



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA

MARIANE SANTOS TREVISAN

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA NA OSTEOARTRITE DE JOELHO DE RATOS:
VALIDAÇÃO E REPRODUTIBILIDADE DE UMA NOVA CLASSIFICAÇÃO

SÃO CARLOS

2018

MARIANE SANTOS TREVISAN

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA NA OSTEOARTRITE DE JOELHO DE RATOS:
VALIDAÇÃO E REPRODUTIBILIDADE DE UMA NOVA CLASSIFICAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós graduação em Gerontologia da Universidade Federal de São Carlos - PPGero como requisito para obtenção do título de Mestre em Gerontologia" – Área de Concentração: Saúde, biologia e envelhecimento.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac

SÃO CARLOS

2018



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mariane Santos Trevisan, realizada em 11/12/2018:

Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac
UFSCar

Prof. Dr. Renato Leonardo de Freitas
UNIFAL

Profa. Dra. Paula Regina Mendes da Silva Serrão
UFSCar

Dedicatória

*Dedico esta dissertação de Mestrado a minha
família, que sempre acreditou em mim e me
apoia incondicionalmente! Amo muito vocês!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus! Ele que dedico todas minhas forças e as bênçãos em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Eurides e Marines, pelo apoio, confiança e amor que sempre depositaram em mim. Vocês, mesmo de forma simples e humilde, me ensinaram e mostraram o real sentido da vida. Destaco que se hoje cheguei aqui e alcancei meus objetivos, foi porque tive grandes mestres em minha vida como vocês. Obrigada!

Agradeço ao meu noivo, Allan, pelo carinho, amor e paciência. Meus compromissos muitas vezes me fez abrir mão de estar ao seu lado. Sempre me apoiou, pensando sempre no meu crescimento, mesmo que isso causasse a distância. Sua companhia e apoio, tornaram tudo mais fácil. Obrigada!

Agradeço a minha irmã, Carol, que mesmo de longe, mas sempre presente, sempre será minha metade e minha confidente. Obrigada!

Agradeço a minha tia Neusa, que sem ela não chegaria onde estou hoje. Obrigada por me incentivar e proporcionar condições. Serei eternamente grata. Obrigada!

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Augusto Vasilceac, meu orientador, que desde 2014 me ajuda e me orienta de forma acolhedora e sábia. Agradeço pela confiança depositada em mim e pela paciência. Agradeço pelos conselhos e incentivos, por me fazer insistir e nunca desanimar, você me tornou uma pessoa melhor. Espero ter correspondido suas expectativas. Obrigada!

Agradeço aos membros da minha banca, por aceitarem o convite de participarem desse momento de extrema importância para mim e contribuírem com minha formação.

Agradeço ao grupo de pesquisa, Camila, Natália, Júlia, Cris e Isabela, pela parceria, companheirismo e trocas de ajuda.

Agradeço também as meninas do Lab 26, Ana Julia, Patrícia, Nayara, Daiene, Isabela e Juliane pelas parcerias e risadas. Por deixarem tudo mais leve. Ana e Pati, obrigada por sempre estarem disponíveis para me auxiliarem em minhas dúvidas. Agradeço também a todos os colegas da Pós-Graduação.

E por fim a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado. Um muito obrigada a todos!

RESUMO

O objetivo desse estudo foi desenvolver, validar e tornar reprodutível uma nova avaliação histológica do complexo articular de joelhos de ratos. Para aquisição da amostra (procedimento experimental), 20 ratos foram divididos em 5 grupos: Controle, Osteoartrite 3 meses, Osteoartrite 6 meses, Osteoartrite 9 meses e Osteoartrite 12 meses. O modelo animal de osteoartrite foi o de transecção do ligamento cruzado anterior do joelho. Após o período de exposição à doença de cada grupo, as articulações dos joelhos de todos os animais foram coletadas e processadas para a confecção de lâminas histológicas, que foram coradas com *Hematoxilina de Harris* e *Safranina Fast Green*, e selecionadas aquelas que melhor representavam a OA. A geração dos itens da nova avaliação, a qual abordou todo o complexo articular em diferentes tempos da OA, foi desenvolvida seguindo os princípios de orientação para o desenvolvimento de um sistema de classificação (Pritzker et al., 2006), que inclui não só a padronização do próprio sistema de avaliação, mas também, as condições que a histopatologia é avaliada. A partir da confecção da nova avaliação foi realizado um treinamento dos avaliadores e a avaliação das fotomicrografias segundo a Nova Avaliação Histológica e após dois meses a avaliação de Mankin (1971). Posterior, foi feita as análises estatísticas, confiabilidade através do Coeficiente de Correlação Intra-Classe e a correlação de ambas as avaliações. A nova avaliação apresentou excelente confiabilidade intra e inter-observador com um Coeficientes de Correlação Intraclasse (CCI) de 0,992 e 0,994 respectivamente, entre todos avaliadores. A confiabilidade inter-observador foi comparável para observadores experientes e inexperientes e ambos obtiveram um CCI de 0,993. Correlações significantes foram encontradas entre a nova avaliação histológica e de Mankin, com um coeficiente de correlação (CC) médio de 0,95. Portanto, a nova avaliação histológica do complexo articular é uma ferramenta válida e confiável para avaliar a degeneração do complexo articular em diferentes tempo de osteoartrite e é adequada para pesquisadores inexperientes e experientes.

PALAVRAS-CHAVE: Osteoartrite. Histologia. Ratos. Classificação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das fases da metodologia	12
Figura 2A. Itens e graus da nova classificação histológica para OA de joelho	15
Figura 2B. Ilustração do complexo articular saudável	16
Figura 3A. Gráfico de dispersão para as Avaliações, Nova Avaliação e Mankin	18
Figura 3B. Gráfico de Bland e Altman	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas

17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 DESENHO EXPERIMENTAL BASEADO EM ARTIGOS DE VALIDAÇÃO HISTOLÓGICAS	11
2.1.1. Fase 1: Identificação	12
2.1.1.1. Identificação	12
2.1.1.2. Aquisição da amostra	12
2.1.2. Fase 2: Geração de itens	12
2.1.3. Fase 3: Verificação e avaliações	13
2.1.3.1. Fase de teste da nova avaliação histológica	13
2.1.3.2. Treinamento para a nova avaliação	13
2.1.3.3. Avaliação	14
2.1.4. Fase 4: Validação	16
2.1.4.1. Análise estatística	16
3. RESULTADOS	16
3. 1. CONFIABILIDADE INTER E INTRA-OBSERVADOR	16
3.2. CORRELAÇÃO DA NOVA AV. HISTOLÓGICA E A DE MANKIN	17
4. DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÃO	20
INTERESSES COMPETITIVOS	20
FINANCIAMENTO	20
AGRADECIMENTOS	20
REFERÊNCIAS	20
ANEXO	23

1. INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é uma das doenças mais comuns da atualidade e suas manifestações clínicas são dor, rigidez, edema, diminuição da amplitude de movimento (ADM) e da força muscular (Yassin et al., 2015; Pereira, Ramos, Branco, 2015). Além da variedade de manifestações clínicas da doença, diferentes tecidos são comprometidos com o desenvolvimento da OA: cartilagem articular, membrana sinovial, capsula articular, ligamentos, tendões, osso subcondral, tecido muscular, além da produção de citocinas inflamatórias (Glyn-Jones et al., 2015; Peterfy et al., 2006).

São amplas e diversificadas as características encontradas que abordam a degeneração do complexo articular. Além disso, os métodos comuns de avaliação histopatológica têm ampla variação inter-observador e são poucos lineares (Ostergaard et al., 1997), portanto, há uma crescente necessidade de padronizar a avaliação da histopatologia da OA (Pritzker et al., 2006).

Atualmente existe a avaliação de Mankin et al., (1971), sistema de graduação histológica que avalia 4 itens: alterações na estrutura da cartilagem, como presença de fibrilações e fissuras até a desorganização total nas camadas; comportamento celular, como hiper celularidade, clones e hipocelularidade; conteúdo de proteoglicanas e integridade da *Tidemark*, intacta ou descontínua, limitando-se apenas na avaliação da cartilagem, não avançando para os demais tecidos.

Mais a diante a Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (*OARSI – Osteoarthritis Research Society International*) publicou em 2006 o seguinte artigo, “Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging” de Pritzker et al., (2006), uma avaliação consistente, em que avaliam a OA de forma quantitativa gradual em seis graus e quatro estágios, tornando-se complexa de empregar-se. Além disso, identificam como Mankin apenas as características da cartilagem, focam em alterações na matriz extra celular (MEC), manifestações estruturais, e avançam, de forma sucinta, apenas erosão óssea, deixando os demais tecidos acometidos pela OA excluídos.

Depois em 2010 a própria *OARSI* publicou o artigo “*The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat*”, as recomendações de avaliação histológica da *OARSI* (2010), contemplam todo o complexo articular avaliando de forma quantitativa e qualitativa a cartilagem articular, como profundidade, extensão e área da degeneração, porém com medidas morfológicas e não celularidade, colágeno e proteoglicanos, como nas avaliações de Mankin et al., (1997) e Pritzker et al., (2006). Na literatura, as alterações da OA são encontradas em todo o complexo articular,

principalmente na camada calcificada e osso subcondral. Dessa forma, Gerwin et al., (2010), não hesitou em contemplar em suas recomendações a avaliação de camada calcificada, osso subcondral, osteófitos, membrana sinovial e capsula articular, além das medidas morfológicas da cartilagem articular.

Pearson et al., (2011), realizaram os testes de validação e identificaram que tanto a avaliação de Mankin e a de Pritzker são confiáveis e reprodutíveis. Além de terem uma forte correlação quando avaliaram pacientes com OA de joelho. Porém, Lee et al., (2011), induziram a OA com exercício intenso de esteira em ratos, e em uma comparação com o Sistema de Classificação de Mankin, identificaram que o sistema da OARSI (2006) não é sensível às mudanças iniciais da OA induzidas pelo exercício, pois seus itens de avaliação, não abordam celularidade.

Em linhas gerais, interpreta-se que, Mankin et al., (1971), é uma Classificação histológica mais específica, mais reprodutível e fácil de aplicar, porém, limita-se apenas na cartilagem articular. Já Pritzker et al., (2006) sistema de graduação, porém é complexo e que não abordou todo complexo articular. Gerwin et al., (2010), que qualificaram os demais tecidos do complexo articular, traz apenas recomendações de avaliações e não quantificam a OA em gravidade.

Uma Avaliação histológica mais fácil de usar, que aborde todo o complexo articular em diferentes tempo da OA e além disso, que seja validada, significa contribuir a padronização da histologia em pesquisa básica. Portanto, o objetivo deste estudo foi desenvolver, validar e tornar reprodutível uma Nova Avaliação Histológica do complexo articular de joelhos de ratos em diferentes tempo da OA.

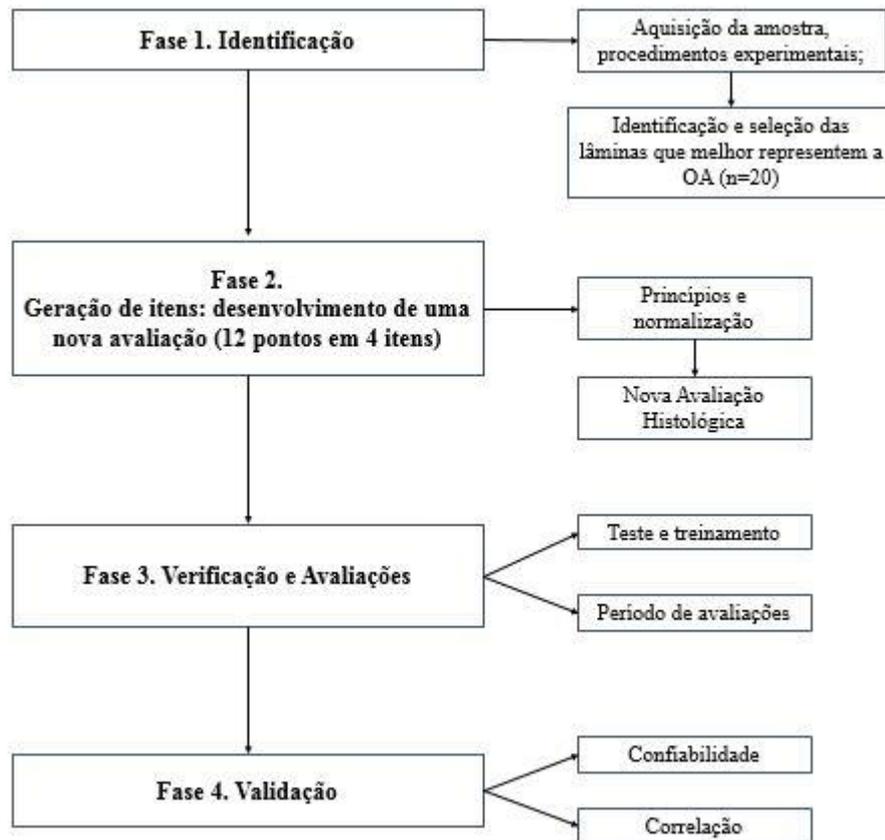
2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DESENHO EXPERIMENTAL BASEADO EM ARTIGOS DE VALIDAÇÃO HISTOLÓGICAS

O presente estudo é de caráter experimental e possui um desenho transversal de avaliação histológica.

Foi baseado na metodologia padrão de dois estudos, um de validação de uma nova classificação para degeneração de discos intervertebrais (Rutges et al., 2013) e outro também de validação, porém, de pontuação ultrassonográfico para OA de joelho (Riecke et al., 2014). Para melhor delineamento incluímos quatro fases descritas no fluxograma abaixo.

Figura 1. Fluxograma das fases da metodologia.



2.1.1. Fase 1: Identificação

2.1.1.1. Identificação

Foi realizado o cálculo amostral, e definiu-se analisar 20 lâminas, ou seja, quatro de cada grupo segundo o tempo de TLCA, sendo o suficiente para alcançar os objetivos traçados, considerando um erro de 5% (Miot, 2011).

2.1.1.2. Aquisição da amostra

Foram utilizados 20 ratos machos *Wistar* (300 ±10g). Mantidos no biotério do Departamento de Fisioterapia (UFSCar), com as condições ambientais controladas luminosidade: ciclo de 12h claro/escuro). Os animais foram divididos em 5 grupos de diferentes

tempos de OA, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses e o grupo controle. O modelo animal de OA utilizado foi o de transecção cirúrgica do ligamento cruzado anterior (LCA) segundo a técnica descrita por Galois et al., 2004. Todo o experimento foi conduzido de acordo com recomendações éticas internacionais (National Reserch Council, 1996) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos (Protocolo CEUA/UFSCar 1809120815)

Após o período experimental, todos os animais foram eutanasiados e removido bilateralmente a articulação do joelho para a confecção de lâminas histológicas, que foram coradas com *Hematoxilina de Harris e Safranina Fast Green*, conforme recomendações de Vasilceac et al., (2011); Gerwin et al., (2010).

2.1.2. Fase 2: Geração de itens

Para aumentar a qualidade do instrumento, foi padronizado a avaliação histopatológica da OA. Portanto, um conjunto de princípios-alvo para orientar o desenvolvimento do sistema de classificação foi utilizado (Pritzker et al., 2006). Em resumo, os princípios para aplicações são simplicidade, utilidade, escalabilidade, extensão e comparabilidade, ou seja, ser confiável, útil, poder escalonar, detalhar e comparar, respectivamente.

Em seguida, com base na literatura, experiência com classificação histológica de cartilagem articular degenerativas e reuniões do nosso grupo de pesquisa, uma nova avaliação histológica foi desenvolvida. Como já citado, os tecidos do complexo articular foram incluídos, resultando em quatro itens, sendo que cada item tem uma grau de 0,1,2 e 3; 0 representa ausência de características de degeneração, 1 leve degeneração, 2 média degeneração e 3 severa degeneração (Figura 2A). O total da pontuação da nova avaliação é a soma dos pontos dos seis diferentes itens, resultando em um valor mínimo de 0 pontos em uma articulação completamente saudável e um máximo de 12 pontos para uma articulação inteiramente degenerada.

2.1.3. Fase 3: Verificação e avaliações

2.1.3.1. Fase de teste da nova avaliação histológica

Nesta etapa três observadores independentes, um professor experiente em histologia (KI), um estudante de doutorado com experiência em avaliações histológicas (CAL) e um

estudante de graduação inexperiente (JFC), avaliaram a Nova Avaliação histológica e um conjunto de fotomicrografias compostos de imagens com alterações da doença, afim de observar a qualidade das mesmas. (Anexo I) Nenhum dos observadores estavam familiarizado com avaliação histológica do complexo articular.

Baseado nas dificuldades e comentários dos três observadores, as descrições de cada item e as imagens foram ajustadas, para ser compreensível para observadores inexperientes. Portanto, os ajustes foram os seguintes: retirar o item redução da coloração da matriz do item cartilagem, completar o termo colapso com o termo total desorganização no item osso subcondral, incluir uma legenda no item osteófito, afim de orientar os avaliadores de que forma devem medir caso encontrem osteófito, e por fim, completar o termo camadas com o termo número de linhas nos itens da membrana sinovial.

2.1.3.2. Treinamento para a nova avaliação

Para evitar a subjetividade de cada avaliação individual, e assim padroniza-la para todos avaliadores, desde os inexperiente até o pesquisador experiente, foi realizado um treinamento, com avaliadores diferentes daqueles que participaram da fase de teste. Em dois encontros, com intervalo de uma semana e com a participação de todos avaliadores. No primeiro momento foram treinados quanto aos itens abordados na Nova Avaliação Histológica. Várias fotomicrografias aleatórias foram apresentadas aos avaliadores, aproximadamente 4 a 14 por tecido (Anexo II), e assim, deveriam classificar como ausente ou presente os itens da Avaliação histológica em uma tabela (Anexo III), sem nenhuma explicação quanto essas características histológicas. No segundo momento, foi repetido esse treinamento dos itens e apresentado o programa Pannoramic Viewer 1.15.4 © 3DHISTECH Ltda 2014 com todas suas ferramentas de uso, e uma explicação prévia e apresentação da Nova Avaliação Histológica (Figura 2B). Por fim, duas fotomicrografias foram classificadas pelos observadores e avaliadas com a intenção de validar o treinamento. Vale ressaltar que todo o treinamento foi coordenado pela responsável da pesquisa (MST).

2.1.3.3. Avaliação

Quatro avaliadores cegados, os mesmos que realizaram o treinamento, pontuaram as 20 fotomicrografias de acordo com a Nova Avaliação histológica, dos quais, um estudante de mestrado (CM) e outro estudante de graduação (NC), ambos inexperientes com avaliação

histológica. Os outros dois com experiência em avaliação histológica e com interesse especial em OA, um professor e pesquisador de pesquisa básica (FAV) e um estudante de mestrado (MST). Todos avaliadores classificaram as fotomicrografias duas vezes, com um período intermediário de uma semana.

Depois de dois meses da Nova Avaliação os dois avaliadores experientes (FAV e MST) aplicaram a Classificação de Mankin (1971) nas mesmas 20 fotomicrografias. Tanto a Nova avaliação quanto Mankin. Para que pudesse ser feita a validação e a reprodutibilidade da avaliação.

Figura 2A.

TECIDO	PONTUAÇÃO	CARACTERÍSTICAS DE DEGENERAÇÃO
CARTILAGEM ARTICULAR	0	Nenhuma alteração
	1	Superfície intacta, com fibrilações, hiper celularidade e hipertrofia de condrócitos.
	2	Fissuras na camada superficial e/ou média, formação de clones de condrócitos, desorganização das colunas de condrócito.
	3	Fissuras na camada profunda, hipocelularidade, redução intensa da coloração da matriz e <i>tidemark</i> fragmentada;
OSSO SUBCONDRA L	0	Nenhuma alteração
	1	Proliferação celular e o aumento das células mesenquimais da medula
	2	Aumento da matriz óssea
	3	Total desorganização/Colapso na epífise
OSTEÓFITO	0	Nenhuma alteração
	1	Marginais ou em formação (<199 μ)
	2	Osteófitos pequenos (200-299 μ)
	3	Osteófitos grandes (>300 μ)
MEMBRANA SINOVIAL	0	Nenhuma alteração
	1	Aumento do número de linha/camadas de células de revestimento ou proliferação de tecido subsinovial;
	2	Aumento do número de camadas de células de revestimento e proliferação de tecido subsinovial ou vilosidades sinoviais.
	3	Aumento do número de camadas de células de revestimento, proliferação de tecido subsinovial, vilosidades sinoviais e aumento do número de células inflamatórias.

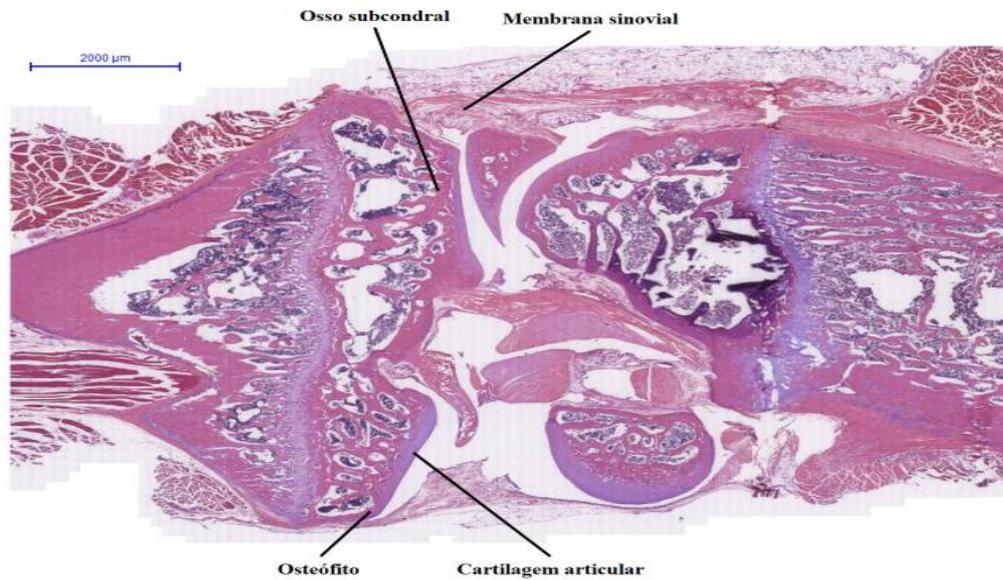
Figura 2B.

Fig.2A. Itens e graus da nova classificação histológica para OA de joelho. **2B.** Ilustração do complexo articular saudável. A imagem demonstra como os avaliadores foram inicialmente capacitados para as avaliações. Os quatro tecidos são sinalizados para facilitar sua localização. Observa-se que nesta figura o osteófito não existe, portanto a seta apenas demonstra a sua possível localização. Corte frontal da articulação do joelho.

2.1.4. Fase 4: Validação

2.1.4.1. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 22.0.

A confiabilidade intra e inter-observador foi avaliada pelo cálculo do Coeficiente de Correlação Intraclassa (CCI) para ambos os sistemas de avaliação. Foi definido o modelo misto de duas vias para os dois tipos de confiabilidade, inter e intra-observadores. Seguimos o Tipo de CCI com vários observadores e com Definição de concordância absoluta para CCI inter-observadores e consistência para análise de CCI intra-observador. Analisamos o CCI como descrito por *Koo and Li (2016)*, e com base no intervalo de confiança de 95% da estimativa do CCI, os valores inferiores a 0,5, entre 0,5 e 0,75, entre 0,75 e 0,9 e superiores a 0,90 são indicativos de mau, moderado, bom e excelente confiabilidade, respectivamente.

Para avaliar a correlação foi utilizado o Teste paramétrico de Pearson entre ambas as avaliações, Nova Avaliação histológica e a padrão ouro, Mankin et al., (1971). Avaliamos Coeficiente de Correlação (CC) como descrito por Bland e Altman. O CC é considerado baixo

entre 0,30 e 0,49, moderada entre 0,50 e 0,69, alta entre 0,70 e 0,89 e muito alta entre 0,89 e 1,00 (Bland and Altman, 1986).

3. RESULTADOS

3. 1. CONFIABILIDADE INTER E INTRA-OBSERVADOR

A confiabilidade intra-observador para a Nova Avaliação foi excelente tanto para os observadores inexperientes quanto para o experiente, com um CCI médio de 0,98 e 0,99 para inexperientes e 1,00 para observador experiente. A confiabilidade inter-observador média da Nova avaliação também foi excelente, com um CCI médio de 0,99. A confiabilidade média inter-observador entre observadores experientes e inexperientes também foi excelente, com um CCI médio de 0,99 em ambos os CCIs. Quanto a Avaliação de Mankin, também obteve uma confiabilidade inter-observadores experientes excelentes, com CCI de 1,00 (Tabela 1).

3.2. CORRELAÇÃO DA NOVA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E A DE MANKIN

Houve alta correlação para ambas as avaliações realizadas pelos dois observadores que realizaram as avaliações, coeficiente de correlação (CC) de 0,96 e 0,94 ($p=0,007$ e $p=0,016$) (Figura 3A). A concordância do Mankin e a Nova Avaliação histológica foram analisadas com um gráfico de Bland e Altman, como mostrado na figura 3B.

Tabela 1. Confiabilidade intra e inter-observador de todas as avaliações realizadas;

		CONFIABILIDADE INTRA- OBSERVADOR (MÉDIA/ 95% IC)	CONFIABILIDADE INTER- OBSERVADOR (MÉDIA/ 95% IC)
NOVA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	Todos	0,992 (0,85-1,00)	0,994 (0,97-1,00)
	Experientes	1,000 (0,99-1,00)	0,993 (0,94-1,00)
	Inexperientes	0,985 (0,95-1,00)	0,993 (0,93-1,00)
MANKIN	Experientes	-	1,000 (0,99-1,00)

Figura 3A. - Gráfico de dispersão para as Avaliações, Nova Avaliação e Mankin

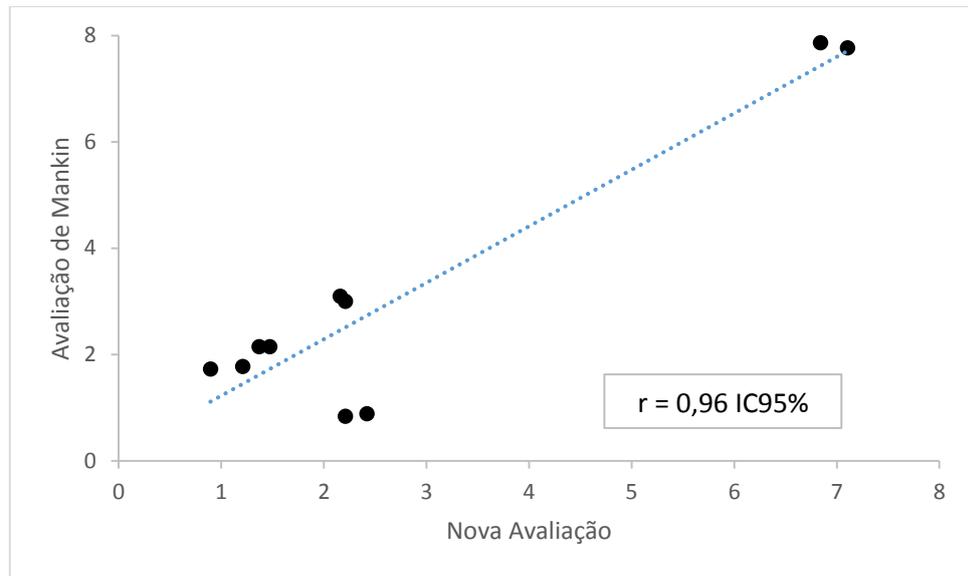


Figura 3B. Gráfico de Bland e Altman

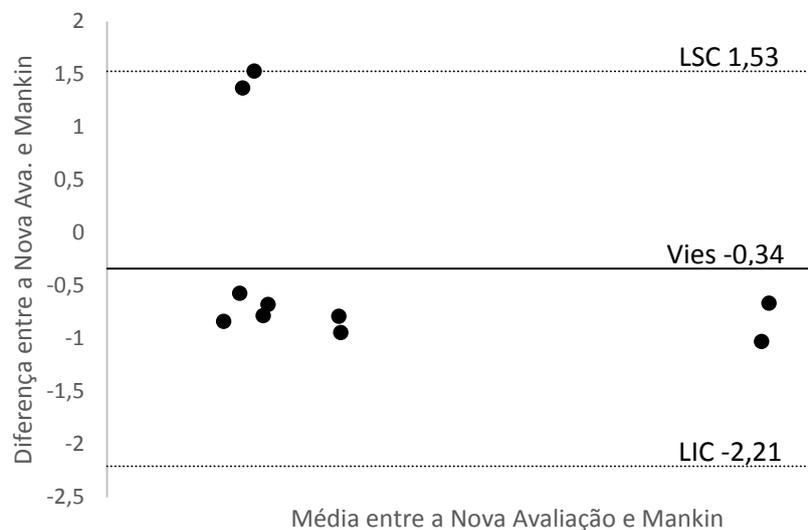


Figura. 3A. A correlação entre as avaliações foi avaliada comparando as pontuações para as mesmas imagens em dois momentos diferentes com um intervalo de 2 meses. **3B.** Gráfico de Bland e Altman, diferença e média entre Nova avaliação e Mankin. LSC: limite superior de concordância; LIC: limite inferior de concordância.

4. DISCUSSÃO

A osteoartrite possui características patológicas de difícil compreensão (Pritzker et al., 2006), tem uma acentuada variabilidade, e estudos afirmam a heterogeneidade no seu processo (Pearson et al., 2011; Mankin et., 1997). Segundo Pritzker et al. (2006), a falta de um consenso

em relação à ordem e ao papel das características patológicas da OA é a lacuna das pesquisas, portanto, avaliações histológicas abrangentes e reprodutíveis com aceitação universal proporcionariam benefícios importantes para comparação de dados histológicos (Pearson et al., 2011).

Atualmente, existem ferramentas que avaliam a OA, um exemplo é o Mankin et al., (1971), que ainda é a mais utilizada, mas com modificações que são poucas descritas em detalhes (Pearson et al., 2011). Além disso, Ostergaard et al., (1997), avaliaram o Mankin e afirmaram que consideravam a reprodutibilidade inadequada, as avaliações para validação não foram rigorosas. Pritzker et al., (2006), autores de outra ferramenta também utilizada atualmente, consideraram que ainda precisam de uma validação mais extensa e aprofundada, mas a avaliação parece superior aos métodos anteriores, mostrando-se com uma confiabilidade maior que a de Mankin (Pearson et al., 2011). Em outro estudo, Gerwin et al., (2010), validaram suas recomendações para avaliações histológicas de osteoartrite em ratos, e apontaram que pode ser usado de forma reprodutível para indivíduos experientes e inexperientes.

Nosso estudo resultou em bons resultados, o CCI mostrou-se excelente confiabilidade intra e interobservador para ambos os grupos. E quanto a correlação, a nova avaliação mostrou ter alta correlação quando comparada à classificação de Mankin.

Quanto ao processo degenerativo, segundo Ostergaard et al., (1999) a ferramenta de Mankin et al., (1971) apresenta falhas para diferenciar entre a OA normal e leve a moderada. Entretanto, Pearson et al., (2011), enfatizou que o sistema de pontuação de Mankin fornece medidas úteis na caracterização da osteoartrite do joelho, mas tem o enfoque para apenas pontos específicos da OA, cartilagem e tidemark, sendo uma avaliação atribuída com enfoque nos níveis mais agressivos da doença.

A Nova Avaliação, com diferentes tempos da OA, apresenta imagens claras do processo degenerativo da doença, como pequenas fibrilações a colapso na epífise, e consegue diferenciar nas pontuações dos itens.

A avaliação do complexo articular tem sido considerada relevante em estudos da OA, desta forma, Pritzker et al., (2006), desenvolveram uma avaliação para pontuar e padronizar as avaliações histopatológicas da OA com conceitos mais atualizados. Então, já consideraram que a OA afeta todos tecidos articulares, principalmente osso subcondral, porém, não focaram sua avaliação no complexo articular e ainda abordaram somente e de forma sucinta o tecido ósseo. Gerwin et al., (2010), vão além da cartilagem e osso subcondral, porém, não é tão simples de utilizar quanto Mankin, e trazem apenas recomendações e não pontuam os graus do processo de degeneração da osteoartrite.

Nesta perspectiva de abordar todo o complexo articular e ter uma classificação que seja útil para OA leve a severa, o presente estudo desenvolveu uma Nova Avaliação Histológica da Osteoartrite de joelho de ratos, validou e tornou reprodutível para pesquisadores experientes e inexperientes.

Assim, confiabilidade foi avaliada afim de verificar a reprodutibilidade entre indivíduos com experiências variadas quanto avaliações histológicas. Uma vez que, confiabilidade reflete não apenas o grau de correlação, mas também a concordância entre as avaliações, ou seja, relação de variância real pela variância de erro (Koo e Li, 2016). Portanto, foi realizado teste e treinamento entre todos os avaliadores, utilizando ferramentas e formulários de avaliações prévias, como realizado nos estudos de validações (Rutges et al., 2013; Gerwin et al., 2010).

É a primeira avaliação histológica baseada em conceitos atualizados quanto a degradação da OA, que quantifica o complexo articular em graus, contempla a evolução da doença de leve à severa, admitindo a variabilidade acentuada do processo osteoartrítico. A Nova avaliação histológica foi desenvolvida conforme as necessidades descrita na literatura e baseou-se nos pontos positivos das ferramentas existentes.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, desenvolvemos e validamos uma avaliação histológica de OA de joelho de ratos que pode ser usado por pesquisadores experientes e inexperientes. O uso de avaliações histológicas bem validadas podem tornar a análise de resultados histológicos de estudos mais objetiva e menos tendenciosa. Além disso, elas permitem análises padronizadas de pesquisa básica e translacional e podem aumentar a eficiência da pesquisa neste campo.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A maior limitação do estudo foi não conseguir abordar de forma integral o complexo articular e não ter feito mais avaliações, uma vez que nosso estudo focou apenas em avaliações histológicas. Portanto, para futuros estudos da área, orienta-se avançar nas avaliações e também nos demais tecidos do complexo articular, afetados pelas OA.

INTERESSES COMPETITIVOS

Os autores desejam declarar que não houve interesse concorrente neste estudo.

FINANCIAMENTO

Não houve financiamento por nenhum órgão financiador de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Keika Inouye pela atenção e colaboração e ao Programa de Pós Graduação em Gerontologia da UFSCar.

REFERÊNCIAS

BLAND J.M., ALTMAN D.G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**. 10. p. 327-307. 1986.

DALY LE, BOURKE GJ. Interpretation and use of medical statistics. **Oxford: Blackwell Science Ltd**. 2000.

GALOIS L, et al. Dose–response relationship for exercise on severity of experimental osteoarthritis in rats: a pilot study. **Osteoarthritis and Cartilage**. 12. p. 34-39. 2004.

GERWIN, N., et al. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.18, p. S24-S34, 2010.

GLYN-JONES, S.; et al. Osteoarthritis. **Lancet**. 386. p. 376–87, 2015.

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

KOO T.K., LI. M.Y. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. **Journal of Chiropractic Medicine**. 15. p. 155–163. 2016.

LEE, Y.J. Evaluation of osteoarthritis induced by treadmill-running exercise using the modiWed Mankin and the new OARSI assessment system. **Rheumatol Int**. 31. p. 1571–1576. 2011.

MANKIN, H.J; DOFMAN, H.; LIPPIELLO, L.; ZARINS, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. **J Bone Joint Surg Am.** v.53, p.523-37. 1971.

MIOT H.A. Cálculo amostral. **J Vasc Bras.** Vol. 10, n. 4. 2011.

OSTERGAARD K, et al. Histologic/histochemical grading system for osteoarthritic articular cartilage e reproducibility and validity. **Arthritis Rheum.** 40(10), p. 1766 a 71. 1997.

OSTERGAARD K, et al. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. **Ann Rheum Dis.** 58(4). p. 208e13. 1999.

PEARSON R.G, et al. Histopathology grading systems for characterisation of human knee osteoarthritis e reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. **Osteoarthritis and Cartilage** 19. p. 324-331. 2011.

PEREIRA, D., RAMOS, E. BRANCO, J. Osteoarthritis. **Acta Médica Portuguesa.** v.2,.n.1, p.99-106, 2015.

PETERFY, MD, et al. MRI protocols for whole-organ assessment of the knee in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage.** 14, A95-A111, 2006.

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

YASSIN, N. Z., et al. Effect of a topical copper indomethacin gel on inflammatory parameters in a rat model of osteoarthritis. **Drug design, development and therapy,** v. 9, p. 1491, 2015.

FASE DE TESTE

Nova Avaliação

TECIDO	PONTUAÇÃO	CARACTERÍSTICAS DE DEGENERAÇÃO
CARTILAGEM ARTICULAR	0	Nenhuma alteração
	1	Superfície intacta, com fibrilações, hiper celularidade e hipertrofia de condrócitos.
	2	Fissuras na camada superficial e/ou média, formação de clones de condrócitos, desorganização das colunas de condrócito.
	3	Fissuras na camada profunda, hipocelularidade, redução intensa da coloração da matriz e tidemark fragmentada;
OSSO SUBCONDRA L	0	Nenhuma alteração
	1	Proliferação celular e o aumento das células mesenquimais da medula
	2	Aumento da matriz óssea
	3	Total desorganização/Colapso na epífise
OSTEÓFITO	0	Nenhuma alteração
	1	Marginais ou em formação (<199µ)
	2	Osteófitos pequenos (200-299µ)
	3	Osteófitos grandes (>300µ)
MEMBRANA SINOVIAL	0	Nenhuma alteração
	1	Aumento do número de linha/camadas de células de revestimento ou proliferação de tecido subsinovial;
	2	Aumento do número de camadas de células de revestimento e proliferação de tecido subsinovial ou vilosidades sinoviais.
	3	Aumento do número de camadas de células de revestimento, proliferação de tecido subsinovial, vilosidades sinoviais e aumento do número de células inflamatórias.

Complexo articular

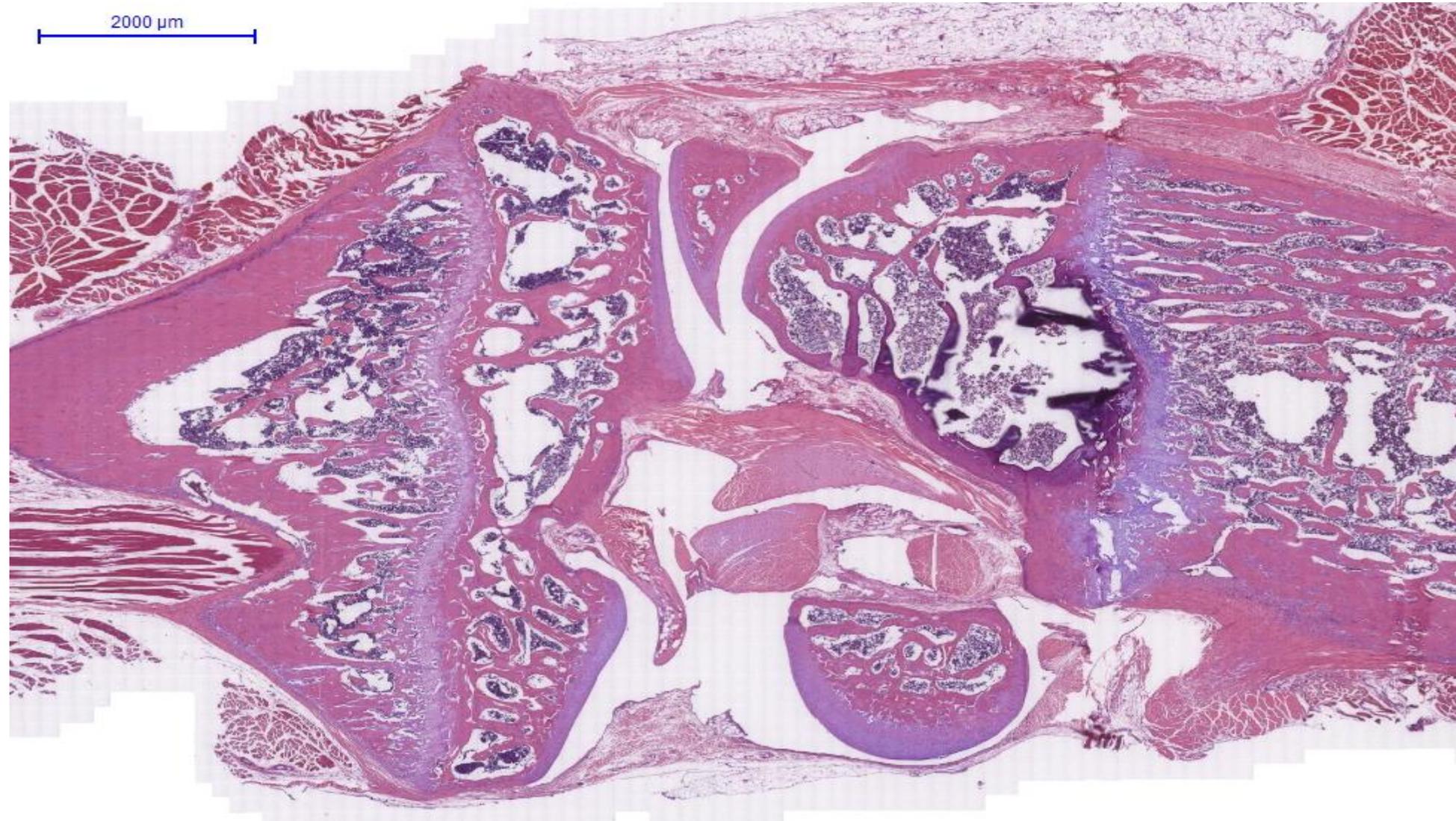


Ilustração do complexo articular saudável. A imagem demonstra como os avaliadores serão inicialmente capacitados para as avaliações. Os quatro tecidos são sinalizados para facilitar sua localização. Observa-se que nesta figura o osteófito não existe, portanto a seta apenas demonstra a sua possível localização.

1 – CARTILAGEM ARTICULAR

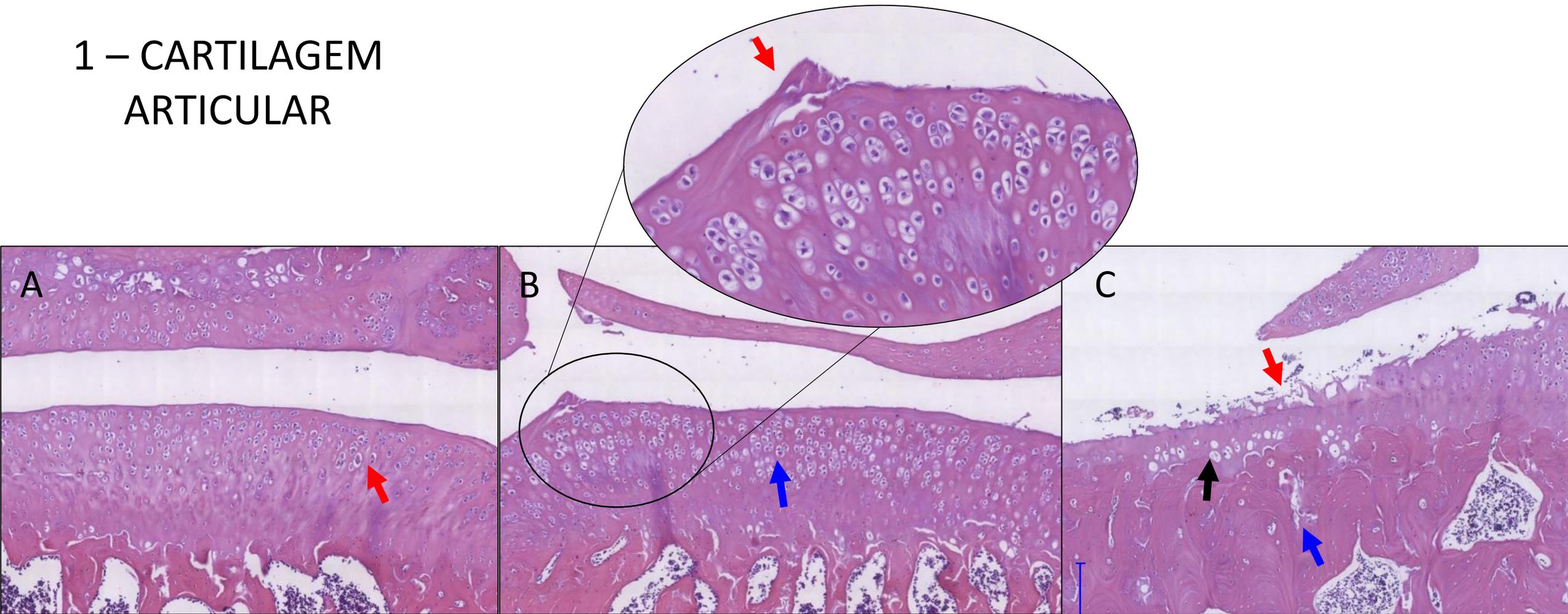


Ilustração da cartilagem articular. Figura A, representa grau 1 - superfície com fibrilações (irregularidade), hiper celularidade dirigindo para superfície, em uma tentativa de reparo. Figura B, grau 2 - fissura na superfície (seta vermelha), formação de clones de condrócitos (seta azul). E figura C, grau 3 - fissuras na camada profunda (seta vermelha), hipocelularidade, ou seja, diminuição e morte celular (seta preta) e tidemark fragmentada (seta azul).

1 – CARTILAGEM ARTICULAR

Avaliação	Pontuação
Nenhuma alteração	0
Superfície intacta, com fibrilações, hipercelularidade e hipertrofia de condrócitos.	1
Fissuras na camada superficial e/ou média, formação de clones de condrócitos, redução da coloração da matriz, desorganização das colunas de condrócito.	2
Fissuras na camada profunda, hipocelularidade, redução intensa da coloração da matriz tidemark fragmentada;	3

2 – OSSO SUBCONDRA

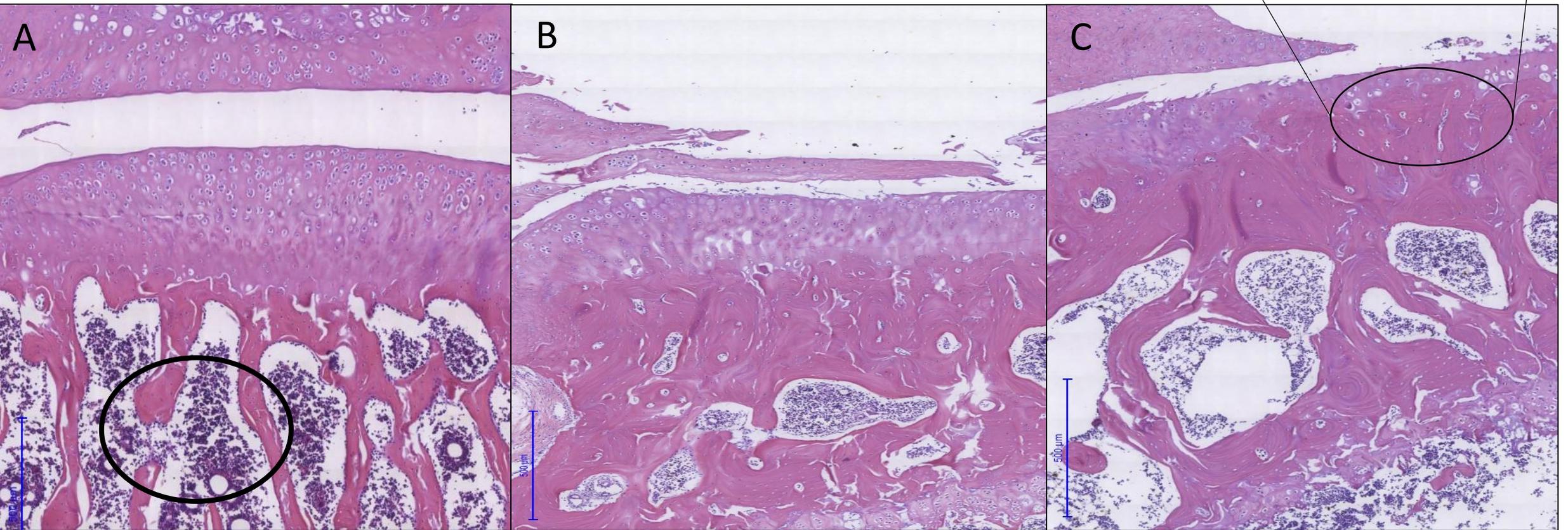


Imagem ilustrando a degeneração do osso subcondral. Figura A, grau 1, representa o aumento da células mesenquimais da medula (proliferação celular - circulo), figura B, grau 2 - aumento da matriz óssea e figura C, grau 3 - colapso na epífise, evidenciado na imagem aumentada.

2 – OSSO SUBCONDRAI

Avaliação	Pontuação
Nenhuma alteração	0
Proliferação celular e o aumento das células mesenquimais da medula	1
Aumento da matriz óssea	2
Colapso na epífise (ponta do osso)	3

3 – OSTEÓFITO



Ilustração do osteófito. Figura A, grau 1, osteófito em formação (<199 μ), figura B, grau 2, osteófitos pequenos (200-299 μ) e figura C, grau 3, Osteófitos grandes (>300 μ). (Observação: realizar a maior medida do osteófito que encontrar).

3 – OSTEÓFITO

Avaliação	Pontuação
Nenhuma alteração	0
Marginais ou em formação (<199 μ)	1
Osteófitos pequenos (200-299 μ)	2
Osteófitos grandes (>300 μ)	3

4 – MEMBRANA SINOVIAL

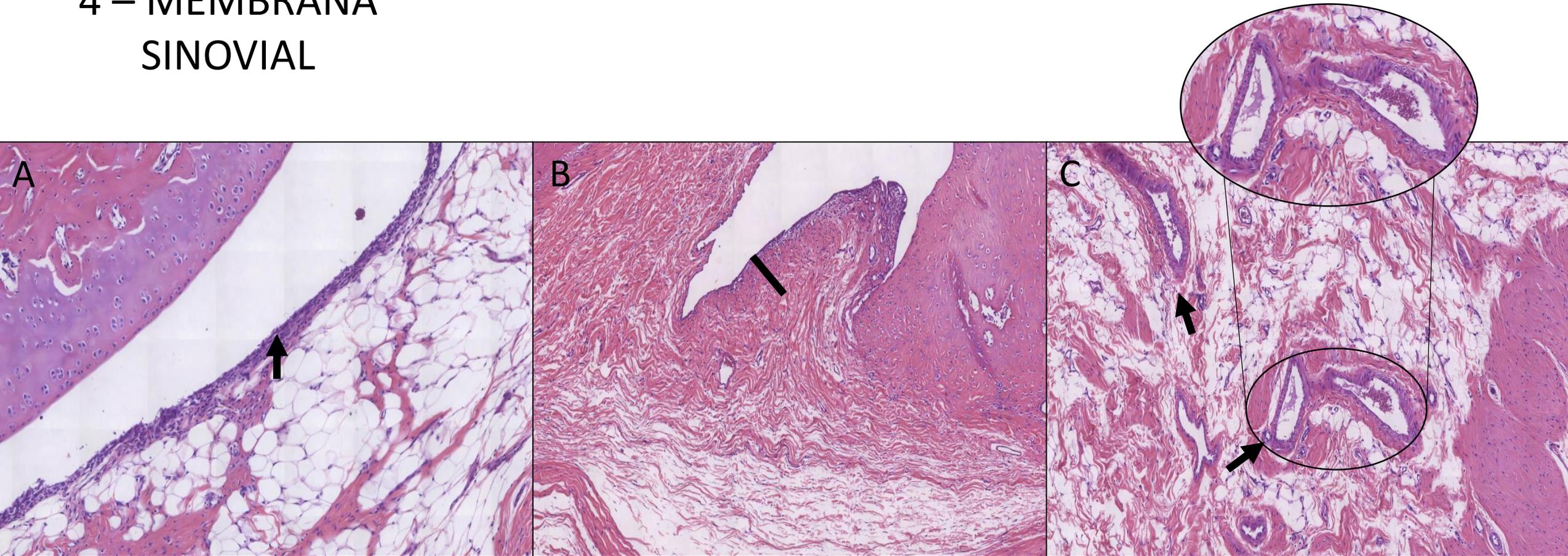


Ilustração da membrana sinovial. Figura A, grau 1, aumento no número de células (seta preta), figura B, grau 2, aumento da tecido subsinovial (reta) e presença de vilosidade e última, figura C, grau 3, infiltração de células inflamatórias (seta).

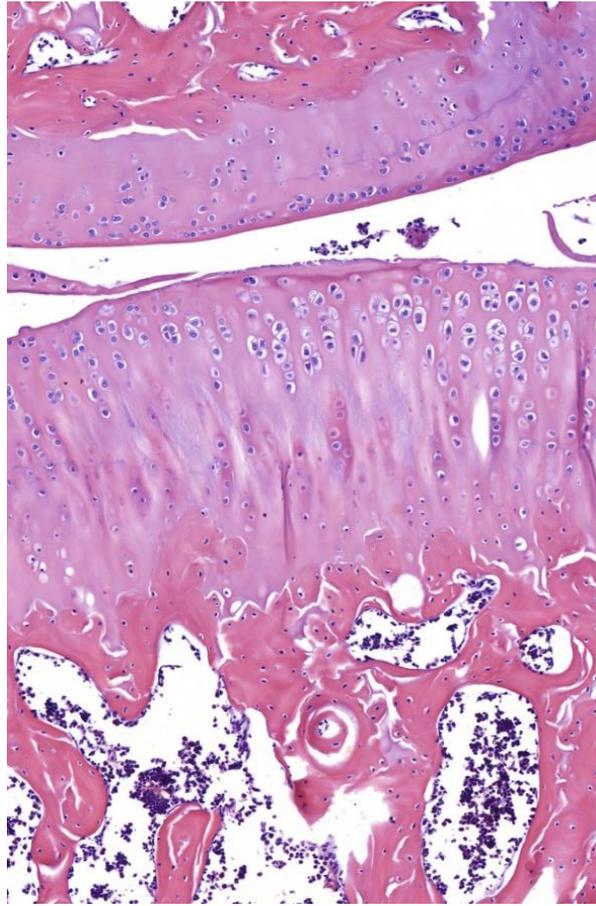
4 – MEMBRANA SINOVIAL

Avaliação	Pontuação
Sem alteração	0
Aumento do número de camadas de células de revestimento ou proliferação de tecido subsinovial;	1
Aumento do número de camadas de células de revestimento, proliferação de tecido subsinovial ou vilosidades sinoviais .	2
Aumento do número de camadas de células de revestimento e proliferação de tecido subsinovial, vilosidades sinoviais e aumento do número de células inflamatórias	3

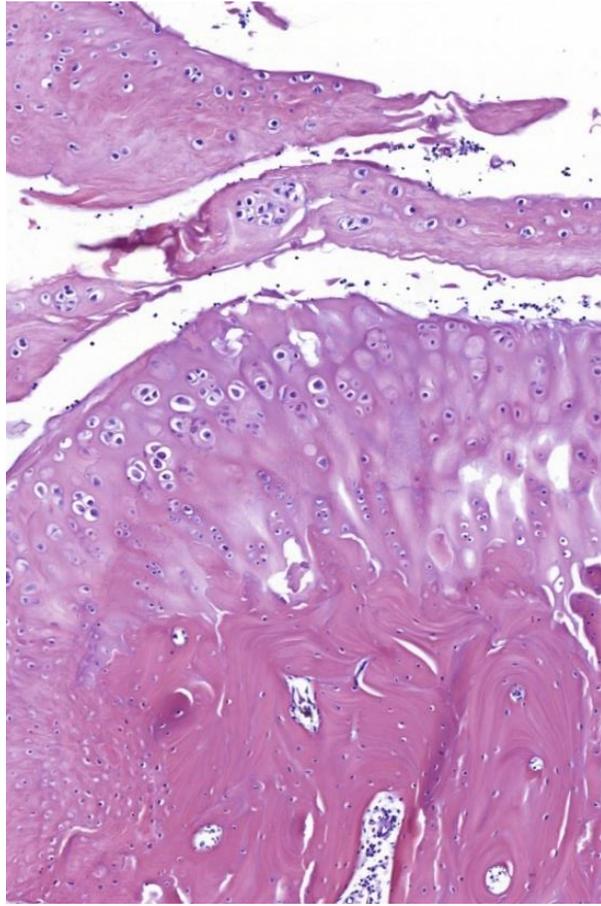
Anexo II

TREINAMENTO

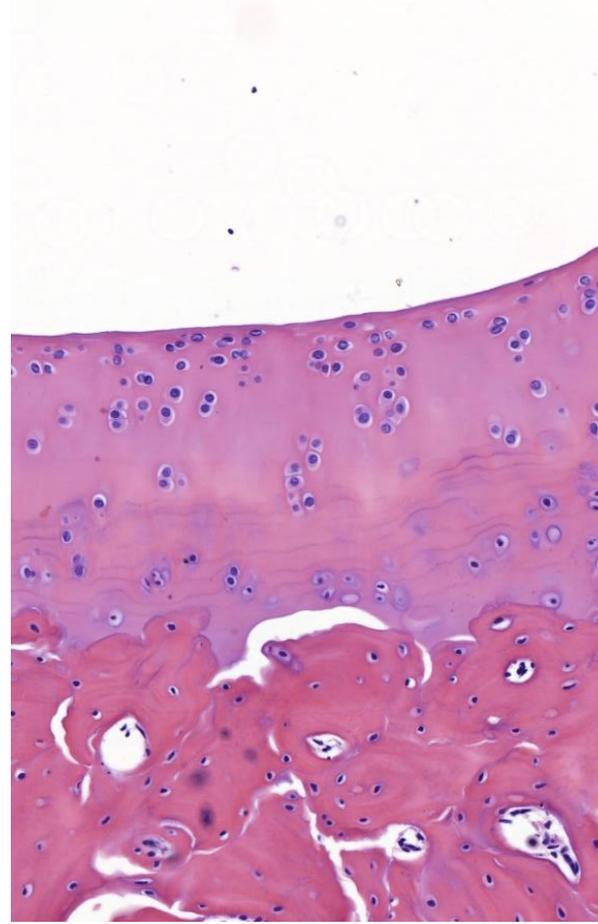
O QUE VOCÊ VÊ NA CARTILAGEM ARTICULAR?



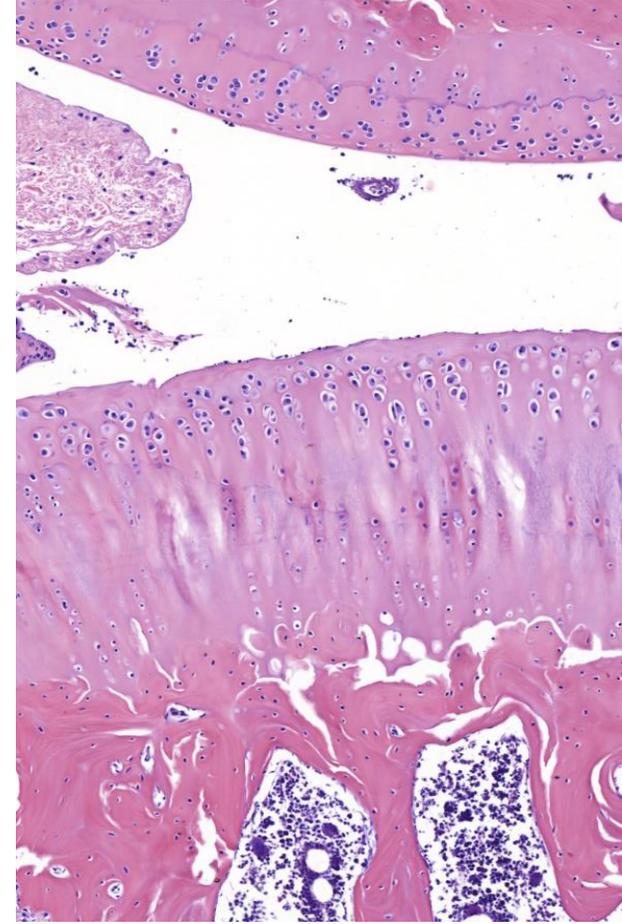
1



2

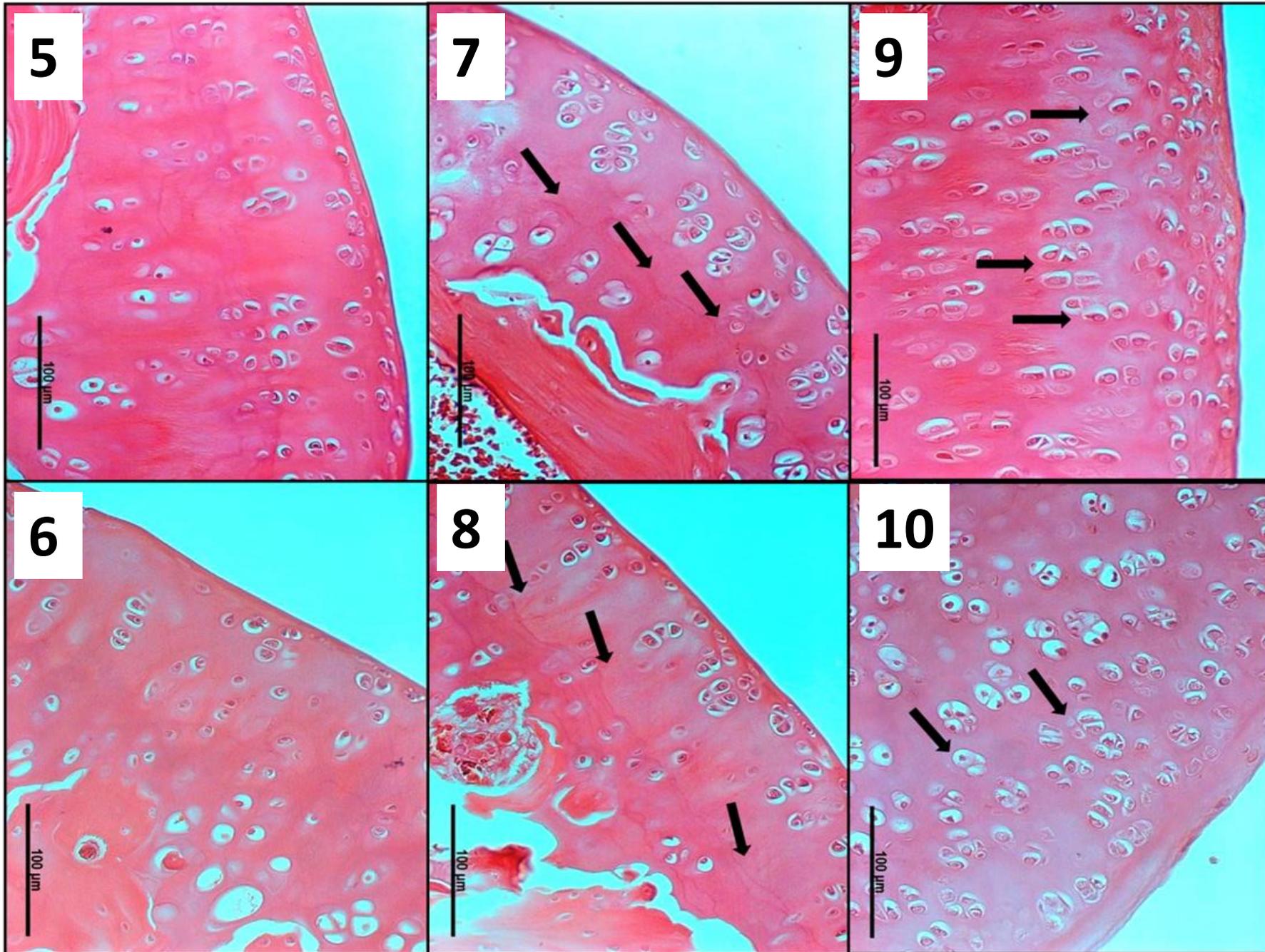


3

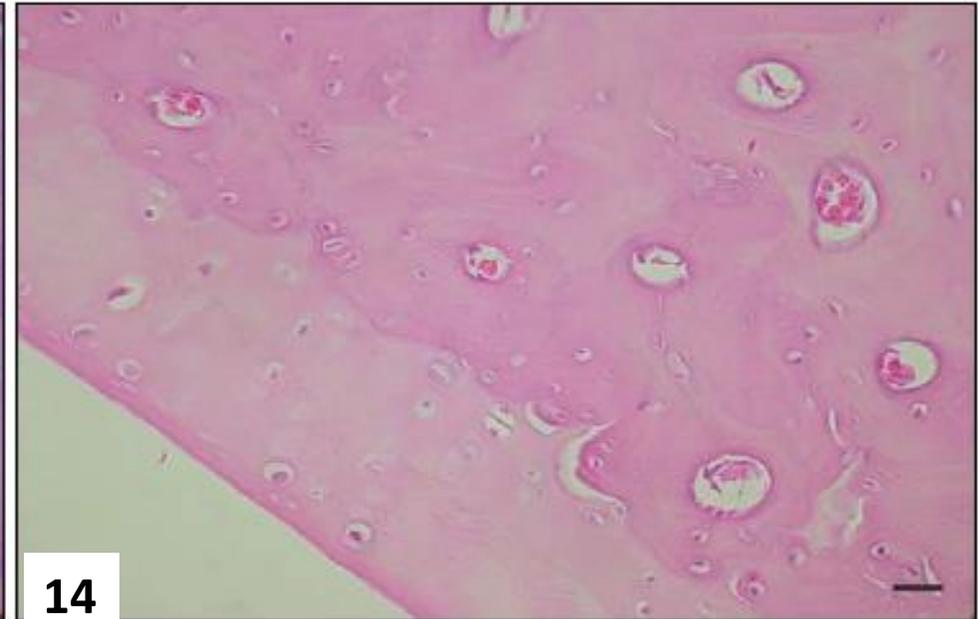
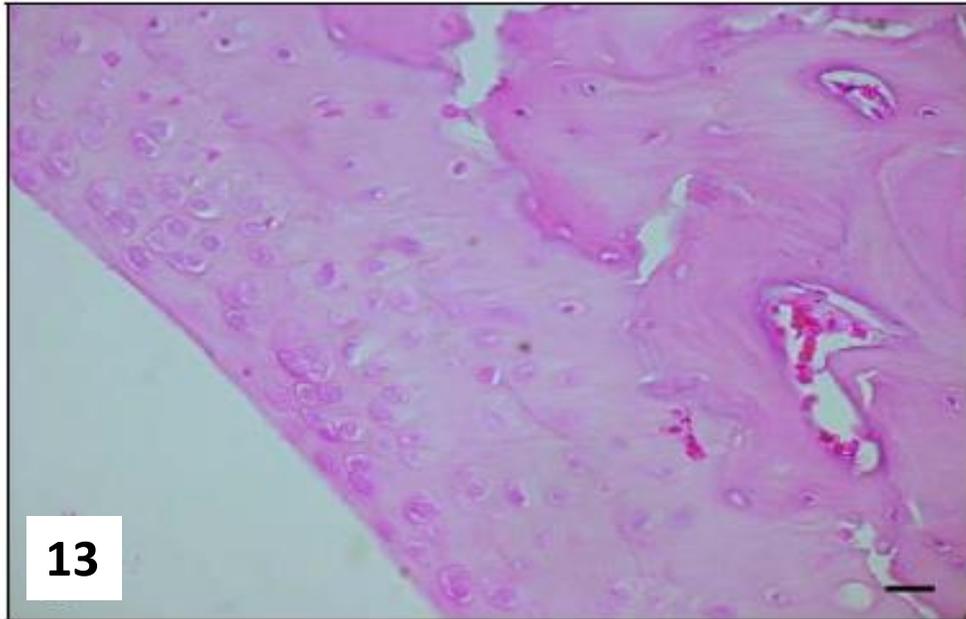
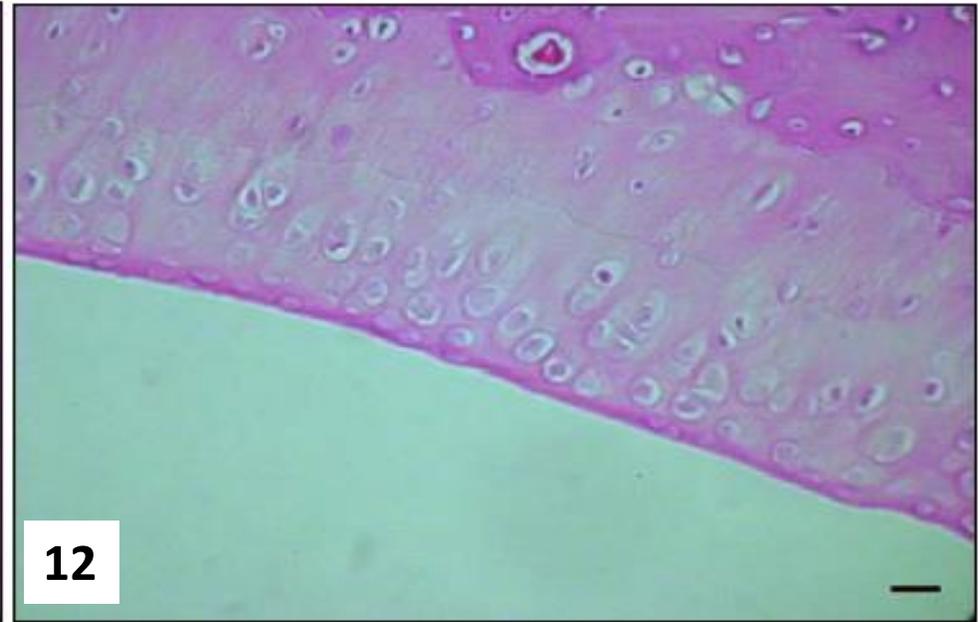
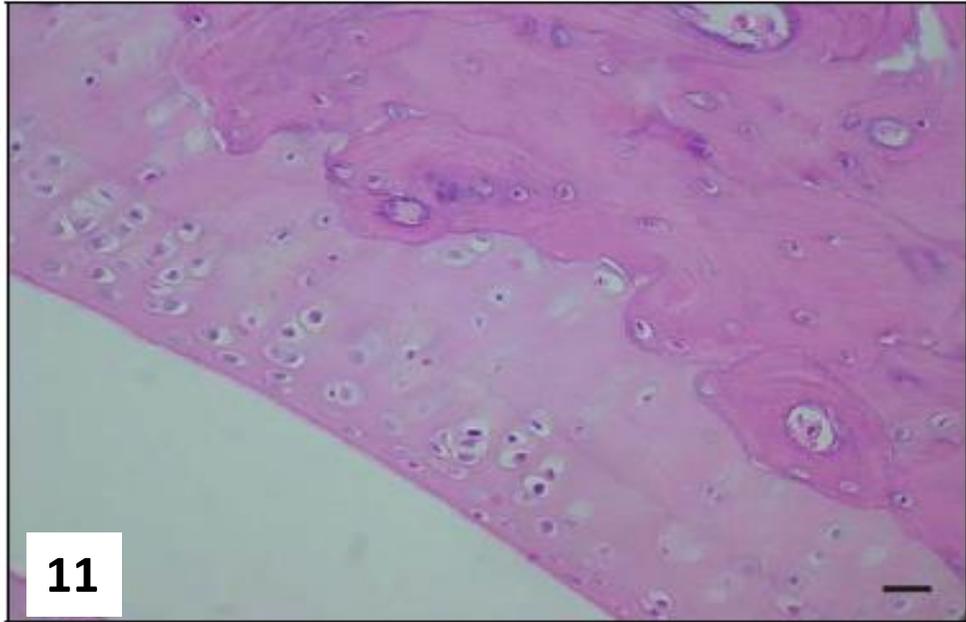


4

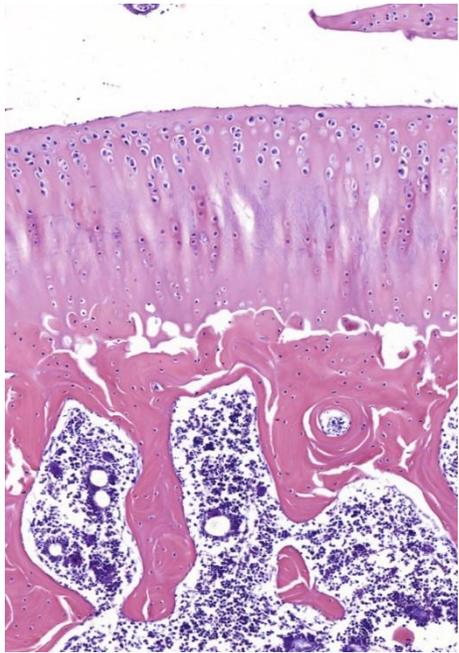
O QUE VOCÊ
VÊ NA
CARTILAGEM
ARTICULAR?



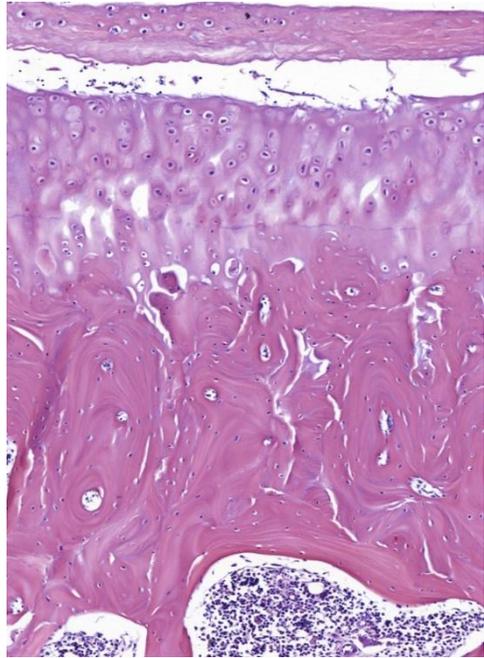
O QUE VOCÊ VÊ NA CARTILAGEM ARTICULAR?



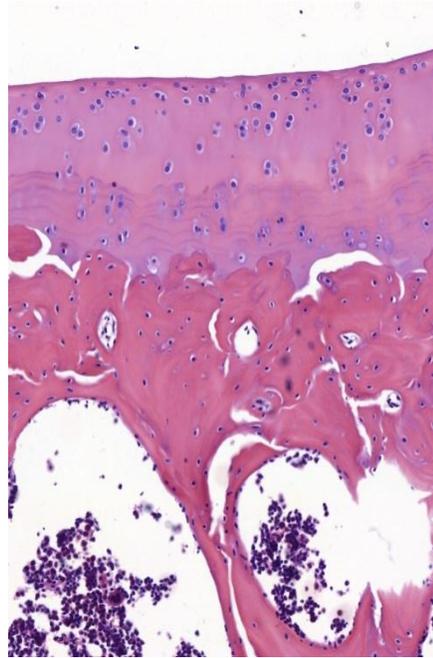
O QUE VOCÊ VÊ NO OSSO SUBCONDRAI?



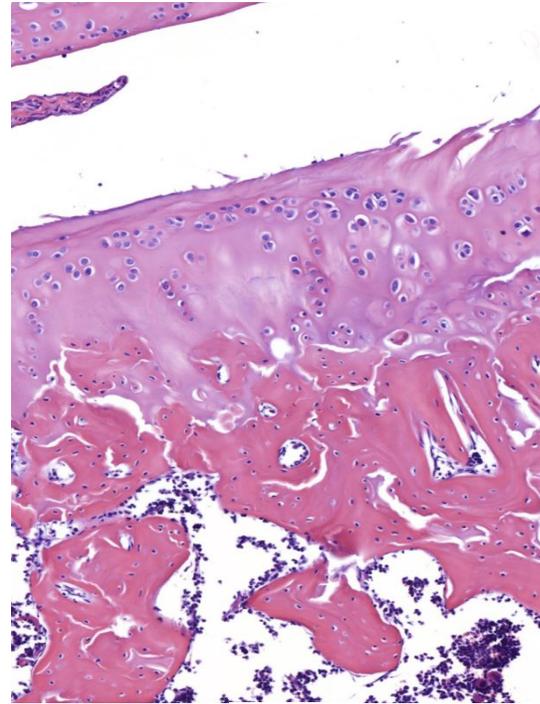
1



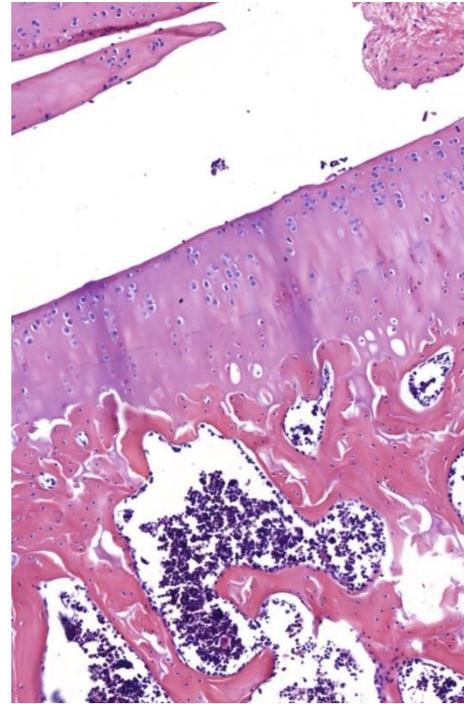
2



3

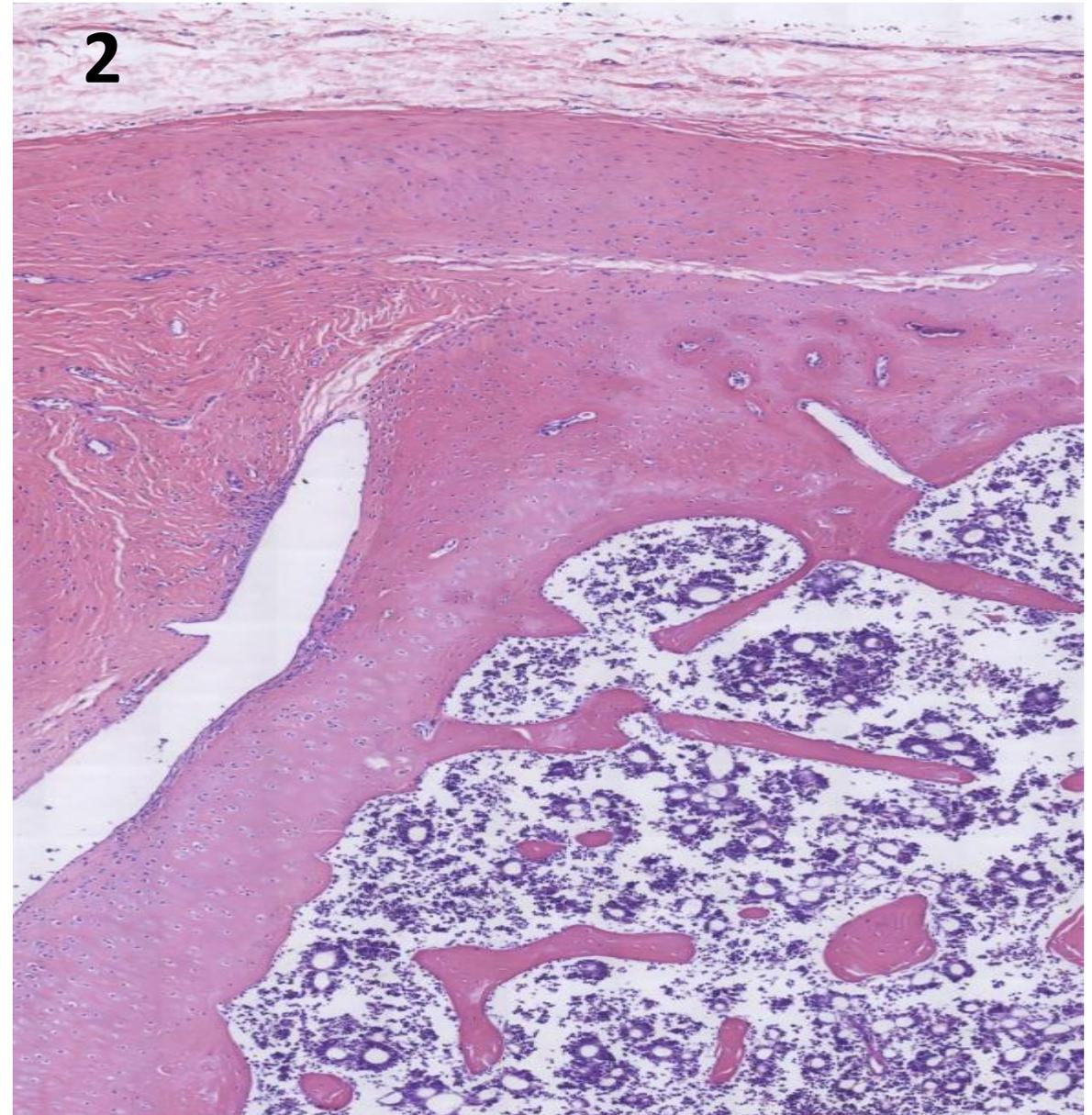
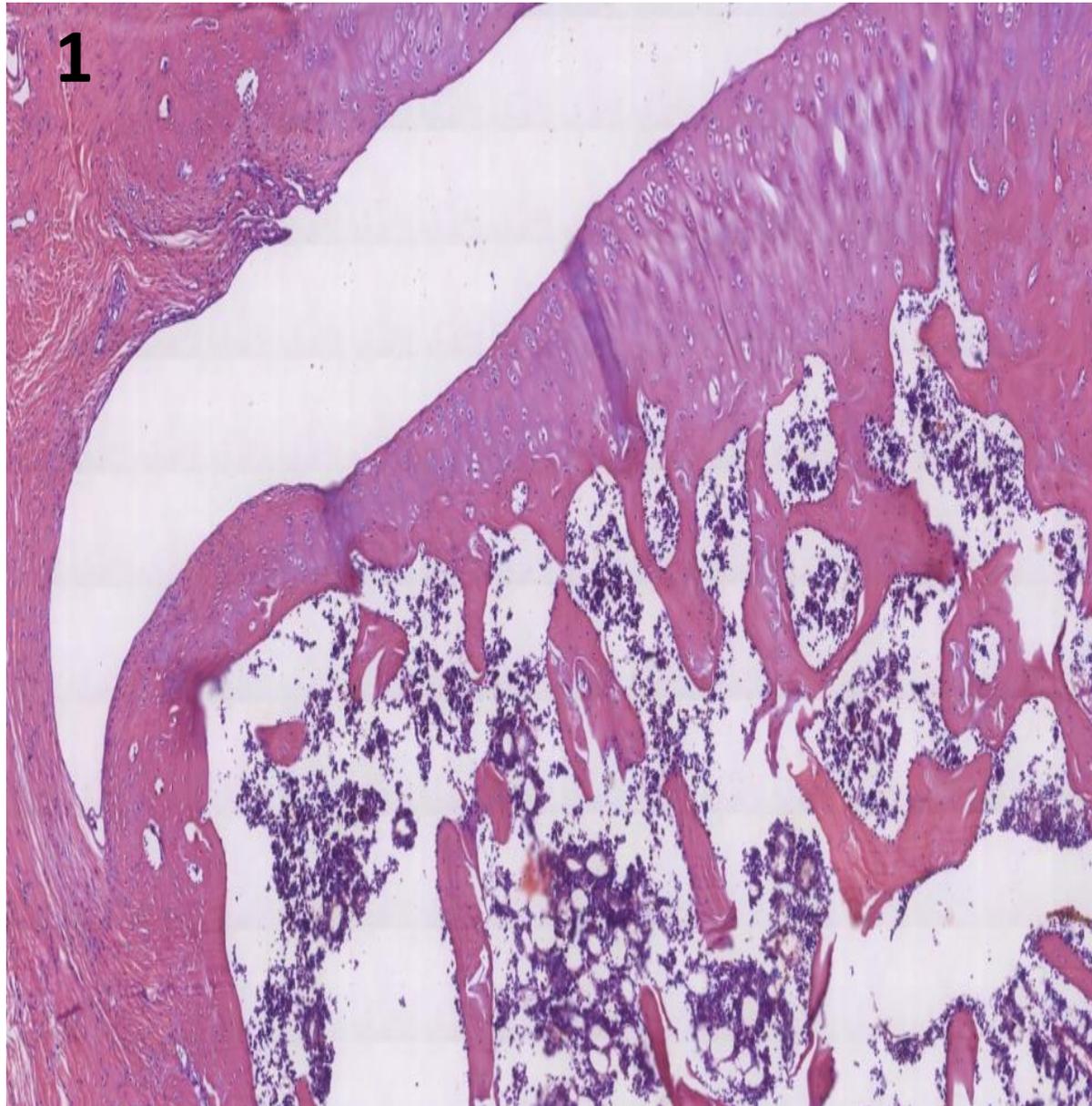


4

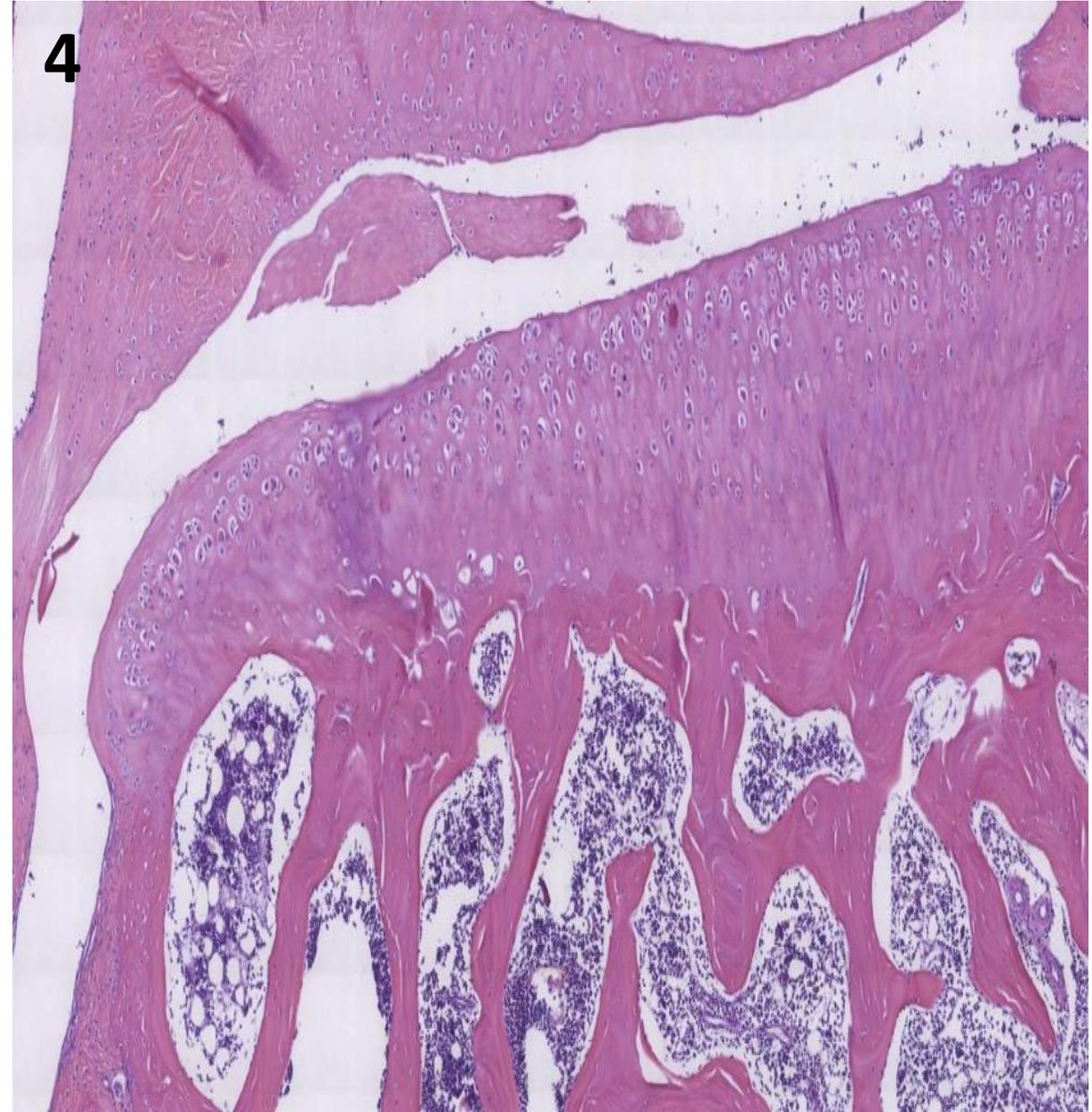
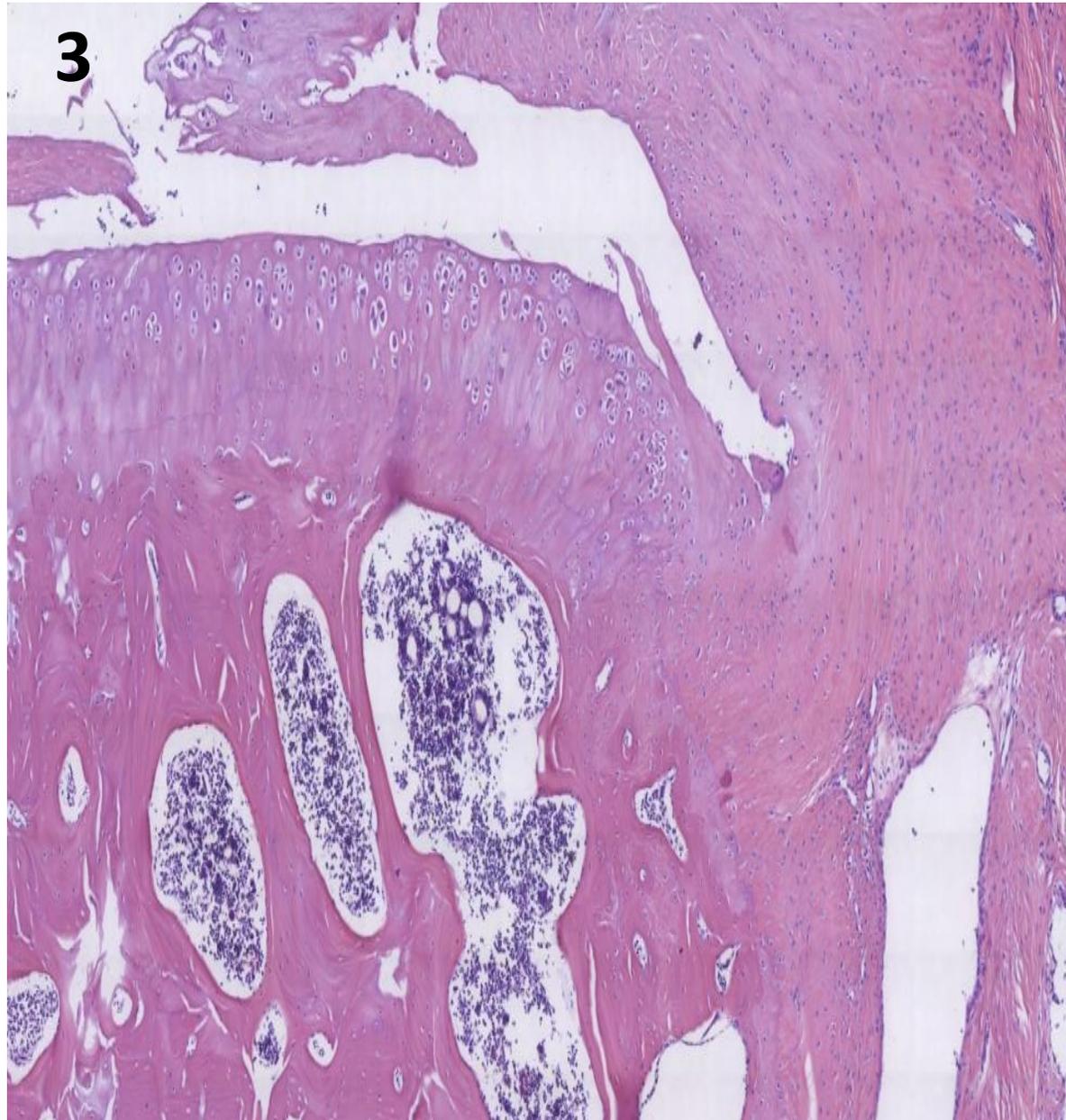


5

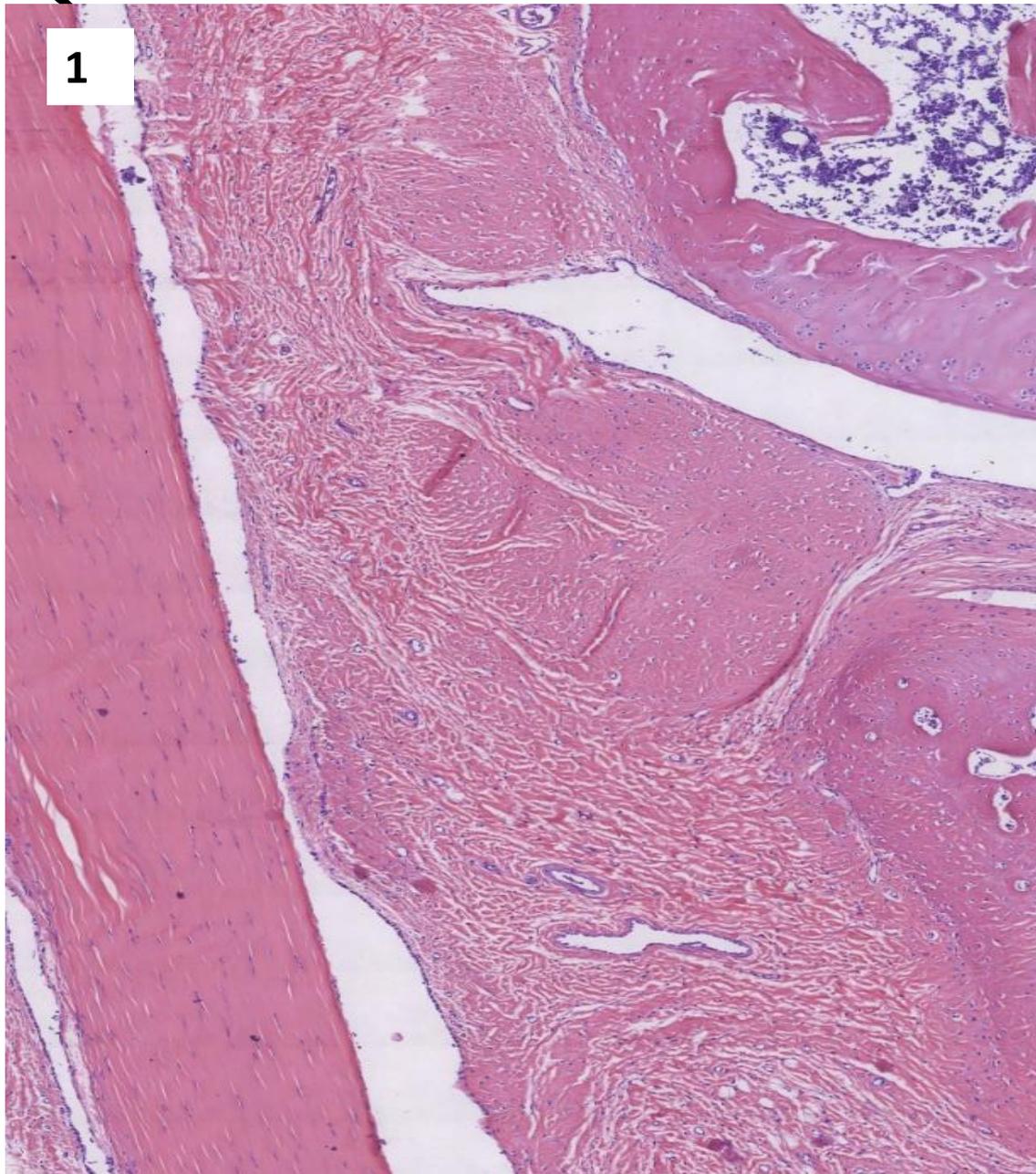
VOCÊ ESTÁ VENDENDO OSTEÓFITO?



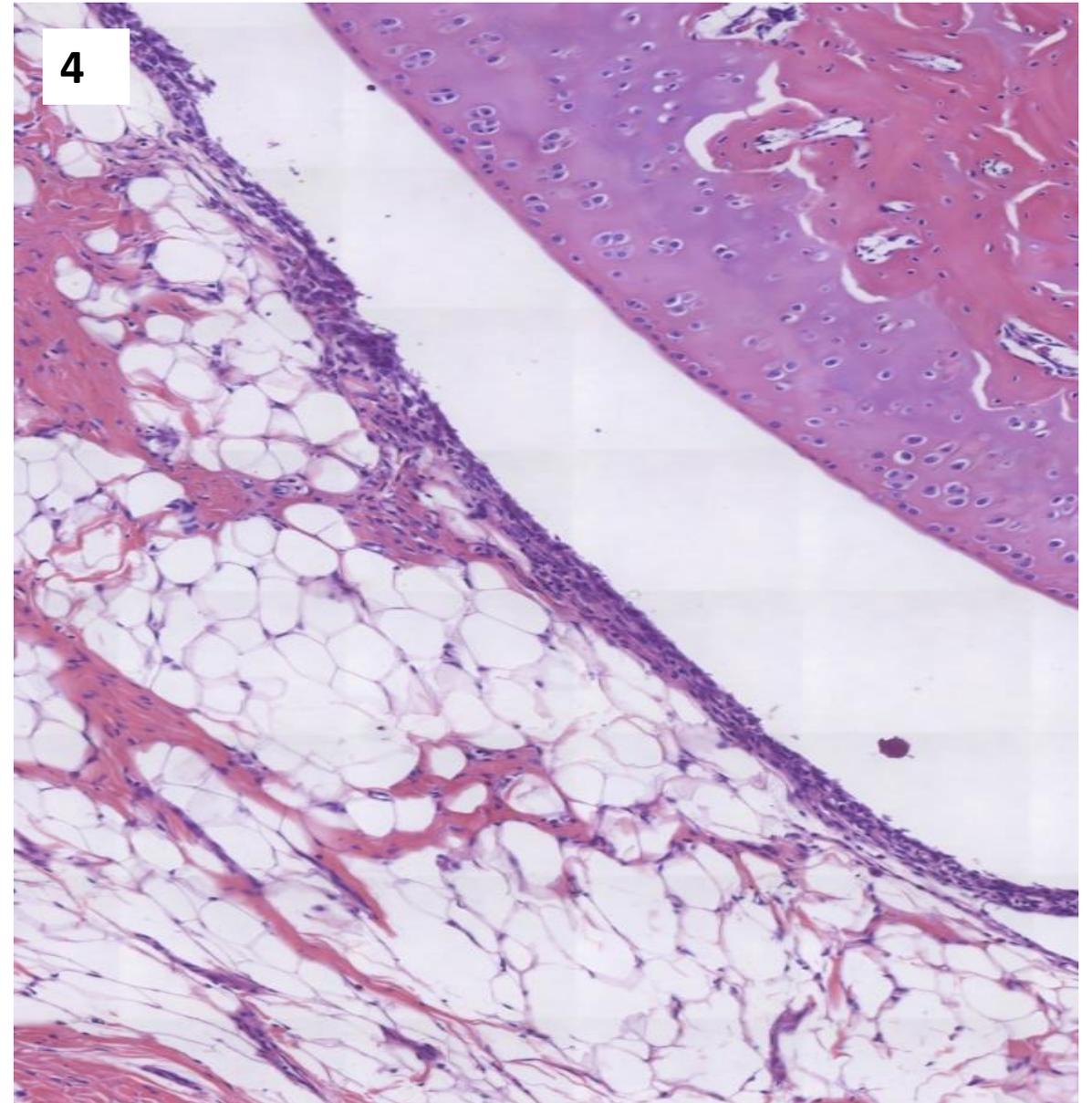
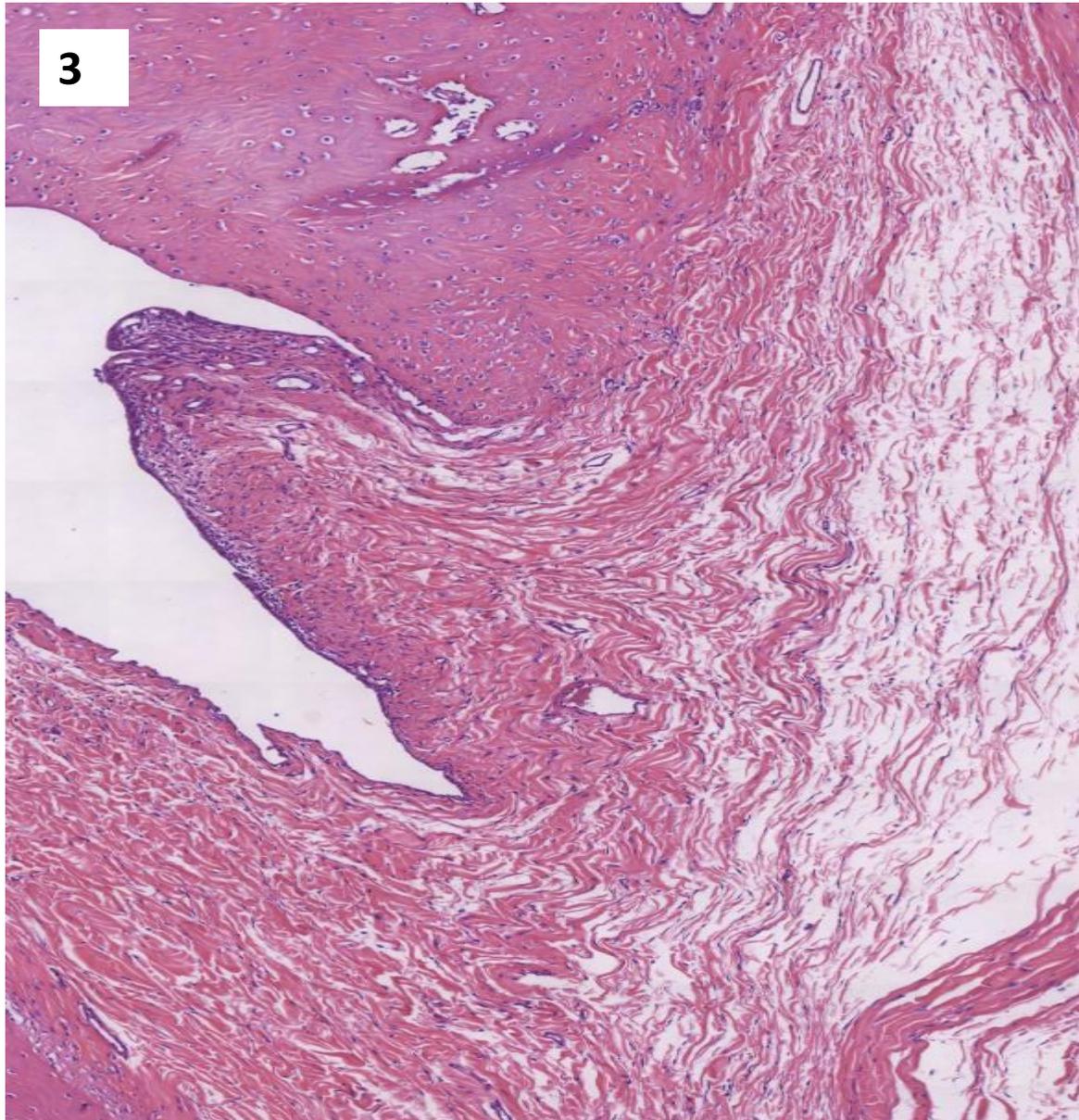
VOCÊ ESTÁ VENDENDO OSTEÓFITO?



O QUE VOCÊ VÊ NA MEMBRANA SINOVIAL?



O QUE VOCÊ VÊ NA MEMBRANA SINOVIAL?



O QUE VOCÊ VÊ NA MEMBRANA SINOVIAL?

