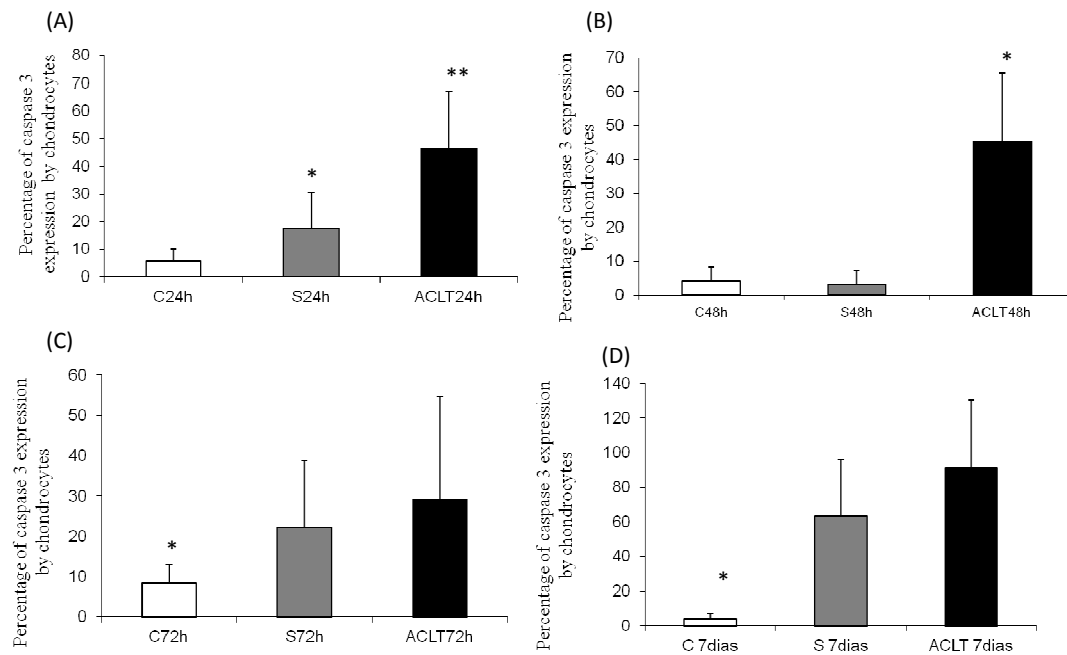
<b>Subgroup/group</b>	<b>Control</b>	<b>sham</b>	<b>TLCA</b>
<b>24h</b>	205,53±36,56	179,07±28,29	192,64±24,8
<b>48h</b>	204,13±29,32	204,36±17,07	188,51±28,31
<b>72h</b>	192,24±39,65	197,27±20,52	188,53±35,3
<b>7 days</b>	188,97±38,62	188,26±27,47	181,63±21,14

**Table 2.** Average of the articular cartilage cellularity of the C group, S and ACLT in the different periods

<b>Subgroup/group</b>	<b>Control</b>	<b>sham</b>	<b>TLCA</b>
<b>24h</b>	420,99±92,45	382,33±39,21	315,33±70,78
<b>48h</b>	473,33±56,49	468,06±78,19	404,11±64,93
<b>72h</b>	405,46±110,8	416,16±74,86	443,94±83,99
<b>7 days</b>	404,8±85,2	425,55±79,81	413,38±29,31

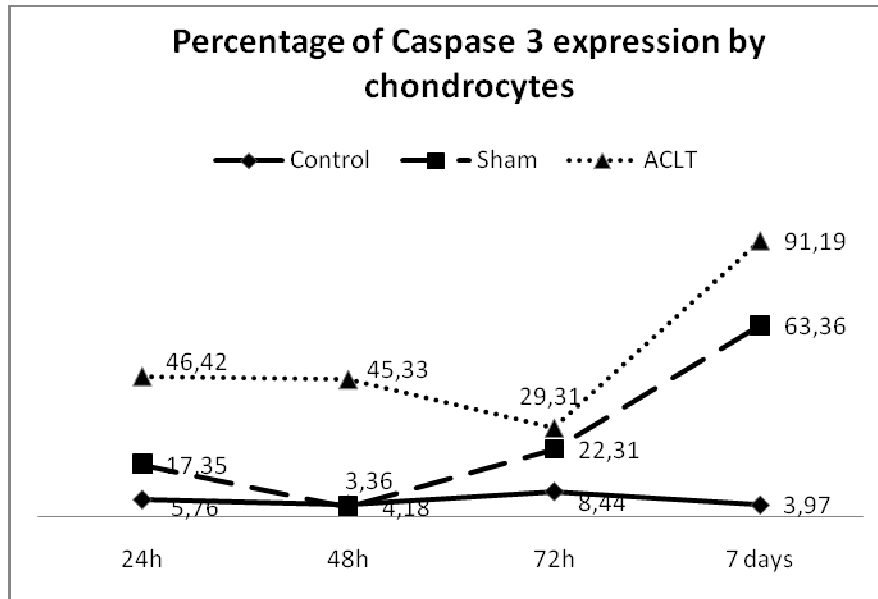


**Figure 1.** Photomicrograph of articular cartilage immunohistochemical staining for caspase 3 expression (x 200). (A) C group, with little expression of caspase 3, (B) ACLT 7days group, with higher expression of caspase 3, indicated by brown staining of the nuclei of chondrocytes (arrows).



**Figure 2.** Average of caspase 3 expression by chondrocytes. (A) Comparison among C, S and ACLT groups at 24 hours after ligament transection. The ACLT group had greater caspase 3 expression than C ( $p < 0.01$ ) and S ( $p < 0.01$ ) groups; the S group had more expression than C group ( $p = 0.01$ ). (B) Comparison among C, S and ACLT groups at 48 h after ligament transection. The ACLT group had greater caspase 3 expression than the S ( $p < 0.01$ ) and C ( $p < 0.01$ ) groups. (C) Comparison among C, S and ACLT groups at 72 hours after ligament transection, where the C group had lower caspase 3 expression than S ( $p < 0.01$ ) and ACLT ( $p < 0.01$ ) groups. (D) Comparison among C, S and ACLT groups at 7 days after ligament transection. The C group had lower caspase 3 expression than the S ( $p < 0.01$ ) and ACLT groups ( $p < 0.01$ ).

Legend of the groups: C = Control; S = Sham; TLCA = ACL transection.



**Figure 3.** Analysis of caspase 3 expression in C, S and ACLT groups, during 24h, 48h, 72h, and 7 days after ACL transection.

**ANEXO V** – Manuscrito submetido ao periódico Osteoarthritis and Cartilage como Brief Report

**Analysis of local and systemic TNF- $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression in the acute phase of osteoarthritis**

**Running headline: TNF- $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression in acute osteoarthritis**

**Introduction/Summary**

Inflammatory cytokines plays a key role in the onset of OA<sup>1</sup>. The IL1 is a proinflammatory cytokine of great importance in the degeneration of articular cartilage. It has multiple effects on articular chondrocytes: (1) depress the expression of aggrecan and collagen type II; (2) counterbalance the effect of anabolic factors of matrix synthesis; (3) and induce the expression of key enzymes in degradation of matrix components, i.e. the metalloproteinases (MMPs) 1, 3 and 13<sup>1-3</sup>. Another cytokine involved in the mechanism of articular cartilage degeneration is TNF- $\alpha$ , which has similar effects on chondrocytes, including stimulation of matrix degradation proteinases and suppression of synthesis of cartilage matrix. Although the literature demonstrated the combined action of TNF and IL-1 in the onset of OA<sup>4</sup>, there is not a consensus that determine whether the IL-1 and TNF- $\alpha$  act synergistically or at different times, and that the synergic effect of both aggravate OA<sup>1</sup>. According to Van Den Berg (2001)<sup>5</sup>, the presence of TNF- $\alpha$  is necessary to guide the onset of OA, whereas IL-1 plays a central role in sustaining inflammation and cartilage erosion. Likewise, little is known about

the exact moment that these cytokines are expressed in degradation of articular cartilage.

Studies that determine the inflammatory cytokines present in humans advanced OA usually analyze synovial fluid <sup>6-8</sup>, serum <sup>9</sup> and urine <sup>10</sup>. Similarly, experimental models of anterior cruciate ligament transection (ACLT) to investigate the acute phase of OA have been used, however assessing inflammatory and structural changes only after one week of the injury that triggers the OA <sup>11,12</sup>. The initial phase of acute knee injuries represents the best opportunity for biological treatment in order to promote healing or slow / prevent the cascade of destructive articular process that leads to OA<sup>13</sup>.

Thus, this study was designed to investigate the presence of TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  circulating in the blood and in the cartilage of rat knee joint after 24h, 48h, 72h and 7 days of the ACLT, as an experimental model of osteoarthritis (OA), to determine their possible role in the acute phase of OA. We have showed that the ACLT model increase TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression at 24h, 48h, 72h and 7 days in articular cartilage, but there was no expression in blood serum in any group. The Sham group had the same expression pattern compared to ACLT group, but in a lesser extent. There was no correlation between TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  in articular cartilage. In this way, it is important to think in the modulation of the molecular mechanisms responsible for the articular cartilage breakdown, and the relationship of changes to local and systemic OA characteristics, to try to control the disease progression. The similarities of Sham and ACLT results show that surgery can interfere in these inflammatory cytokines expression, suggesting that it could be a harmful procedure for articular cartilage. Collectively, it is possible to suggest that until 7 days after injury is a favorable period for application of therapies to prevent/slowing OA progression and future studies

evaluating others inflammatory markers is important to add knowledge to the findings on the cytokines involved in the *onset* of OA at the periods of 24, 48h, 72h and 7 days after ACL transection.

### **Methods/ Results/Discussion**

The study was conducted in accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals <sup>14</sup> as well as with the Ethics Committee of the Federal University of Sao Carlos.

Sixty four male adult Wistar rats ( $293 \pm 21.05\text{g}$ ) were maintained under controlled environmental conditions and free access to standard food and water. The animals were randomly distributed into three groups: C- Control (n=5), S- Sham (n=5), and ACLT (n=6). Each group was divided into four subgroups: 24 hours, 48 hours, 72 hours and 1 week. The animals of the subgroups ACLT underwent surgical transection of the ligament under anesthesia (intraperitoneal injection of xylazine solution of 12 mg / kg / body weight and ketamine 95 mg / kg / body weight). The animals of the S subgroup underwent to the surgical intervention, but without the transection of the ligament. After surgical procedures, the animals were free to move into the cage, according to the period specified for each subgroup. None anti-inflammatory or antibiotic drug was administered to the animals.

Immediately before the animals euthanasia, the intra-cardiac blood was collected to assess IL1- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  by Cytokine Enzyme Linked Immunosorbent Sandwich Assay (ELISA) in the serum, according to manufacturer's instructions, using antibodies specific for each one.

After euthanasia, the left knees were removed, and fixed in 10% formalin. The medial condyles of the left knees were decalcified using 7.5% nitric acid and the same concentration of glycerin, and it was then processed in paraffin. Sagittal sections of 5 $\mu$ m thickness were made through Microtome (Leica RM2145), for articular cartilage's IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  immunohistochemical analysis, using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) according to manufacturer's instructions. Tissue sections were deparaffinized and rehydrated. The sections were pre-treated with citrate buffer, pH 6.0, in microondas. Permeability was enhanced by using 0.2% Triton X-100 in PBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating sections with freshly prepared 3% hydrogen peroxide (Sigma, St. Louis, MO, USA) for 30 min. Non-specific staining was blocked by incubation of the sections with horse serum supplied by Vectastain Universal ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA), for 30 min. The sections were incubated overnight at 4°C in a humid chamber with their respective primary antibodies: Rabbit polyclonal TNF- $\alpha$  (Abcam Inc., Cambridge, MA) diluted at 1:2000, and monoclonal mouse IL-1  $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology Inc, California, USA) diluted at 1:50. A biotinlabelled goat anti-rabbit IgG (Vectastain Universal ABC kit) was used as a secondary antibody for 45 min at room temperature. A biotine avidin detection system (Vectastain Universal ABC kit) was used according to the manufacturer's recommendations, for 30 min at room temperature. The peroxidase was detected using liquid diaminobenzidine substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA), for 10 min. After counterstaining with methyl green, slides were dehydrated and mounted with Permount (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA).



After these, it were captured 5 images of TNF $\alpha$  immunostained slide, and 5 images of IL1 $\alpha$  immunostained slide, across the entire length of the articular cartilage in an increase of 200 x, using the software Axiovision 4.7 (Carl Zeiss). The analysis of the TNF $\alpha$  and the IL-1 $\alpha$  immunostained sections was carried out separately. The cytoplasm and periphery of chondrocytes stained dark brown indicate TNF $\alpha$  positive and IL1 $\alpha$  positive immunostaining. The chondrocytes immunolabeled positively for each cytokine were counted manually, by two blinded observers, over the entire field of five images, and the average of positively stained cells in these five fields was obtained. The Spearman test ( $R \geq 0.8$  and  $p \leq 0.05$ ) was used to check the correlation between the observers for TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression analysis, and to check the correlation between TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression. The Kruscal-Wallis with Newman-Keuls's post hoc ( $p \leq 0.05$ ) was used to compare the different groups regarding the TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression in the blood and in articular cartilage.

The most important finding of our study was that despite the inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  were not be expressed in the blood serum of animals at different periods analysed, were the optical density of IL1 $\alpha$  and TNF $\alpha$  expressed in the serum was below that the test sensitivity (IL1 $\alpha$  = 0,01; TNF $\alpha$  = 0,41), there was a great expression of these cytokines in articular cartilage until 7 days after ACLT, especially in 24 hours. These results clearly demonstrated how early is the articular cartilage chondrocytes reaction against of a harmful stimulus, in this case, the ACL transection. The ACLT group had an increased TNF $\alpha$  expression after 24h, with a higher values after 7 days, and a smaller expression after 48h of ACL transection (Figure 1). The IL1 $\alpha$  expression in ACLT group was higher at 24h and 48h after ACL transection, and decreased it at 72h after ACL transection, with a smaller number of chondrocytes that

expressed IL1 $\alpha$  at 7 days after ACL transection (Figure 2). The S group had the same TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression pattern that the ACLT group, but in a lesser extent. There was no correlation between TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  in articular cartilage ( $r \geq 0.8$  and  $p \leq 0.05$ ).

The fact that there is no expression of TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  in the animals blood serum can emphasize the idea that the early changes of OA occur locally, with expression of inflammatory cytokines released by chondrocytes. Pagura et al (2005)<sup>9</sup>, that evaluated the advanced stages of OA, found no catabolic cytokines (TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , and IL1 $\beta$ ) in serum and synovial fluid of patients with OA. However, growth factors were found in the synovial fluid, indicating that the local environment also has an advanced degree in regenerative attempt of OA.

The present study is the first one to assess the TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  local and systemic at a period as early as 24h, 48h, 72h and 7 days after ACL transection. This research has fundamental importance for the prevention of the degenerative disease cascade that leads to articular cartilage destruction and the subsequent OA, as a progressive degenerative disease difficult to treat. The fact that there was IL1 $\alpha$  and TNF $\alpha$  expression in articular cartilage as early as 24 hours after ACL transection may be useful for the application of anti-TNF and anti-IL-1 therapies, in order to prevent or slow the progression of the disease. The studies found in the literature<sup>6-8</sup> are concerned about investigate the behavior of inflammatory cytokines in the onset of OA, but only the study of Irie, Iwaso and Uchiyama (2003)<sup>7</sup> evaluated the period of less than 7 days after the ligament injury, and this corroborates the results found in the present study, since at 24 hours after ligament injury, the inflammatory cytokines are already present in the joint.

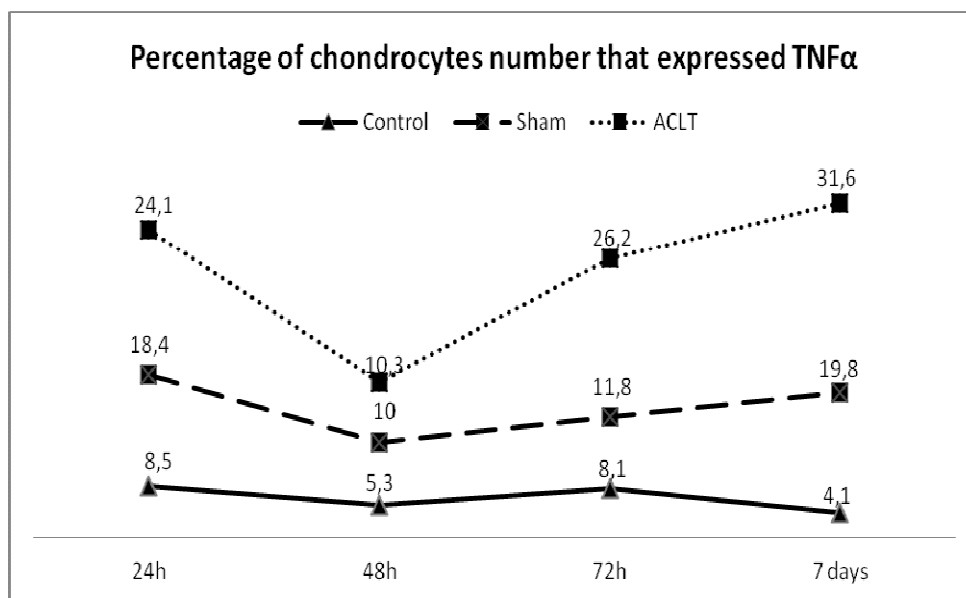
Goldring and Goldring (2004)<sup>4</sup> reported that the proinflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$ , alone or associated, deregulate the chondrocyte function, stimulating this cell to produce many proinflammatory cytokines, leading to the progressive degeneration of articular cartilage. In addition, Hedbom and Häuselmann (2002)<sup>15</sup> state that TNF $\alpha$  is involved in the onset of cartilage degeneration, whereas IL-1 is associated to this destruction, and the direct presence of IL-1 occurs in the complete absence of TNF $\alpha$ . Goldring and Goldring (2004)<sup>4</sup> also suggest that the IL-1 is 100 to 1000 times more potent than TNF $\alpha$ . Therefore, we can explain the non-synchronous behavior of both cytokines in articular cartilage in the onset of OA found in this study. Within 24 hours after ACL transection, it was found a high expression of both cytokines in the tissue. After 48 hours, as IL1 $\alpha$  have more aggressive action in tissue destruction, and still remains high, the TNF $\alpha$  is little expressed. In periods of 72h and 7 days after ACL transection, the behavior between the two cytokines is altered again, with a decrease in the IL1 $\alpha$  expression, and a further increase in TNF $\alpha$  expression, and thus probably stimulates a cascade of degenerative articular cartilage, which involves multiple other factors. Certainly, for this reason, we did not found correlation between the two cytokines in this study.

Interestingly, it was observed the same pattern of TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression in the S group, i.e, when the expression of this cytokines increased in the ACT group, it was also observed in the S group, and vice versa. This shows that only surgery can interfere in expression of these inflammatory cytokines, once it is an invasive procedure.

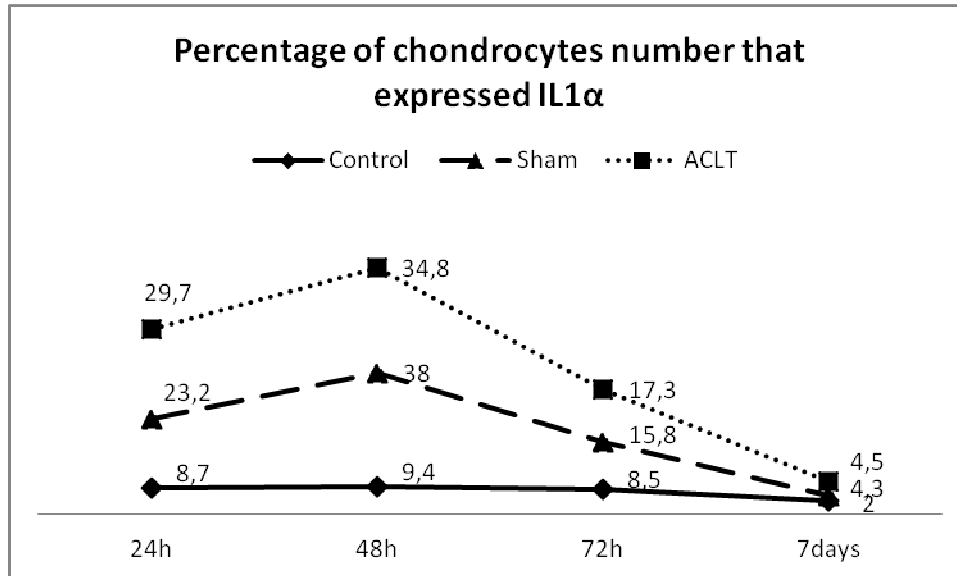
It is important to consider that the studies in the literature<sup>7,8</sup> using the ACLT as an inducer of OA, use the contralateral knee, i.e. the contralateral limb operated without

transection of the ligament, as a control group, or a group of chronic OA to compare the results. Considering the findings of this study which identified that the S group undergoes the same changes that the ACLT group, it is worth highlighting the importance of the C group to compare to the S and TLCA groups.

The results of this study show ACLT increase the expression of TNF $\alpha$  and IL1 $\alpha$  in articular cartilage at 24h, 48h, 72h and 7 days have, which may guide the treatment of OA in traumatic injuries at an early stage, preventing or delaying disease progression.



**Figure 1.** Average of chondrocytes number that expressed TNF $\alpha$  in the C, S and ACLT groups, during 24h, 48h, 72h, and 7 days after ACL transection. The C group had fewer chondrocytes that expressed TNF $\alpha$  compared to the S ( $p < 0.01$ ) and ACLT ( $p < 0.01$ ) groups in all times. The ACLT group had more chondrocytes that expressed TNF $\alpha$  compared to the S ( $p = 0.02$ ) group only 72 h period.



**Figure 2.** Average of chondrocytes number that expressed IL1 $\alpha$  in the C, S and ACLT groups, during 24h, 48h, 72h, and 7 days after ACLT. The C group had fewer chondrocytes that expressed IL1 $\alpha$  compared to the S ( $p < 0.01$ ) and ACLT ( $p < 0.01$ ) groups in 24h and 48 h period. In 72 h and 7 days period, there was no statistical significant difference among any group.

### Acknowledgements

The authors acknowledge Adriana Frias Renner, Department of Physiotherapy, Federal University of Sao Carlos for her assistance in the surgeries; Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for its financial support. João L Q Durigan was a post-doctoral grant holder supported by FAPESP (Process numbers: 08/09408-4).

**Conflict of interest statement**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

**Contributions**

The authors have contributed to the design of the article as follows:

(1) Carolina Náglio Kalil Dias and Stela Márcia Mattiello conducted the conception and design of the study. Carolina Náglio Kalil Dias, Alexandra Ivo de Medeiros and João Luiz Quaglioti Durigan worked in the acquisition of data, Fernando Augusto Vasilceac and Stela Márcia Mattiello;

(2) Carolina Náglio Kalil Dias drafting the article, and Fernando Augusto Vasilceac, João Luiz Quaglioti Durigan and Stela Márcia Mattiello reviewed it critically for important intellectual content;

(3) Carolina Náglio Kalil Dias, Fernando Augusto Vasilceac, João Luiz Quaglioti Durigan, Alexandra Ivo de Medeiros and Stela Márcia Mattiello approved the final version to be submitted.

## References

1. Goldring M B. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;43:1916-1926.
2. Ghosh P, Smith M. Osteoarthritis, genetic and molecular mechanisms. *Biogerontology* 2002;3:85-88.
3. Aigner T, Soeder S, Haag J. IL-1 $\beta$  and BMPs – Interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration. *Eur Cells Materials* 2006;12:49-56.
4. Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Rel Res* 2004;427S:S27-S36.
5. Van Den Berg WB. Anti-cytokine therapy in chronic destructive arthritis. *Arthritis Res* 2001;3:18-26.
6. Marks P, Donaldson MLC. Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2004;21(11):1342-1347.
7. Irie K, Uchiyama E, Iwaso I. Intraarticular inflammatory cytokines in acute cruciate ligament injured knee. *Knee* 2002;10:93-96.
8. Cuellar VG, Cuellar JM, Golish SR, Yeomans DC, Scuderi GJ. Cytokine profile in acute anterior cruciate ligament injury. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 2010;26(10):1296-1301.
9. Pagura SMC, Thomas SG, Woodhouse LJ, Ezzat S, Marks P. Circulating and synovial levels of IGF-I, cytokines, physical function and anthropometry differ in women awaiting total knee arthroplasty when compared to men. *J Orthop Res* 2005;23:397-405.

10. Streich NA, Zimmermann D, Shmitt H, Bode G. Biochemical markers in the diagnosis of chondral defects following anterior cruciate ligament insufficiency. *Int Orthop* 2011;35(11):1633-1637.
11. Appleton, C.T.G.; Mcerlain, D.D.; Pitelka, V.; Schwartz, N.; Bernier, S.M.; Henry, J.L. et al. Forced mobilization accelerates pathogenesis: characterization of a preclinical surgical model of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 9, 1:3-15, 2007.
12. Quasnicka HL, Anderson-Mackenzie JM, Tarlton JF, Sims TJ, Billingham MEJ, Bailey AJ. Cruciate ligament laxity and femoral intercondilar notch narrowing in early-stage knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52(10):3100-09.
13. Lawrence TJR, Birmingham J, Toth AP. Prevention of posttraumatic through interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha inhibition. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469(12):3522-3526.
14. National Research Council: Guide for the care and use of laboratory animals. National Arthritis Academy Press, Washington DC 1996.
15. Hedbom E, Häuselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role in inflammation. *CMLS Cell Mol Life Sci* 2002;59:45-53.



**Analysis of local and systemic TNF- $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression in the acute phase of osteoarthritis**

**Running headline: TNF- $\alpha$  and IL1 $\alpha$  expression in acute osteoarthritis**

**Keywords:** Osteoarthritis; TNF $\alpha$ ; IL1 $\alpha$

<sup>1</sup>Carolina Náglio Kalil Dias, <sup>1</sup>Fernando Augusto Vasilceac, <sup>1,2</sup>João Luiz Quaglioti Durigan, <sup>3</sup>Alexandra Ivo de Medeiros, <sup>1</sup>Stela Márcia Mattiello

**1 Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil**

**2 Department of Physiotherapy, University of Brasília, Distrito Federal, Brazil**

**3 Department of Pharmacy, State University of São Paulo, Brazil**

**Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil**

**Address to correspondence and reprint request to:**

**Dr Stela Márcia Mattiello, Ph.D.,**

**Department of Physiotherapy, Federal University of São Carlos**

**Via Washington Luis, Km 235**

**Zip code: 13565-905**

**São Carlos, São Paulo, Brazil**

**Tel: 55-16-3351-8039**

**Fax: 55-16-3361-2081**

**E-mail: stela@ufscar.br**