RENATA GABRIEL FONTINELE

Estudo morfoquantitativo e imunohistoquímico da cartilagem articular do joelho de ratos Wistar submetidos à restrição calórica no envelhecimento

São Paulo

2012

RENATA GABRIEL FONTINELE

Estudo morfoquantitativo e imunohistoquímico da cartilagem articular do joelho de ratos Wistar submetidos à restrição calórica no envelhecimento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
23/11/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2723
FMVZ

Fontinele, Renata Gabriel
Estudo morfoquantitativo e imunohistoquímico da cartilagem articular do joelho de ratos Wistar submetidos à restrição calórica no envelhecimento Renata Gabriel Fontinele. -- 2012.
98 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia. São Paulo. 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior.

1. Osteoartrose. 2. Envelhecimento. 3. Restrição calórica. 4. Cartilagem articular. 5. Ratos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo morfoquantitativo e imuno-histoquímico da cartilagem articular do joelho de ratos Wistar submetidos à restrição calórica no envelhecimento", protocolado sob o nº 2477/2011, utilizando 15 (quinze) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/3/2012.

We certify that the Research "Morfoquantitative and imunohistochemical study of the articular cartilage in the knee of Wistar rats submitted to caloric restriction at aging", protocol number 2477/2011, utilizing 15 (fifteen) rats, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/14/2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FONTINELE, Renata Gabriel

Título: **Estudo morfoquantitativo e imunohistoquímico da cartilagem articular do joelho de ratos Wistar submetidos à restrição calórica no envelhecimento**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

"Senhor, contigo o meu nada se faz tudo."

DEDICATÓRIA

Aos meus pais *Francisco das C. C. Fontinele* e *Adelina da C. G.C.Fontinele*. Muito obrigada!
Os ensinamentos, a educação, a dedicação, o apoio, a confiança, o carinho, a preocupação e o amor que me deram tornaram isso possível! Vocês representam tudo que sou!
Amo vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador *Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior,* por todos os ensinamentos, incentivo, apoio, respeito e confiança. Muito obrigada por acreditar em mim!

Ao *Prof. Dr. Romeu Rodrigues de Sousa,* pelo incentivo e carinho.

Ao meu esposo, *Luciano D'Angelo* pela paciência, carinho, dedicação e compreensão.

Às minhas irmãs, *Daniela G. Fontinele* e *Camila G. Fontinele* ...sem palavras...família é tudo!

Aos meus cunhados, *William T. S. Filho* e *Everton Nunes* pelo apoio, incentivo e pela alegria contagiante.

Ao *"Feijão"*, que trouxe muita alegria nesse fim de tese.

À minha nova família, *D'Angelo*, em especial a *Magda* e *Vanderlei* por me acolherem como filha!

Aos queridos amigos *Andre Conrado, Fernanda Cardoso, Camila Ercolini, Juliana Ferrão, Marcos Nakagawa, Diogo Palermo e Joana Mona* por tudo! Trabalhamos muito, rimos, choramos e nos desesperamos juntos. Vocês foram fundamentais para essa conquista!

A *Prof. Dra.* e amiga *Renata de Britto Mari*, por tornar essa tese possível e por toda a ajuda.

Ao *Prof. Dr. Luis Mochizuki,* por toda a ajuda, atenção e paciência

AGRADECIMENTOS

A *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, pela oportunidade de aprimoramento científico.

A *Prof. Dra. Maria Angélica Miglino* pela confiança, ensinamentos e por disponibilizar o uso do Laboratório de Histologia e Embriologia. Muito obrigada!

Aos técnicos e amigos do Laboratório de Histologia e Embriologia, *Prof. Dra. Rose Eli Grassi e Ronaldo Agostinho da Silva*. Obrigada pela força!

Aos colegas do LTIAM pelo incentivo e compreensão.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, em especial ao *Prof. Dr. Francisco Javier H. Blasquez* pela disposição em ajudar sempre.

As minhas avós *Sra. Carminda Camila* e *Sra. Maria Regina* C. *Fontinele* (em memória), ao meu avô *Sr. Henrique Augusto Gabriel* (em memória) pelo começo dessa história...e pelo amor.

As minhas tias *Maria de Fátima Gabriel* e *Maria da Salete Fontinele*, a minha prima *Maise J. Oliveira* e ao meu primo *Marcio P. Oliveira* por todo incentivo e carinho.

Ao amigo de pós-graduação *Thiago Aloia*, por toda a ajuda na parte de imunohistoquímica. Muito obrigada!

A todos os *colegas de pós-graduação* pela amizade.

Aos técnicos do setor de Anatomia, *Ednaldo Ribas Farias (Indio), João do Carmo Freitas, Raimundo Leal de Sousa, José Augusto Eulálio, Natalia Garcia de Andrade (Branca) e Fatima Minari*, pelo carinho, respeito e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, *Jaqueline Martins de Santana* e *Maicon Barbosa da Silva* pela ajuda e carinho.

As funcionárias da secretaria de pós-graduação, *Claudia Lima, Deise Maria Alves Flexa* e *Joana Ferreira Dias Vasconcelos.*

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial a *Elza Maria R. B. Faquim*, pela colaboração e correção desta dissertação.

A todos os meus professores da graduação, pela "base" que me deram em especial à *Prof. Dra. Laura Beatriz Mesiano Maifrino.* e *Prof. Dra Eliane Florêncio Gama*, por toda atenção e carinho dispensado a mim sempre.

RESUMO

FONTINELE, R. G. **Estudo morfoquantitativo e imunohistoquímico da cartilagem articular do joelho de ratos Wistar submetidos à restrição calórica no envelhecimento.** [The morfoquantitative and imunohistochemistry study in the articular cartilage in the knee of Wistar rats submitted to caloric restriction in the aging]. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A doença degenerativa da cartilagem articular, ou osteoartrose, pode ser causada por diversos fatores, dentre eles o envelhecimento. Com o aumento da longevidade no Brasil, a prevalência da osteoartrose vai aumentar com o aumento progressivo da idade média da população nas próximas décadas. O estresse do dia a dia, com o avanço da vida moderna, são acompanhados pela má alimentação, sendo essa caracterizada por uma subnutrição ou até uma nutrição excessiva. Utilizando ratos Wistar, como modelo experimental, o objetivo deste trabalho é verificar se a alimentação com baixo nível calórico ameniza ou acelera as alterações na estrutura da cartilagem articular das epífises distal do fêmur e proximal da tíbia, causadas pelo envelhecimento. Para tanto foram utilizadas 15 ratos, separados em três grupos, com 5 animais cada: C- animais de 06 meses alimentados com dieta normal (A); SR- animais de 18 meses alimentados dieta normal (A); RC- animais de 18 meses submetidos à restrição calórica de 31% alimentados com dieta B. A avaliação foi realizada pela microscopia de luz em cortes histológicos corados pela Hematoxilina-Eosina, Picrossírius e por imunohistoquímica com marcação do colágeno tipo II. Foram feitas medidas da espessura das zonas da cartilagem articular, contado o número de condrócitos por área, determinados os volumes dos núcleos dos condrócitos, a morfometria do colágeno, a identificação dos tipos de colágeno e a análise imunohistoquímica. Os resultados mostram que os animais do grupo RC ganharam massa corpórea de maneira significativamente mais lenta que os do SR a partir dos 8 meses. Os animais do SR apresentaram na tíbia, aumento da espessura total bicondilar provocado pelo aumento da zona profunda, aumento do número de condrócitos no côndilo lateral, manutenção do volume dos núcleos e da proporção volumétrica de colágeno, marcação mais heterogenea do colágeno tipo II no côndilo lateral, predominância desse tipo de fibras na zona média do côndilo medial. No fêmur os animais do SR mostraram diminuição da espessura total bicondilar provocada pela diminuição da zona profunda, sendo menor no côndilo medial, diminuição do número de condrócitos causado por diminuição da zona profunda, sendo menor no côndilo medial, diminuição do volume total dos núcleos dos condrócitos no côndilo medial, diminuição da proporção volumétrica do colágeno bicondilar, marcação heterogênea

do colágeno tipo II, predomínio desse tipo de fibras nas zonas média e profunda bicondilar. Os animais do RC apresentaram na tíbia, manutenção da espessura, aumento do número de condrócitos bicondilar, manutenção do volume nuclear, aumento da densidade de colágeno, marcação menos heterogênea do colágeno tipo II no côndilo lateral, predominância desse tipo de fibras nas zonas média e profunda do côndilo lateral. No fêmur, os animais do RC mostraram aumento da espessura total pelo aumento da zona profunda no côndilo medial, aumento do número de condrócitos pelo aumento da zona profunda, sendo maior no côndilo medial, aumento do volume total dos núcleos dos condrócitos bicondilar, aumento da proporção volumétrica de fibras colágenas no côndilo medial, marcação heterogênea do colágeno tipo II e predomínio desse tipo de fibras nas três zonas da cartilagem. Dessa maneira, concluímos que os efeitos do envelhecimento e da restrição calórica são diferentes nas cartilagens articulares da tíbia e do fêmur. As alterações naturais do envelhecimento são amenizadas pela restrição calórica na cartilagem articular do fêmur, porém na cartilagem articular da tíbia, essas alterações são compatíveis com início de doença degnerativa sendo intensificadas pela restrição com sinias de avanço de osteoartrose.

Palavras-chave: Osteoartrose. Envelhecimento. Restrição calórica. Cartilagem articular. Ratos.

ABSTRACT

FONTINELE, R. G. **The morfoquantitative and imunohistochemistry study in the articular cartilage in the knee of Wistar rats submitted to caloric restriction in the aging.** [Estudo morfoquantitativo e imunohistoquímico da cartilagem articular do joelho de ratos Wistar submetidos à restrição calórica no envelhecimento]. 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A degenerative disease of articular cartilage, or osteoarthritis, can be caused by several factors, including aging. With increased longevity in Brazil, the prevalence of osteoarthritis will increase with the progressive increase of the average age of the population in the coming decades. The stress of everyday life, with the advance of modern life, are accompanied by poor diet, this being characterized by malnutrition or even excessive nutrition. Using Wistar rats as experimental model, the aim of this work is to verify if feeding with low calorie softens or accelerates changes in the structure of articular cartilage of the epiphysis of the distal femur and proximal tibia, caused by aging. For this purpose were used 15 rats divided into three groups with five animals each: C, 6 month animals fed with normal diet (A), SR-18 month animals fed with normal diet (A), RC-18 month animals submitted to calorie restriction of 31% fed with diet B. The evaluation was performed by light microscopy in histological sections stained with Hematoxylin-Eosin, Picrossirius and by immunohistochemistry with tagging of type II collagen. Measurements were made of thick zones of articular cartilage, counted the number of chondrocytes per area, the volumes of certain nuclei of chondrocytes, collagen morphometry, the identification of the types of collagen and immunohistochemical analysis. The results show that the RC group animals gained body mass significantly slower than the SR from 8 months. The SR animals showed increasing of total thickness bicondylar of the tibia caused by the increase in the deep zone, increasing of the number of chondrocytes in the lateral condyle, maintaining the volume of the cores and the volumetric proportion of collagen, the most heterogeneous labeling of type II collagen in the lateral condyle, predominance of such fibers in the middle zone of the medial condyle. In the femur the SR animals showed decreased of total bicondylar thickness caused by the decrease of deep zone, being lower in the medial condyle, decreasing the number of chondrocytes caused by decreased deep zone, being lower in the medial condyle, decreased total volume of nuclei chondrocytes in the medial condyle, decreased volumetric proportion of collagen bicondylar, marking heterogeneous collagen type II predominance of such fibers in the middle and deep zones bicondylar. The RC animals showed in the tibia, maintaining thickness, increasing the

number of chondrocytes bicondylar, maintenance of nuclear volume, increased collagen density, less heterogeneous marking of type II collagen in the lateral condyle, the predominance of this type of fiber areas and average deep lateral condyle. In the femur, the animals RC showed increased of total thickness caused by increasing of the medial condyle deep zone, increasing the number of chondrocytes by increasing the deep zone, being greater in the medial condyle, increasing the total volume of the nuclei of chondrocytes bicondylar, increased volumetric proportion of collagen fibers in the medial condyle, heterogeneous marking of type II collagen and prevalence of this type of fiber in the three zones of cartilage. Thus, we conclude that the effects of aging and caloric restriction are different in the articular cartilage of the tibia and femur. The natural changes of aging are attenuated by caloric restriction in the articular cartilage of the femur, but in the articular cartilage of the tibia, these changes are consistent with early degenerative disease being intensified by restriction with signs of advanced osteoarthritis.

Keywords: Osteoarthritis. Aging. Caloric restriction. Articular cartilage. Rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Médias das pesagens obtidas mensalmente durante o período experimental (12 meses) para os animais dos grupos SR.....46

Gráfico 2 – Médias das pesagens obtidas mensalmente durante o período experimental (12 meses) para os animais dos grupos RC.....47

Gráfico 3 - Os dados mostram a proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular por área nos côndilos lateral e medial da tíbia entre os diferentes grupos avaliados (Controle – C; Sem restrição – SR; Restrição calórica – RC).....61

Gráfico 4 – Os dados mostram a proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular por área nos côndilos lateral e medial da tíbia entre os diferentes grupos avaliados (Controle – C; Sem restrição – SR; Restrição calórica – RC).....62

Figura 2– Cortes histológicos da cartilagem articular da tíbia mostrando as zonas superficial (S), média (M), profunda (P) e calcificada (*), o aspecto dos condrócitos (seta preta) nas lacunas e a tidemark (seta amarela) nos três grupos estudados (C, SR e RC) HE. 49

Figura 3 – Cortes histológicos da cartilagem articular do fêmur mostrando mostrando as zonas superficial (S), média (M), profunda (P) e calcificada (*), o aspecto dos condrócitos (seta preta) nas lacunas e a tidemark (seta amarela) nos três grupos estudados (C, SR e RC) HE.....51

Figura 4 - Cortes histológicos da cartilagem articular da tíbia mostrando a distribuição das fibras colágenas nas zonas da cartilagem nos três grupos estudados (C, SR e RC); Estrela (Osso subcondral –OS) Picrosirius.....64

Figura 5 – Cortes histológicos da cartilagem articular do fêmur mostrando a distribuição das fibras colágenas nas zonas da cartilagem nos três grupos estudados (C, SR e RC); Estrela (Osso subcondral –OS) Picrosirius.....67

Figura 6 - Cortes histológicos da cartilagem articular da tíbia mostrando a marcação do colágeno tipo II em bege (*) por Imunohistoquímica, nos três grupos estudados (C, SR e RC).....70

Figura 7 - Cortes histológicos da cartilagem articular do fêmur mostrando a marcação do colágeno tipo II em bege (*) por Imunohistoquímica, nos três grupos estudados (C, SR e RC).....72

Tabela 3 - Demonstrativo das médias das espessuras das zonas da cartilagem articular da epífise proximal da tíbia nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística.....50

Tabela 4- Demonstrativo das médias das espessuras da cartilagem articular da epífise distal do fêmur nos diferentes grupos avaliados seguidas pela significância estatística.....53

Tabela 5 - Demonstrativo das médias das espessuras das zonas da cartilagem articular da epífise distal do fêmur nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância e estatística.....53

Tabela 6- Demonstrativo das médias do número de condrócitos da cartilagem articular da epífise proximal da tíbia nos diferentes grupos avaliados seguidas pela significância estatística.....55

Tabela 7 - Demonstrativo das médias do número de condrócitos das zonas da cartilagem articular da epífise proximal da tíbia nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística.....55

Tabela 8 - Demonstrativo das médias do número de condrócitos das zonas da cartilagem articular da epífise distal do fêmur nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística.....57

Tabela 9 - Demonstrativo das médias do volume dos núcleos dos condrócitos nas zonas da cartilagem articular da epífise proximal da tíbia nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística.....58

Tabela 10 - Demonstrativo das médias do volume dos núcleos dos condrócitos nas zonas da cartilagem articular da epífise distal do fêmur nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística.....60

Anexo A - Tabela 1 – Composição percentual e química das dietas experimentais de acordo com os níveis de energia.....93

Anexo B – Figura 1- Demonstração das zonas da cartilagem articular em comparativo entre esquema e corte histológico.....94

Apêndice A - Tabela 2 – Médias das pesagens, seguidas pela significância estatística 95

Apêndice B – Tabela 11 - Demonstrativo das médias da proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular por área nos côndilos lateral e medial da tíbia entre os diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística 96

Apêndice C - Tabela 12 - Demonstrativo das médias da proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular por área nos côndilos lateral e medial do fêmur entre os diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística.....97

Apêndice D– Tabela 13- Análise qualitativa demonstrando os dados referentes aos tipos de colágeno encontrados ao longo das zonas superficial, média e profunda (ZS, ZM, ZP) da cartilagem articular da tíbia e do fêmur, relacionados com a imunohistoquímica nos três grupos estudados.....98

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**.....18

2 **OBJETIVOS** 23

3 **REVISÃO DA LITERATURA** 25

3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS CARTILAGENS ARTICULARES 25

3.2 PROCESSO DE ENVELHECIMENTO ARTICULAR 29

3.3 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA SOBRE A CARTILAGEM ARTICULAR E OUTRAS ESTRUTURAS CORPORAIS 33

4 **MATERIAIS E MÉTODOS**.....37

4.1 ANIMAIS 37

4.2 ELABORAÇÃO DA DIETA 38

4.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS 38

4.4 MICROSCOPIA DE LUZ 38

4.4.1 **Preparação do Material para Análise ao Microscópio de Luz** 39

4.4.2 **Análise Morfométrica** 40

4.4.2.1 **Análise da Espessura das Zonas (camadas) da Cartilagem Articular** 40

4.4.2.2 **Análise da Densidade Numérica de Condrócitos** 41

4.4.2.3 **Determinação do Volume dos Núcleos dos Condrócitos** 41

4.4.2.4 **Morfometria do Colágeno** 42

4.4.2.5 **Identificação dos Tipos de Colágeno** 42

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA.....43

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....43

5 **RESULTADOS**.....46

5.1 VARIAÇÃO DA MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS..... 46

5.2 ANÁLISE DA ESPESSURA DAS ZONAS (CAMADAS) DA CARTILAGEM ARTICULAR 48

5.2.1 **Tíbia**.....48

5.2.2 **Fêmur**.....51

5.3 ANÁLISE DA DENSIDADE NUMÉRICA DE CONDRÓCITOS.....54

5.3.1 **Tíbia**.....54

5.3.2 **Fêmur**.....56

5.4 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DOS NÚCLEOS DOS CONDRÓCITOS.....57

5.4.1 **Tíbia**.....58

5.4.2 **Fêmur**.....59

5.5 MORFOMETRIA DO COLÁGENO.....60

5.5.1 **Tíbia**.....61

5.5.2 **Fêmur**.....62

5.6 IDENTIGICAÇÃO DOS TIPOS DE COLÁGENO.....63

5.6.1 **Tíbia**.....63

5.6.2 **Fêmur**.....66

5.7 IMUNOHISTOQUÍMICA.....69

5.7.1 **Tíbia**.....69

5.7.2 **Fêmur**.....71

6 **DISCUSSÃO**.....75

7 **CONCLUSÕES**.....84

REFERÊNCIAS.....85

ANEXOS.....93

APÊNDICES.....95

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cartilagem articular, como o osso, é um componente importante na saúde e função do sistema musculoesquelético (ATHANASIOU et al., 2000; WANG et al., 2006).

É um tecido especializado que forma a sustentação da superfície das articulações sinoviais responsável por diminuir o atrito durante o movimento. (MAFFULI; KING, 1992; HUBER et al., 2000; DUDHIA, 2005). Contém apenas um tipo de célula (condrócitos) e uma matriz extracelular altamente organizada (MAFFULI; KING, 1992; HARDINGHAM et al., 2002) que funciona como uma barreira para microorganismos, protegendo as células contra a injúria esperada do uso normal da articulação, determinando os tipos e concentrações de moléculas que entram e ajudam na manutenção da forma dos condrócitos (BUKWALTER; MANKIN, 1998).

As propriedades físicas da cartilagem articular, dependem da estrutura e organização das macromoléculas da matriz (HARDINGHAM et al., 2002). Assim, a interação entre o condrócito e a matriz extracelular é de suma importância na regulação do desenvolvimento, manutenção e reparo da cartilagem articular (POOLE et al., 1992; BUKWALTER; MANKIN, 1998; CORVOL, 2000; HUBER et al., 2000).

Não possui vasos sanguíneos, nem inervação (HARDINGHAM et al., 2002; ODA, 2005; ECKSTEIN et al., 2006), logo mecanismos normais de reparo tecidual, envolvendo recrutamento celular para o local do dano, não ocorrem (HARDINGHAM et al., 2002).A doença degenerativa da cartilagem articular ou osteoartrose, está entre as causas mais comuns de dor, limitação funcional, rigidez, incapacidade e diminuição da qualidade de vida em indivíduos de meia idade e idosos (ATRA, 1995; NEWTON et al., 1997; AROKOSKI et al., 2000; BEAUPRÉ et al., 2000; FITZGERALD et al., 2002; GOLDRING; GOLDRING, 2007; FONTINELE, 2008). Tais danos parecem contribuir para a progressão da doença e incapacidade física (FITZGERALD et al., 2002).

A incidência desta doença aumenta com a idade (GOLDRING; GOLDRING, 2007) dentre outros fatores (SAXON, 1999; LEE; KEAN, 2012).

A forte correlação entre aumento da idade e a prevalência de osteoartrose, e evidências de importantes alterações relacionadas com a idade na função dos condrócitos como: diminuição da habilidade em responder a variados tipos de estímulos como fatores de crescimento (BUCWALTER; MANKIN, 1998) e diminuição da capacidade de manutenção da matriz (HUBER et al., 2000), sugerem que as mudanças decorrentes da idade na cartilagem articular, podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da doença (BUCWALTER; MANKIN, 1998).

As mudanças observadas na cartilagem articular durante o envelhecimento são atribuídas a alterações na organização estrutural da matriz extracelular. Estas mudanças incluem amolecimento da superfície articular, diminuição da resistência à tensão e endurecimento da matriz (GOLDRING; GOLDRING, 2007).

Dados do último censo demográfico mostram que a proporção de idosos na população brasileira passou de 4,8% em 1991 e 5,9% em 2000 para 7,4% em 2010. O crescimento absoluto da população do Brasil nestes últimos dez anos se deu principalmente em função do crescimento da população adulta, com destaque também para o aumento da participação da população idosa, uma vez que houve um contínuo declínio dos níveis de fecundidade acompanhado pela queda da mortalidade no período. A evolução da estrutura etária observada nos sugere também que, confirmadas as tendências esperadas de mortalidade e fecundidade, a população do Brasil tende a dar continuidade a esse processo de envelhecimento (IBGE, 2011).

O Envelhecimento resulta em um declínio progressivo de múltiplos órgãos, afetando funções reprodutivas, metabólicas, físicas e cognitivas e eventualmente na sobrevivência (FONTANA; KLEIN, 2007). Embora, através de mecanismos ainda não totalmente conhecidos, sabe-se que a ingestão calórica parece estar associada a mudanças nas funções de processos fisiológicos, hormonais, metabólicos e biomecânicos, podendo retardar ou acelerar o processo do envelhecimento (LUTZ, 1990; HART et al., 1999).

Segundo Felson (2009), como consequência do envelhecimento da população, as estimativas sugerem que o índice de osteoartrose de joelho irá dobrar entre 2000 e 2020.

A excessiva ingestão calórica é um fator de risco para diversas doenças crônicas (HURSTING et al, 2003; FONTANA; KLEIN, 2007), incluindo diabetes, hipertensão,

acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, Alzheimer (LOGROSCINO et al., 2007) e osteoartrose (SAXON et al., 1999; KERIN et al., 2002), diminuindo a expectativa de vida (FONTANA; KLEIN, 2007), sendo as maiores causas de incapacidade e morte nos países industrializados (MATTSON, 2005).

Sabe-se que a redução energética da dieta não acompanhada de desnutrição apresenta notáveis benefícios para saúde, podendo impedir o desenvolvimento de doenças nos idosos. (ATHANASIOU et al., 2000).

A restrição calórica, caracterizada pela redução de ingestão de calorias abaixo da ad libitum usual sem desnutrição (FONTANA; KLEIN, 2007), pode suprimir o desenvolvimento de várias doenças e aumentar a sobrevida em roedores, reduzindo o dano oxidativo e aumentando a resistência ao estresse (MATTSON, 2005).

A perda de peso parece ser um passo lógico no tratamento de osteoartrose de joelho de pacientes obesos, resultando em redução significativa da dor, melhora da função e da progressão da doença (LEE; KEAN, 2012).

Segundo Wang et al. (2006), modelos animais experimentais são altamente utilizados em pesquisas ortopédicas, para estudar a cartilagem articular saudável, doente e seu reparo. Para modelo de osteoartrose humana, comumente são utilizados grandes animais, porém esse tipo de modelo animal tem desvantagens como alto custo, assim como dificuldades e questões éticas envolvendo a manutenção e experimentação. Assim, o uso de ratos para estudar as propriedades da cartilagem articular é bem aceito por ser conveniente e cientificamente apropriado (GUERRA et al., 2004; WANG et al., 2006).

Foram encontrados diversos relatos na literatura sobre as alterações morfológicas e biomecânicas da cartilagem articular na juventude e no envelhecimento (HUDELMAIER et al., 2001; MARTIN; BUCKWALTER, 2002; GUERRA et al., 2004; DUDIA, 2005; BOGOSLAVSKY, 2006; HORTON, 2006; AIGNER et al., 2007; ODA et al., 2007), porém não encontramos informações a respeito dos efeitos da restrição calórica sobre as alterações morfológicas da cartilagem articular durante o envelhecimento. Os trabalhos encontrados focam apenas as alterações biomecânicas. Assim, o presente estudo visa detectar possíveis alterações morfológicas na cartilagem articular de joelhos de ratos submetidos à restrição calórica durante o envelhecimento.

A importância desse estudo seria analisar os efeitos da alimentação com caloria reduzida sobre a cartilagem articular de ratos adultos e, também, no processo de envelhecimento, visando a melhora na alimentação, a prevenção da osteoartrose, buscando a melhora da qualidade de vida em idosos e, também, a diminuição de gastos do país com o tratamento doenças degenerativas da cartilagem articular.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- Verificar as alterações que ocorrem na cartilagem articular da epífise distal do fêmur e proximal da tíbia, no processo de envelhecimento.
- Verificar se a ingestão de dieta com caloria reduzida é capaz de influenciar a espessura da cartilagem, a densidade numérica dos condrócitos, o volume dos núcleos dos condrócitos, a morfometria do colágeno e a identificação dos tipos de colágeno, em especial o colágeno tipo II, na cartilagem articular da epífise distal do fêmur e proximal da tíbia.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capitulo será apresentada revisão da literatura sobre o tema, cujos tópicos serão abordados na seguinte ordem: características estruturais das cartilagens articulares, alterações da cartilagem articular devidas ao envelhecimento, efeitos da restrição calórica sobre a cartilagem articular e outras estruturas corporais.

3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS CARTILAGENS ARTICULARES

O tecido cartilaginoso é um tipo especializado de tecido conjuntivo. A cartilagem articular, que reveste as superfícies dos ossos nas articulações sinoviais tem origem a partir de moldes de cartilagem hialina. Quando ocorre a maturidade esquelética, a cartilagem articular é o único indício do molde de cartilagem original e persiste durante toda a vida adulta (HUBER et al., 2000).

É um tecido aparentemente simples que contém apenas um tipo de célula (condrócitos). No entanto tem uma matriz extracelular altamente organizada (MAFFULI; KING, 1992; HARDINGHAM et al., 2002).

Os condrócitos possuem uma baixa atividade metabólica, sobrevivendo em condições de relativa hipóxia e ausência de suprimento vascular, possuindo baixa capacidade regenerativa (GOLDRING; GOLDRING, 2007; HATTORI et al., 2007). Essas células regulam a matriz através de um balanço sincronizado entre anabolismo e catabolismo (KUETTNER et al., 1991). Evidências indicam que a renovação da matriz depende da habilidade dos condrócitos em detectar alterações na composição macromolecular e organização da matriz, incluindo a presença de moléculas degradadas, e a resposta através da síntese de tipos e quantidades de novas moléculas (BUKWALTER; MANKIN, 1998).

A forma e a concentração volumétrica dos condrócitos muda em função da profundidade na cartilagem articular. Uma determinada forma do condrócito produz diferentes efeitos nas propriedades dependendo da estrutura da rede de fibras colágenas. Assim a forma e a concentração de condrócitos, parecem estar relacionadas com a estabilidade mecânica da matriz (WU; HERZOG, 2002).

A capacidade da cartilagem sofrer deformação reversível depende da organização estrutural, incluindo o específico arranjo das macromoléculas da matriz e dos condrócitos (HUBER et al., 2000).

A matriz extracelular da cartilagem articular tem 60% de seu volume total representado pela água, enquanto a matriz orgânica é composta principalmente por fibras colágenas tipo II (80 – 90%), VI, IX, X e Xl, proteoglicanas, (MAFFULI; KING, 1992; WANG et al., 2006; CAIRNS et al., 2010) e proteínas não colágenas (MOLLENHAUER et al., 1984; MAFFULI; KING, 1992; HARDINGHAM et al., 1994; BUCKWALTER; MANKIN, 1998; CULAV et al., 1999; HUBER et al., 2000; KIM et al., 2001; HARDINGHAM et al., 2002; ODA, 2005).

As fibrilas colágenas garantem à cartilagem articular, resistência a forças de tensão (CAIRNS et al., 2010). Sua arquitetura a protege contra danos mecânicos, diminuindo o atrito entre as superfícies durante o movimento (ECKSTEIN et al., 2006).

As proteoglicanas são compostas por uma proteína central ligada a cadeias de glicosaminoglicanas e oligossacarídeos (POOLE et al., 1986). As proteoglicanas como o agrecan e o versican, são vinculadas a grandes quantidades de glicosaminoglicanas, que são carregadas negativamente, garantindo à cartilagem resistência a compressão. (BUCKWALTER; MANKIN, 1998; CULAV et al., 1999; POOLE et al., 2001; HARDINGHAM et al., 2002; CAIRNS et al., 2010), enquanto as proteínas não colágenas, parecem influenciar nas interações entre os condrócitos e a matriz (BUCKWALTER; MANKIN, 1998; CULAV et al., 1999; POOLE et al., 2001).

Baseado no arranjo das fibras colágenas da matriz e nas características morfológicas dos condrócitos nos cortes perpendiculares à superfície, a cartilagem articular é dividida em quatro zonas (I, II, III e IV). Na zona I ou superficial (ZS) os condrócitos são achatados e relativamente pequenos. Tanto os condrócitos quanto as

fibras colágenas são dispostos paralelamente à superfície articular. A zona II ou média (ZM) apresenta condrócitos arredondados, sendo assim como o colágeno, dispostos de maneira desorganizada. Na zona III ou profunda (ZP) os condrócitos formam colunas perpendiculares à superfície. As fibras colágenas também são configuradas perpendicularmente à superfície articular. A zona IV ou calcificada é caracterizada por extensa mineralização da matriz. É separada da zona III por uma linha basofílica (tidemark) (CASTANO et al., 1995; ODA et al., 2007).

A combinação das proteoglicanas da matriz, orientação das fibras colágenas e forma dos condrócitos, estão intimamente ligadas e são adaptadas para otimizar a estabilidade mecânica e a capacidade de suportar peso da estrutura (WU; HERZOG, 2002).

Áreas que são regularmente sujeitas a altos níveis de estresse, como por exemplo, os côndilos femorais, apresentam alto grau de orientação de colágeno e espessamento da zona superficial da cartilagem articular (AROKOSKI et al., 2000).

Ainda não há um consenso sobre a relação entre quantidade de proteoglicanas e áreas de maior ou menor estresse na cartilagem articular. Segundo Kerin et al. (2002), áreas nas articulações que sofrem grandes forças durante a locomoção, geralmente tem maior quantidade de proteoglicanas comparado com a cartilagem adjacente com menor estresse, porém, segundo Arokoski et al. (2000), locais que apenas suportam descarga de peso, como por exemplo o platô tibial, são ricos em proteoglicanas.

Mudanças no colágeno, proteoglicanas ou na água, influenciam a funcionalidade da cartilagem articular (ATHANASIOU et al., 2000).

A osteoartrose é uma doença crônica degenerativa da cartilagem articular (AROKOSKI et al., 2000; GUERRA et al., 2004; GOLDRING; GOLDRING, 2007). Em geral, é expressa como a incapacidade metabólica e mecânica funcional da cartilagem hialina, resultante em dor e disfunção articular (LEE; KEAN, 2012). Diferente da artrite reumatoide, não é uma condição sistêmica, mesmo em casos de múltiplas articulações envolvidas (SAXON et al., 1999). Pode ser causada por diversos fatores como a pós-menopausa, ocasionada por baixos níveis de estrógeno (WLUKA et al., 2004; FONTINELE, 2008), hereditariedade (SAXON et al., 1999; WLUKA et al.,

2004; GOLDRING; GOLDRING, 2007), trabalhos que envolvam movimentos repetitivos (SAXON et al., 1999), envelhecimento (FELSON et al., 1988; BEAUPRÉ et al., 2000; MARTIN; BUCKWALTER, 2002; KERIN, 2002; GUERRA et al., 2004; WANG et al., 2006; GOLDRING; GOLDRING, 2007) e obesidade que afeta principalmente o joelho (FELSON et al., 1988; SAXON et al., 1999; KERIN et al., 2002; LEE; KEAN, 2012).

As cartilagens articulares que mais sofrem com a osteoartrose são a proximal da tíbia, distal do fêmur e superfície patelofemoral (KERIN, et al., 2002). Outros locais mais comumente afetados são as mãos, quadris e coluna (GOLDRING; GOLDRING, 2007). Segundo Felson et al. (1988), a osteoartrose do joelho representa grande custo social e está associada a maior incapacidade do que qualquer outra articulação.

As mudanças mais proeminentes na cartilagem com o avanço da osteoartrose são fibrilação superficial, hipertrofia da cartilagem articular, ocasional destruição da superfície articular (GUERRA et al., 2004) e amolecimento (HORTON et al., 2006). Em nível microscópico, segundo Dahlberg et al. (1994), em casos de patologia articular ocorrem mudanças significativas nas concentrações de moléculas da cartilagem. Há evidências de fendas e morte de condrócitos. Além dessas mudanças estruturais, ocorrem também alterações bioquímicas na estrutura das proteoglicanas e também diminuição dessa célula. Alterações na quantidade e forma das proteoglicanas geram profundas consequências no perfil de hidratação da cartilagem. Apesar de haver um aumento global no teor de água, a água não está fixada à carga negativa das cadeias laterais de glicosaminoglicanas, resultando numa diminuição da pressão hidrostática da cartilagem (HORTON et al., 2006).

As mudanças nas proteoglicanas da cartilagem parecem preceder a mudanças no colágeno durante a progressão de osteoartrose. Eventualmente a rede de colágeno é interrompida, resultando em uma diminuição da força e resistência à tensão (HORTON et al., 2006). Segundo Avery e Bailey (2005), diferente do osso, da pele e do tendão, a renovação do colágeno da cartilagem articular é muito lento.

Nos primeiros estágios da doença, há evidências de aumento da atividade sintética, vista como uma tentativa de regenerar a matriz com alguns componentes específicos,

incluindo colágeno tipo II e o agrecan (GOLDRING; GOLDRING, 2007). Antes da deterioração da superfície da cartilagem, nota-se uma diminuição da concentração superficial de proteoglicanas, aumento da quantidade de água e separação e desorganização das fibras colágenas superficias. O avanço da patologia é acompanhado de perda importante e dano das fibras colágenas tipo II e perda de proteoglicanas (AROKOSKI et al., 2000). Degradação de proteoglicanas e colágeno levam a diminuição da rigidez da cartilagem (ARMSTRONG; MOW, 1982; KEMPSON et al., 1971; AROKOSKI et al., 2000; ECKSTEIN et al., 2006).

As mudanças no colágeno dependem das forças que atuam sobre a cartilagem que influenciam a remodelação e reorientação das fibrilas colágenas da cartilagem (ROTH; MOW, 1980).

As mudanças nas propriedades funcionais e a falência da cartilagem nos casos de osteoartrose são resultado das mudanças na degradação, síntese, estrutura e interação entre as macromoléculas da matriz (LOHMANDER et al., 1999). Segundo Lohmander et al. (1996), ocorre uma aumento da síntese de colágeno tipo II a longo prazo, durante o desenvolvimento de osteoartrose.

3.2 PROCESSO DE ENVELHECIMENTO ARTICULAR

A expectativa de vida, que é definida como a idade que 50% da população sobrevive após o nascimento, aumentou acentuadamente na maioria dos países desenvolvidos no último século. Esse aumento é devido primeiramente ao saneamento básico, melhoria da higiene, redução da mortalidade infantil, desenvolvimento de vacinas e antibióticos e melhoria nos cuidados a saúde (FONTANA; KLEIN, 2007). Com o envelhecimento da população mundial e o aumento da proporção de pessoas com mais de 60 anos, a prevalência de osteoartrose, incluindo a de joelho, também aumenta (LEE; KEAN, 2012).

Desta maneira, torna-se imprescindível uma adaptação da sociedade a essa nova realidade, possibilitando melhor qualidade de vida para os idosos, atendendo

principalmente suas necessidades na área de saúde, uma vez que os maiores gastos com a saúde ocorrem nos últimos anos de vida (WICK et al., 2000).

O envelhecimento resulta em um progressivo declínio de múltiplos órgãos e sistemas, afetando as funções reprodutiva, metabólica, física, cognitiva e eventualmente a sobrevivência **(**FONTANA; KLEIN, 2007).

O envelhecimento, além das características exteriores, é acompanhado de outras alterações como perda de força muscular, osteoporose, redução da flexibilidade articular, coordenação motora, equilíbrio, o que repercute inclusive no desempenho social do idoso, expondo-o a risco de quedas, entorses, fraturas com grande facilidade, proporcionando até mesmo risco de vida (BOGOSLAVSKY, 2006).

A maioria dos indivíduos com mais de 65 anos, apresentam evidencias clínicas ou radiográficas de osteoartrose (GOLDRING; GOLDRING, 2007).

Atualmente acredita-se que os fatores de risco para o desenvolvimento de osteoartrose estejam envolvidos em dois mecanismos fundamentais: Efeitos de forças “anormais” na cartilagem “normal” ou efeitos de forças “normais” em cartilagem “anormal”. O envelhecimento vem sendo considerado como fator primário contribuindo para esse estado “anormal” da cartilagem (HORTON et al., 2006; GOLDRING; GOLDRING, 2007).

Claramente os condrócitos apresentam papel principal nas mudanças que ocorrem tanto no envelhecimento, quanto na osteoartrose. Alternativamente, teorias relacionadas com alterações programadas dos condrócitos que requerem tempo para se manifestar ganharam aceitação. Por exemplo, perda de condrócitos funcionais por apoptoses ou outras formas de morte celular programada podem tornar a cartilagem mais vulnerável a doenças degenerativas (ADAMS; HORTON, 1998; HORTON et al., 2006).

A manutenção da longa vida da cartilagem articular depende da habilidade dos condrócitos em repor as macromoléculas degradadas da matriz extracelular. A associação entre envelhecimento e o desenvolvimento de osteoartrose, pode estar relacionada com o envelhecimento dos condrócitos, que apresentam um declínio na habilidade de manutenção da cartilagem articular, ou seja, com o avanço da idade, há

uma maior probabilidade do desenvolvimento de osteoartrose, pois os condrócitos perdem sua capacidade de repor a matriz extracelular (HUBER et al., 2000; MARTIN; BUCKWALTER, 2002).

Segundo Horton et al. (2006), algumas mudanças na cartilagem articular são consequências inevitáveis do envelhecimento, incluindo suave fibrilação e amolecimento da superfície da cartilagem, e perda global da resistência e rigidez da matriz. Esses tipos de mudanças podem estar ligadas ao envelhecimento dos condrócitos, que apresentam capacidade reduzida de manutenção da homeostasia da cartilagem.

Oda et al. (2007) ao estudar a epífise distal do fêmur de ratos Wistar, mostraram que aos três meses de idade, a superfície articular apresentava-se lisa, com pequenas ondulações. Aos 12 meses, apresentava poucas fissuras e crateras, já aos 32 meses foi observado grande número dessas alterações degenerativas com aparência mais severa.

Segundo Wluka et al. (2004), as propriedades bioquímicas, estruturais e mecânicas da cartilagem articular do joelho mudam com o avanço da idade.

As modificações que ocorrem no tecido conjuntivo durante o envelhecimento estão associadas com aumento das propriedades físicas como força e rigidez, resultando possivelmente em fibras frágeis com atividade funcional reduzida no tecido. Essas mudanças são manifestadas, por exemplo, nas articulações, pele e sistema vascular (AVERY; BAILEY, 2005).

Estudos mostram que há uma diminuição da espessura da cartilagem articular do joelho de indivíduos entre cinquenta e setenta e oito anos em relação a jovens entre vinte e trinta anos, sugerindo que há perda de volume da cartilagem em adultos saudáveis (HULDELMAIER et al., 2001; VERZIJL et al., 2002). Karnoven et al. (1994), mostraram que tanto o envelhecimento como a osteoartrose foram capazes de gerar uma diminuição da espessura da cartilagem articular da epífise distal do fêmur, nos locais de descarga de peso em humanos.

É possível que o volume da cartilagem seja relativamente estável antes dos quarenta, cinquenta anos, e seja perdido rapidamente depois dessa idade, ou perdida

regularmente durante a vida adulta, sendo um desencadeante para o desenvolvimento de osteoartrose (WLUKA et al., 2004).

O envelhecimento causa alterações na composição da matriz e na atividade dos condrócitos, incluindo a habilidade dessas células em responder a variedade de estímulos, tal como fatores de crescimento. Essas alterações podem aumentar a probabilidade da degeneração da cartilagem articular (BUCKWALTER; MANKIN, 1998). Segundo Yang et al. (2005), o acúmulo de proteínas da matriz da cartilagem no retículo endoplasmático e no complexo de golgi dos condrócitos, é modificado por estresse oxidativo durante o envelhecimento, levando a diminuição da síntese das proteínas da matriz e eventual apoptose dos condrócitos. A capacidade dos condrócitos de remodelação e reparo da matriz da cartilagem diminui com a idade e isso pode ser atribuído principalmente à diminuição do seu anabolismo. O potencial proliferativo dessas células diminui com o envelhecimento (GOLDRING; GOLDRING, 2007).

Existem evidências de que os maiores componentes da matriz extracelular, como o colágeno tipo II e as proteoglicanas, sofrem mudanças em sua densidade, composição e organização estrutural durante o envelhecimento. A maior proteoglicana da matriz, o agrecan diminui seu tamanho molecular e sua quantidade na matriz, contribuindo para alterações nas propriedades biomecânicas da matriz (GOLDRING; GOLDRING, 2007).

Segundo Eckstein et al. (2006), há controvérsias a respeito da diminuição da espessura da cartilagem ocorrer durante o processo normal de envelhecimento (possivelmente como resultado da redução de forças mecânicas) ou se afeta somente pessoas com osteoartrose. Karnoven et al. (1994) concluíram através da mensuração de imagens de ressonância nuclear magnética, que a idade reportou uma significante diminuição linear da espessura da cartilagem dos côndilos lateral e medial do fêmur com e sem a presença de osteoartrose. O mesmo não ocorreu com a tíbia.

Segundo Oda et al. (2007), após estudo da superfície articular da epífise distal do fêmur de ratos com 3, 12 e 32 meses, houve o diminuição significativa da espessura e da densidade celular com a idade nas três zonas da cartilagem articular. Em relação ao colágeno o mesmo estudo mostrou diferença entre os tipos de colágeno com a idade. Aos 3 meses, o colágeno predominante nas zonas superficial, média e profunda, foi o

tipo I, enquanto aos 12 e 32 meses, o colágeno tipo II predominou na zona superficial e o tipo III nas zonas média e profunda.

Perda de cartilagem e da função articular são problemas encontrados geralmente em indivíduos após o período reprodutivo (ECKSTEIN et al., 2006).

3.3 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA SOBRE A CARTILAGEM ARTICULAR E OUTRAS ESTRUTURAS CORPORAIS

Tanto os idosos quanto os jovens são acometidos diariamente pelo estresse da sociedade moderna. Porém nenhum estresse sofrido pelo organismo é maior do que a condição natural da variação da energia ingerida. O subconsumo grave de nutrientes, caracterizado pela desnutrição, pode levar à fome, emagrecimento e morte. Enquanto a nutrição excessiva pode estar associada com câncer, doenças cardíacas, envelhecimento e um grande número de alterações patológicas. Ambos os casos, parecem estar associados a mudanças em numerosas funções de processos fisiológicos, hormonais, metabólicos e biomecânicos. Os mecanismos dessas alterações ainda não são totalmente conhecidos (LUTZ, 1990; HART et al., 1999).

Segundo Fontana e Klein (2007), após revisão da literatura, sugeriram que o estilo de vida, como sedentarismo, alimentação e adiposidade é responsável por 70% das doenças crônicas e são os maiores contribuintes para a diminuição da longevidade.

A ingestão alimentar impacta significativamente a replicação, apoptose e resposta imune celular (HART et al., 1999). A restrição alimentar, caracterizada pela redução da quantidade de alimento diário, respeitando o conceito de “subnutrição sem desnutrição”, causa mudanças significativas na porcentagem de células em todas as fases do ciclo celular na medula óssea (LU et al., 1991), inibe a proliferação celular no baço e timo de ratos jovens (LU et al., 1993), além disso, aumenta a longevidade de diversas espécies, incluindo ratos. Hipóteses sugerem que esse efeito de prolongamento da vida é mediado por uma mudança no estado biológico de proliferação celular e reprodução para um, no qual, a manutenção celular e mecanismos de reparo são maximizadas (HOLLOSZY,

1997). Segundo Weindruch e Walford (1982), a restrição alimentar iniciada entre 3 e 6 meses de idade em roedores, desacelera o envelhecimento, aumenta a longevidade, e inibe a ocorrência de muitos tipos de câncer.

Segundo Athanasiou et al. (2000), após estudarem ratos (Fischer 344) entre 6, 12, 18, e 24 meses, demonstraram que diferente do osso, as propriedades biomecânicas da cartilagem articular não são afetadas por 40% de restrição alimentar.

O tamanho e a frequência das refeições são aspectos fundamentais da nutrição, que possuem profundos efeitos na saúde e na longevidade dos animais de laboratório. A redução da frequência das refeições/jejum intermitente, caracterizada pela redução do número de refeições diárias sem desnutrição, podem suprimir o desenvolvimento de várias doenças e aumentar a sobrevida em roedores, reduzindo o dano oxidativo e aumentando a resistência ao estresse (MATTSON, 2005).

A ingestão calórica é um determinante importante de saúde. Ingestão energética inadequada e excessiva representam diferentes formas de má nutrição que levam a mudanças desfavoráveis na composição corporal, disfunção orgânica e mortalidade prematura **(**FONTANA; KLEIN, 2007).

Estudos mostram que mudanças na ingestão calórica, podem alterar diversas variáveis fisiológicas e comportamentais (HART et al., 1999) como temperatura basal do organismo e a atividade metabólica (DUFFY et al., 1990); induzir uma mudança bem coordenada entre carboidrato e metabolismo gordo (mensurado pela análise do cociente respiratório), resultando de alterações de níveis hormonais e/ou modulação da atividade do receptor hormonal (ALY et al., 1994); diminuir a atividade reprodutora trocada pelo objetivo de busca alimentar; modificar a habilidade do organismo em prevenir infecções; causar alterações na regulação do dano, reparo, replicação e expressão do DNA para manutenção da integridade do genoma (HART; TURTURRO, 1997; HART et al., 1999).

Uma redução de 40% de ingestão calórica em ratos aumenta significativamente a atividade espontânea. Concomitante com o aumento da atividade espontânea há uma diminuição da frequência cardíaca, tanto ao repouso quanto ao estresse físico. Além disso, ocorre diminuição da temperatura corporal, do consumo de O_2, da produção de

CO_2 e da frequência respiratória. Essas mudanças dramáticas na frequência respiratória e na temperatura corporal sugerem uma rápida mudança nas vias metabólicas (glicólise para gliconeogenese). Baixa temperatura e metabolismo podem representar um mecanismo de proteção contra danos ao DNA, aumentando assim, o potencial de sobrevivência nos ratos restritos (DUFFY et al., 1990).

A restrição calórica é a intervenção mais eficiente para o aumento da expectativa de vida em várias espécies animais, incluindo os mamíferos (HURSTING et al., 2003). Estudos em roedores demonstraram que a restrição calórica, caracterizada pela redução da ingestão de calorias abaixo da ad libitum usual sem desnutrição, retardou o envelhecimento e aumentou a longevidade por prevenir ou retardar o aparecimento de doenças crônicas como diabetes, aterosclerose, cardiopatia, doenças auto-imunes, doenças respiratórias e renais e câncer (WEINDRUCH; WALFORD, 1982; ATHANASIOU et al., 2000; HURSTING et al., 2003; MATTSON, 2005). Segundo Holloszy (1997), restrição calórica moderada de aproximadamente 30%, resulta em diminuição da mortalidade precoce. Além disso, a restrição calórica diminuiu a neurodegeneração cerebral e aumentou a neurogênese em modelos animais de Alzheimer, Parkinson, doença de Huntington e acidente vascular cerebral (MATTSON, 2005; MARTIN et al., 2006), mas mostrou ser prejudicial em modelos animais de esclerose lateral amiotrófica **(**MATTSON, 2005).

Porto et al. (2012), concluíram que, por minimizar os efeitos do envelhecimento no plexo mioentérico do duodeno de ratos, a restrição calórica de 30% pode ser usada como uma medida preventiva para as doenças intestinais que surgem com o envelhecimento, melhorando a qualidade de vida dos idosos.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 15 ratos machos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar. Os animais foram separados em três grupos, com 5 animais em cada grupo:

- C: animais de 06 meses alimentados com dieta normal (A);
- SR: animais de 18 meses alimentados dieta normal (A);
- RC: animais de 18 meses submetidos à restrição calórica alimentados com dieta B.

Após aprovação do comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 2477/2011), os animais de todos os grupos, com exceção os animais do grupo C, aos seis meses de idade foram transferidos para o Biotério Setorial, onde permaneceram até os 18 meses. Todos foram alojados em caixas de polipropileno providas de bebedouro e comedouro, mantidas em condições ambientais controladas de temperatura (24±2°C) e de iluminação (ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro) e água *ad libitum*.

Para determinar a quantidade de dieta diária fornecida durante o experimento, os animais de todos os grupos passaram por um período de sete dias de adaptação, durante o qual foram fornecidas dieta normal e água *ad libitum*. A média de consumo diário de dieta normal obtida na fase de adaptação foi a quantidade diária de dieta administrada ao longo de toda a fase experimental. Esse procedimento foi necessário para evitar que animais tratados com dieta de nível calórico inferior ao da dieta normal compensassem o menor fornecimento de calorias com o aumento da ingestão.

Após o período de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos dois grupos (5 animais por grupo). Para os animais do grupo SR foi administrada dieta normal (A) (Anexo a. Tabela 1) produzida com base na composição química de dietas referências para animais de laboratório e necessidades estabelecidas pelo NRC (1995)

para ratos em período de manutenção. Os animais do grupo RC receberam dieta 31% menos calórica (B) (Anexo a. Tabela 1).

Os animais foram pesados no início do experimento e mensalmente. As médias foram calculadas, os dados tabulados e comparados estatisticamente. Foram verificados também, o coeficiente de crescimento exponencial e o coeficiente de determinação.

4.2 ELABORAÇÃO DA DIETA

Foram elaboradas duas dietas isoprotéicas (Anexo a. Tabela 1). A dieta A foi considerada a dieta normal referência, fornecida aos animais do grupo SR. A dieta B foi fornecida aos animais dos grupos RC.

A dieta B apresentava, energia bruta reduzida em 31% (2700 kcal/EB/kg) em relação à energia bruta calculada para a dieta normal (3900 kcal/EB/kg) (Anexo A, Tabela 1).

4.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após o período experimental (12 meses) os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e eutanasiados com dose letal do anestésico Tiopental®, 40mg/kg de peso corpóreo via endovenosa.

4.4 MICROSCOPIA DE LUZ

A seguir serão descritos a preparação do material e as análises realizadas à microscopia de luz.

4.4.1 Preparação do Material Para Análise ao Microscópio de Luz

Os animais dos três grupos foram eutanasiados e manipulados em prancha de cortiça. Foram retiradas as articulações dos joelhos esquerdos dos animais, sob microscópio estereoscópico. Durante o procedimento cirúrgico, foi feita irrigação contínua com solução fisiológica para manter os espécimes livres de resíduos (STOCKWELL, 1967; BLOEBAUM, 1980).

Foram utilizados os membros pelvicos, pois são as que mantêm a propulsão durante a marcha. Foram examinadas as cartilagens das epífises distal do fêmur e proximal da tíbia por serem locais comuns de degeneração devido à relação com a descarga do peso corporal em várias espécies (KÄÁB et al., 1998). Foram dissecados os músculos das regiões anterior e posterior do joelho, expondo a articulação. A cápsula foi então aberta, os ligamentos cruzados e colaterais foram seccionados e as epífises distal do fêmur e proximal da tíbia separadas e isoladas.

As peças foram colocadas em solução de formol 10% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, durante 24 horas a 4ºC. Após lavagem, foi realizada a descalcificação das peças em solução de Ebner (ácido clorídrico concentrado 3ml, cloreto de sódio; solução saturada (35%) 100ml e água destilada 100ml), durante 3 meses, ou até que as peças não apresentassem mais cálcio (esta verificação pode ser feita a partir de uma reação química de 5ml da solução, na qual os fragmentos estavam imersos, composta por 1ml de oxalato de amônio e 1ml de hidróxido de amônia). Após a descalcificação, as peças foram lavadas em água destilada, desidratadas em séries crescentes de álcoois (70% ao 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina a 65ºC formando blocos. Destes blocos foram obtidos 6 cortes histológicos com 6 µm de espessura, perpendiculares à superfície da cartilagem, com intervalo de 300µm. Os cortes foram coletados em lâminas histológicas e corados através dos seguintes métodos:

- Hematoxilina-Eosina (HE), para análise da espessura das zonas (camadas) da cartilagem, quantificação dos condrócitos e determinação dos volumes dos núcleos dos condrócitos da cartilagem articular de acordo com o Anexo b (Figura 1).

- Picrosirius F3BA (JUNQUEIRA et al., 1978) para quantificação de colágeno. As fibras colágenas foram examinadas por meio de microscópio dotado de luz polarizada, processo no qual, as fibras são visíveis por sua coloração e birrefringência.

- Imunohistoquímica, para marcação de colágeno tipo II, por ser o tipo de colágeno predominante na cartilagem articular (JUNQUEIRA et al., 1978).

4.4.2 Análise Morfométrica

O estudo morfométrico foi realizado utilizando-se um sistema digital de processamento e análise de imagens em computador, do Laboratório de Anatomia da FMVZ. O sistema consiste de Microscópio[1], ao qual está acoplada uma microcâmera de vídeo[2] que capta as imagens das lâminas histológicas, e as transmite para um computador. A análise foi realizada em imagens digitalizadas, de maneira semi-automática, atraves de software específico[3]. Neste estudo foram considerados os seguintes parâmetros:

4.4.2.1 Análise da Espessura das Zonas (camadas) da Cartilagem Articular

A espessura de cada uma das três zonas da cartilagem e da cartilagem total (soma das três) foi realizada através de imagens digitalizadas com objetivas de aumento de 200X. A zona calcificada foi excluida devido à dificuldade de diferenciação desta com o osso subcondral, o que poderia comprometer as análises (STOCKWELL, 1967; MEACHIM, 1971; ODA, 2005). Foram feitas, em cada um dos 12 cortes de cada

[1] Olympus BX60
[2] Axio Cam HRC (ZEISS)
[3] Axio Vision 4.8

animal (6 da cartilagem articular da tíbia e 6 da cartilagem articular do fêmur), a medida da espessura de cada zona em µm, em 6 locais escolhidos aleatoriamente (3 em cada côndilo), totalizando 72 medidas para cada zona por animal (36 da cartilagem articular da tíbia e 36 da cartilagem articular do fêmur). As médias e o desvio-padrão foram calculados para cada zona, nos 5 animais de cada grupo.

4.4.2.2 Análise da Densidade Numérica de Condrócitos

Para contagem dos condrócitos, foram utilizados 6 cortes não sucessivos por animal, com intervalo de 300 µm entre os cortes, para evitar a contagem dupla de uma mesma célula. Segundo Lothe et al. (1979), a contagem de condrócitos é representativa quando se utiliza a média de 6 cortes. Utilizando imagens digitalizadas com objetivas de aumento de 200X. Foram contados os núcleos dos condrócitos de cada zona situados em 4 campos escolhidos aleatoriamente (de 100 µm cada) da cartilagem articular do fêmur e da cartilagem articular da tibia (2 campos no côndilo medial e 2 no lateral cada animal). Posteriormente, foram calculados a média e o desvio-padrão para cada zona, nos 5 animais de cada grupo.

4.4.2.3 Determinação do Volume dos Núcleos dos Condrócitos

Utilizando-se imagens digitalizadas com objetiva de aumento de 400X, foram feitas medidas dos diâmetros maior e menor do núcleo de cada condrócito situado em cada um dos 6 campos da cartilagem articular do fêmur e da tibia (3 por côndilo, medial e lateral, sendo 1 por zona da cartilagem) de cada animal, utilizando imagens digitalizadas. O cálculo do volume nuclear foi feito segundo a fórmula: $V = a^2 \times b/1{,}91$ onde, V = volume nuclear, a = diâmetro menor do núcleo, b = diâmetro maior do núcleo e 1,91 é uma constante utilizada (SALVATORE; SCHREIDER, 1947).

4.4.2.4 Morfometria do Colágeno

A morfometria do colágeno foi realizada utilizando imagens digitalizadas com objetivas de aumento de 400X. Doze cortes de cada animal (6 da cartilagem articular da tíbia e 6 da cartilagem articular do fêmur), foram fotografados e mensurados em 6 locais (3 em cada côndilo), totalizando 72 campos por animal (36 da cartilagem articular da tíbia e 36 da cartilagem articular do fêmur). A imagem de cada campo foi digitalizada e tratada de forma a contrastar as fibras colágenas por limiar de cor (vermelho). O programa disponibiliza uma escala entre os vermelhos, o tom a ser quantificado é selecionado e aplicado igualmente sobre todas as imagens. Quantificou-se a proporção volumétrica (em porcentagem) das fibras colágenas da matriz extracelular por área do frame da imagem. Para não haver diferenças, todas as imagens foram digitalizadas com frame de 149774,6 μm^2. Desta forma, as imagens abrangeram a cartilagem articular e o osso adjacente. O valor obtido nos 36 campos por animal, por superfície articular foi somado, separando côndilo lateral de côndilo medial e calculada a média. A média final dos cinco animais de cada grupo foi calculada e utilizada no programa estatístico.

4.4.2.5 Identificação dos Tipos de Colágeno

Para análise qualitativa dos tipos de colágeno, as lâminas coradas com Picrossirius foram estudadas com a utilização de filtros de polarização em microscópio de luz convencional. Quando analisadas por este método, o colágeno tipo I apresenta-se de coloração laranja ou vermelho, enquanto o tipo III mostra-se verde. O colágeno tipo II, geralmente, apresenta-se amarelo, porém pode ser encontrado em cores variáveis, no entanto, essas cores sempre são claramente distintas dos colágenos tipo I e III. Como as cores obtidas dependem dos filtros de cor utilizados e da intensidade da luz, sempre que possível, as imagens foram obtidas sob as mesmas condições (JUNQUEIRA et al., 1978). Foram realizadas imagens digitalizadas com objetivas de aumento de 400X , dos 12 cortes de cada animal (6 da cartilagem articular da tíbia e 6 da cartilagem articular do

fêmur), em 6 locais (3 em cada côndilo), totalizando 72 campos por animal (36 da cartilagem articular da tíbia e 36 da cartilagem articular do fêmur), sendo as dimensões de cada campo 430X340µm .

4.5 IMUNOHISTOQUÍMCA

Para a análise histoquímica do colágeno tipo II da matriz das cartilagens articulares do fêmur e da tíbia foram utilizados 6 cortes de cada animal. Esse tipo de colágeno foi escolhido por ser o predomintante na cartilagem articular (HARDINGHAM et al., 2002; CAIRNS et al., 2010). Os cortes em lâminas silanizadas, foram desmascarados em banho-maria em tampão borato a 80ºC durante 30 minutos. Em seguida, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase em solução de H_2O_2 3%, diluido em metanol durante 5 minutos. Após lavagens o bloqueio antigênico das lâminas foi realizado em ácido5-tio-2-nitro-benzóico (TNB) durante 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados e incubados em câmara úmida, *overnight* a 4ºC, com anticorpo *mouse anti-human collagen II*[4]. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários biotilinados[5] durante 30 minutos, em câmara úmida. Após lavagem, a revelação foi realizada com diamino benzidina (DAB). Posteriormente, foi realizada a coloração de fundo com Hematoxilina de Harris durante 5 segundos. As lâminas foram montadas e fotografadas imediatamente com objetiva de aumento de 400X. Controles negativos foram realizados para evitar marcações inespecíficas do anticorpo secundário.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram feitas pelo procedimento ANOVA para a análise de variância e em casos de identificação de efeitos significativos ($P<0,05$), utilizou-se o teste de

[4] 2150-0040 (Serotec) Oxford, Inglaterra
[5] (Dako) Glostrup, Dinamarca

Tukey. Foram calculadas as médias de cada variável para cada unidade experimental (rato). As análises foram feitas com estas médias. Foram testados os efeitos das variáveis: alimentação (usual X hipocalórica) e envelhecimento sobre as medidas da espessura das zonas da cartilagem, número de núcleos por unidade de área, volume dos núcleos dos condrócitos e densidade de volume de colágeno.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados de acordo com os seguintes itens: variação da massa corpórea dos animais, análise morfométrica e imunohistoquímica.

5.1 VARIAÇÃO DA MASSA CORPÓREA DOS ANIMAIS

Os gráficos 1 e 2 e o apêndice a (Tabela 2) mostram os resultados das pesagens dos animais. Conforme citado anteriormente, os animais foram pesados no início do experimento e mensamenlte durante todo o período experimental (12 meses).

Gráfico 1 - Médias das pesagens obtidas mensalmente durante o período experimental (12 meses), para os animais do grupo SR

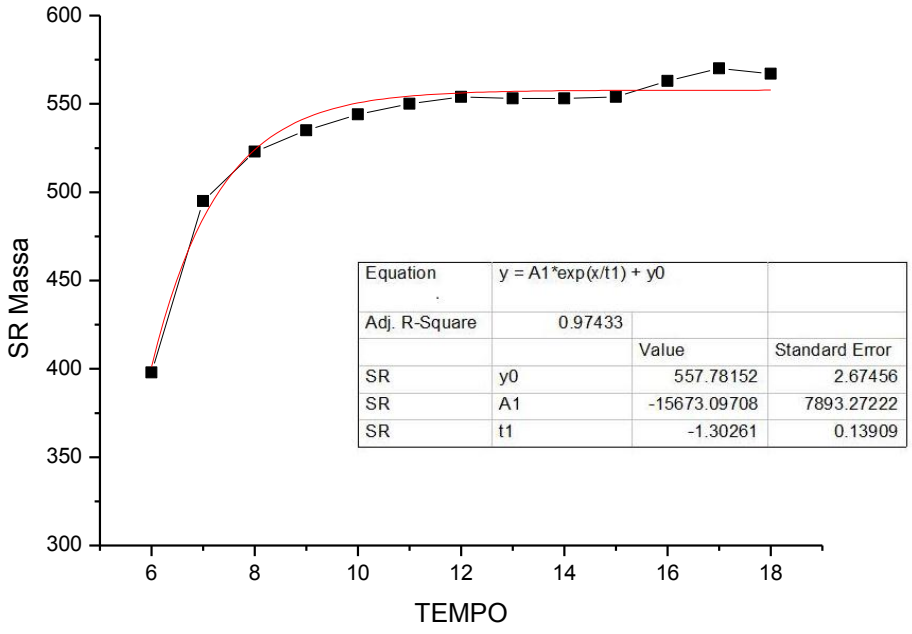
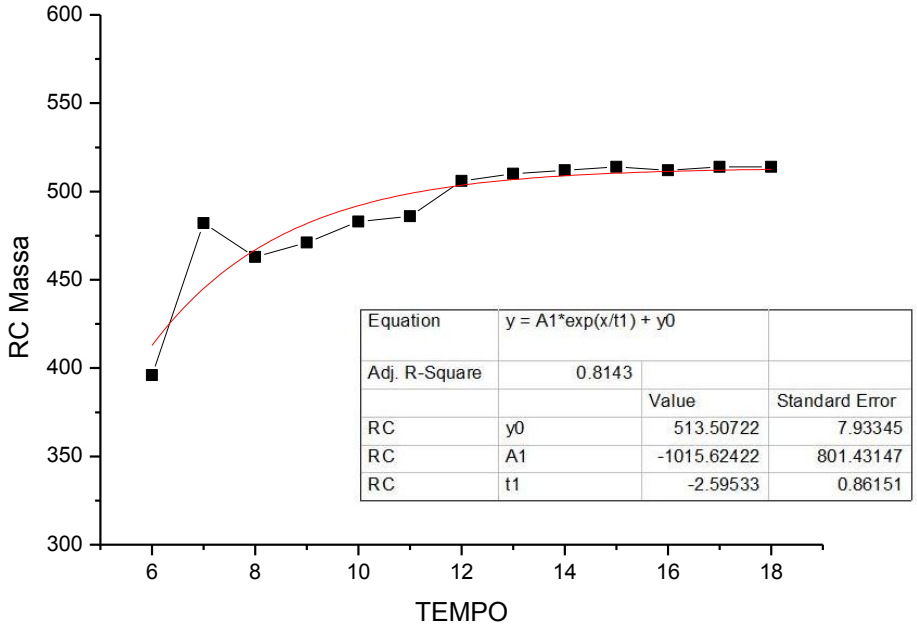


Gráfico 2 - Médias das pesagens obtidas mensalmente durante o período experimental (12 meses), para os animais do grupo RC



No inicio do experimento, aos seis meses de idade, não havia diferença estatítica entre os grupos SR (dieta A) e RC (dieta B) (p>0,05) (Apêndice a . Tabela 2).

Aos sete meses notamos um aumento discreto na massa corpórea dos ratos do grupo SR em relação ao RC, porém sem significância estatística (p>0,05) (Apêndice a. Tabela 2).

A partir dos oito meses de idade, observamos diferença significativa na massa corpórea dos animais, sendo no SR maior que no RC. Na presente idade houve perda de massa nos animais do grupo RC (dieta B), seguida de ganho até o final do experimento, porém esse ganho foi significantemente menor do que o dos animais do SR até os 18 meses (p<0,05) (Apêndice a. Tabela 2).

Para o SR, o coeficiente de crescimento exponencial (*e*) e o coeficiente de determinação (R^2) foram $e^{\frac{-1,3}{t}}$ e 0,97 respectivamente (P<0,0001). Enquanto para o RC, o coeficiente de crescimento exponencial e o coeficiente de determinação foram $e^{\frac{-2,6}{t}}$ e 0,81 respectivamente (P<0,0001).

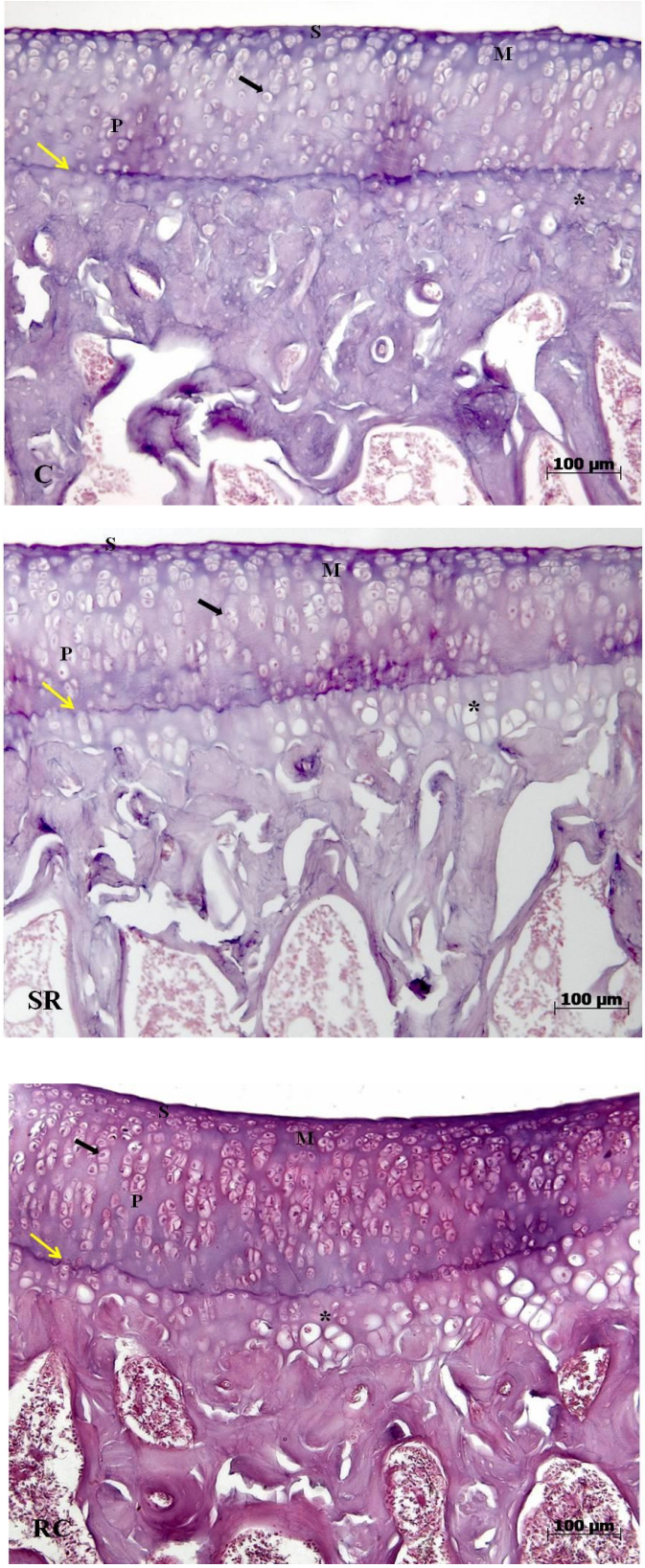
5.2 ANÁLISE DA ESPESSURA DAS ZONAS (CAMADAS) DA CARTILAGEM ARTICULAR

A seguir serão apresentados os resultados da espessura da cartilagem articular da epífise proximal da tíbia e distal do fêmur, respectivamente.

5.2.1 Tíbia

A figura 2 mostra o aspecto dos cortes histológicos da cartilagem articular da tíbia dos animais dos 3 grupos, corados pela HE. Nestas figuras pode ser observada a distribuição dos condrócitos nas 3 zonas da cartilagem articular.

Figura 2– Cortes histológicos da cartilagem articular da tíbia mostrando as zonas superficial (S), média (M), profunda (P) e calcificada (*), o aspecto dos condrócitos (seta preta) nas lacunas e a tidemark (seta amarela) nos três grupos estudados (C, SR e RC) HE



A tabela 3 mostra os resultados da análise da espessura das zonas superficial, média e profunda da cartilagem articular, bem como a média da espessura total da cartilagem nos côndilos lateral e medial da tíbia nos grupos C, SR e RC.

As análises mostram que os animais do SR apresentaram um aumento da espessura da cartilagem articular da tíbia em relação ao grupo C sem diferença entre os côndilos. As médias bicondilares da espessura total foram 105,8 (±28,6) para o grupo C e 144,5 (±68,7) para o grupo SR (p<0,001). Esse aumento ocorreu de maneira específica na zona profunda, sendo 74,9 (±25,5) para o C e 112,4 (±59,9) para o SR (p<0,001), (Tabela 3).

Os animais do RC, não apresentaram diferenças em relação aos do SR, tendo médias bicondilares da espessura total de 114,4 (±51,9) e profunda 157,7 (±66,1) (P>0,05), (Tabela 3).

Tabela 3 - Demonstrativo das médias das espessuras das zonas da cartilagem articular da epífise proximal da tíbia nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2012

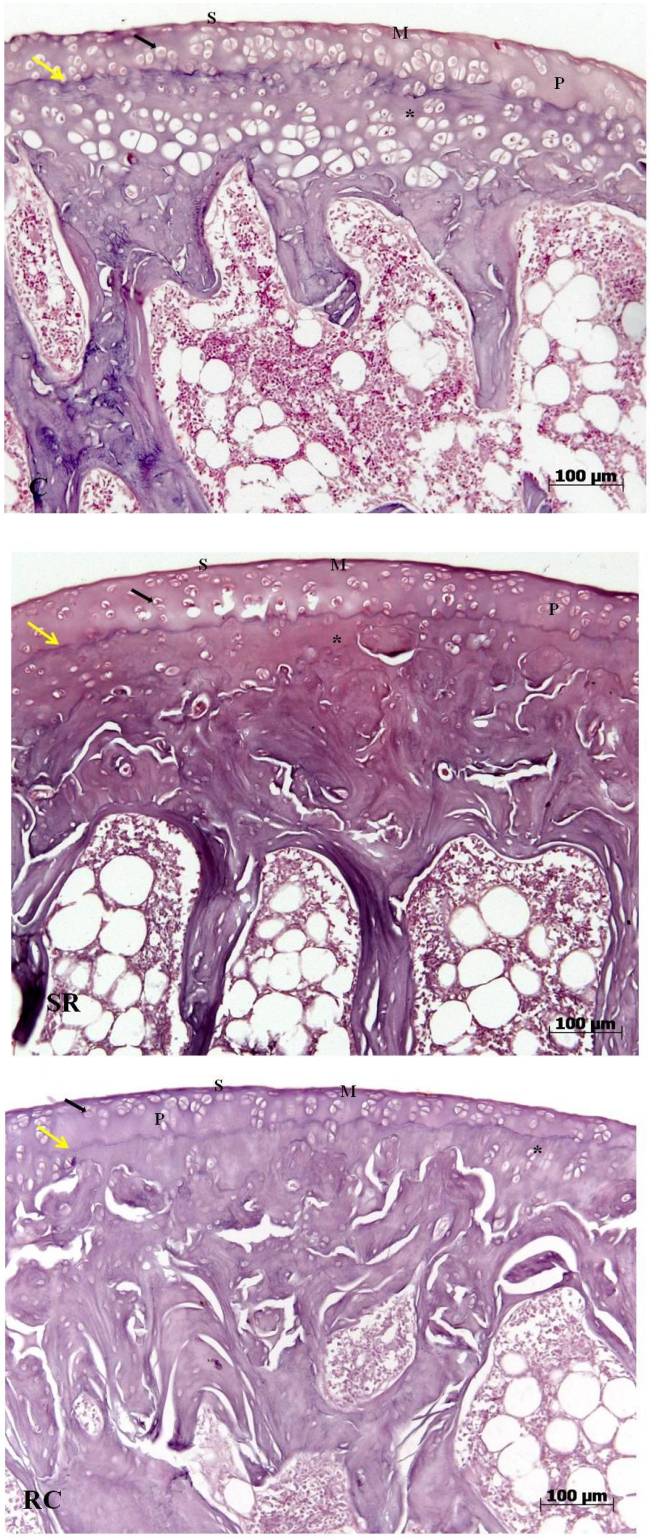
Tíbia Espessura (µm)					
Grupo	**Zona**	**Côndilo**			**N**
		Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	**Superficial**	10,1 ± 4,5	7,9 ± 1,7	9,0 ± 2,9	5
	Média	21,4 ± 5,1	24,1 ± 6,7	22,7 ± 2,6	5
	Profunda	60,4 ± 13,4	89,4 ± 46,2	74,9 ± 25,5*	5
	Total	90,2 ± 12,4	121,4 ± 54,4	105,8 ± 28,6**	5
SR	**Superficial**	9,4 ± 2,2	9,6 ± 1,0	9,5 ± 1,6	5
	Média	21,7 ± 6,7	23,6 ± 8,1	22,7 ± 7,3	5
	Profunda	108,2 ± 64,8	116,6 ± 56,7	112,4 ± 59,9	5
	Total	139,2 ± 73,5	149,9 ± 65,7	144,5 ± 68,7	5
RC	**Superficial**	8,9 ± 1,7	10,3 ± 3,1	9,6 ± 2,3	5
	Média	36,6 ± 14,8	30,7 ± 13,6	33,6 ± 13,0	5
	Profunda	114,9 ± 55,6	113,8 ± 53,8	114,4 ± 51,9	5
	Total	160,5 ± 70,7	154,9 ± 69,7	157,7 ± 66,1	5

* Significante em relação ao SR na zona profunda (P<0,001); ** Significante em relação ao SR na espessura total (P<0,001).

5.2.2 Fêmur

A figura 3 mostra o aspecto dos cortes histológicos da cartilagem articular do fêmur dos animais dos 3 grupos estudados, corados pela HE.

Figura 3 – Cortes histológicos da cartilagem articular do fêmur mostrando mostrando as zonas superficial (S), média (M), profunda (P) e calcificada (*), o aspecto dos condrócitos (seta preta) nas lacunas e a tidemark (seta amarela) nos três grupos estudados (C, SR e RC) HE



As tabelas 4 e 5 mostram respectivamente as médias gerais e específicas por zona, da espessura da cartilagem articular do fêmur nos côndilos lateral e medial nos grupos C, SR e RC.

Os resultados mostram que, de maneira geral, os animais do SR apresentaram uma diminuição da espessura da cartilagem articular do côndilo medial do fêmur em relação aos do grupo C. A diferença entre as médias bicondilares foi de 6,4µm, sendo menor no SR (P<0,001). Essa alteração ocorreu devido a uma diminuição do côndilo medial, o qual foi menor no SR, sendo a diferença entre as médias de 10,9µm (P<0,001) (Tabela 4).

De maneira mais específica, houve também, diminuição em relação às médias bicondilares da espessura total, as quais foram 63,9 (± 12,2) para o grupo C e 51,0 (±10,6) para o grupo SR (p<0,001). Essa diminuição ocorreu na zona profunda, sendo 40,7 (±11,6) para o C e 32,1 (±8,8) para o SR (p<0,001) (Tabela 5).

Os animais do RC por sua vez, obtiveram de maneira geral, um aumento da espessura em relação aos do SR. A diferença entre as médias bicondilares foi de 4,5µm, sendo maior para o RC (P<0,001) (Tabela 4).

Especificamente, esse aumento do RC em relação ao SR, se deu pelo aumento da zona profunda e consequente aumento da espessura total no côndilo medial (P<0,001) (Tabela 5).

Tabela 4 - Demonstrativo das médias das espessuras da cartilagem articular da epífise distal do fêmur nos diferentes grupos avaliados seguidas pela significância estatística - São Paulo – 2012

Fêmur Espessura (µm)				
Grupo	**Côndilo**			**N**
	Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	29,6***	34,2#	31,9*	5
SR	27,7**	23,3	25,5##	5
RC	25,3	34,8	30	5

* Significante em relação ao SR bicondilar (P<0,001); ** Significante em relação ao SR no côndilo medial (P<0,05); *** Significante em relação ao côndilo medial no C (P<0,05); # Significante em relação ao SR no côndilo medial (P<0,001); ## Significante em relação ao RC bicondilar (P<0,001).

Tabela 5 - Demonstrativo das médias das espessuras das zonas da cartilagem articular da epífise distal do fêmur nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2012

Fêmur Espessura (µm)					
Grupo	**Zona**	**Côndilo**			**N**
		Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	**Superficial**	6,6 ± 0,7	7,6 ± 0,9	7,1 ± 0,4	5
	Média	15,2 ± 1,2	17,0 ± 3,4	16,1 ± 2,0	5
	Profunda	37,6 ± 8,1	43,9 ± 20,6	40,7 ± 11,6*	5
	Total	59,4 ± 8,1	68,5 ± 22,5	63,9 ± 12,2**	5
SR	**Superficial**	6,9 ± 0,2	5,7 ± 0,6	6,3 ± 0,3	5
	Média	13,3 ± 1,4	12,0 ± 2,4	12,7 ± 1,8	5
	Profunda	35,2 ± 7,7	28,9 ± 10,2##	32,1 ± 8,8	5
	Total	55,5 ± 8,9	46,5 ± 12,4###	51,0 ± 10,6	5
RC	**Superficial**	7,0 ± 0,3	7,2 ± 1,0	7,1 ± 0,5	5
	Média	12,6 ± 0,7	15,0 ± 6,3	13,8 ± 2,8	5
	Profunda	31,2 ± 8,2***	47,4 ± 26,2	39,3 ± 9,0	5
	Total	50,7 ± 9,0#	69,6 ± 33,4	60,2 ± 12,2	5

* Significante em relação ao SR na zona profunda (P<0,001); ** Significante em relação ao SR na espessura total (P<0,001); *** Significante em relação ao RC na zona profunda do côndilo medial (P<0,001); # Significante em relação ao RC na espessura total do côndilo medial (P<0,001); ## Significante em relação ao RC na zona profunda do côndilo medial (P<0,001); ### Significante em relação ao RC na espessura total no côndilo medial (P<0,001).

5.3 ANÁLISE DA DENSIDADE NUMÉRICA DE CONDRÓCITOS

A seguir serão apresentados os resultados do número de condrócitos nas cartilagens articulares da tíbia e do fêmur, respectivamente.

5.3.1 Tíbia

As tabelas 6 e 7 mostram respectivamente as médias gerais e específicas por zona do número de condrócitos nos côndilos lateral e medial da cartilagem articular da tíbia nos grupos C, SR e RC.

Os resultados mostram que, de maneira geral, os animais do SR apresentaram um aumento da densidade numérica de condrócitos no côndilo lateral em relação aos do C. A diferença das médias bicondilares entre os grupos foi de 2,5 condrócitos ($P<0,05$), devido ao aumento no côndilo lateral do SR de 4.2 condrócitos ($P<0,001$) (Tabela 6).

A análise específica mostra um aumento discreto bem distribuído entre as zonas, resultando em pequeno aumento do número total bicondilar, concentrado no côndilo lateral do SR, porém sem significância estatística ($P>0,05$) (Tabela 7).

Em relação ao RC, houve um aumento médio bicondilar de 3,8 condrócitos em relação ao SR ($P<0,001$), sem diferença entre os côndilos ($P>0,05$) (Tabela 6).

A análise específica mostra um aumento discreto bem distribuído entre as zonas e os côndilos, resultando em pequeno aumento do número total bicondilar do RC em relação ao SR, porém sem significância estatística ($P>0,05$) (Tabela 7).

Tabela 6- Demonstrativo das médias do número de condrócitos da cartilagem articular da epífise proximal da tíbia nos diferentes grupos avaliados seguidas pela significância estatística - São Paulo – 2012

Tíbia Número de Condrócitos				
Grupo	**Côndilo**			**N**
	Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	14,1**	16,4	15,3*	5
SR	18,3***	17,2	17,8	5
RC	21,7	21,4	21,6#	5

*Significante em relação ao SR bicondilar (P<0,05); **Significante em relação ao C medial (P<0,05); ***Significante em relação ao C lateral (P<0,05); # Significante em relação ao SR bicondilar (P<0,001).

Tabela 7 - Demonstrativo das médias do número de condrócitos das zonas da cartilagem articular da epífise proximal da tíbia nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2012

Tíbia Número de Condrócitos					
Grupo	**Zona**	**Côndilo**			**N**
		Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	**Superficial**	3,3 ± 0,5	3,0 ± 0,4	3,2 ± 0,4	5
	Média	9,4 ± 1,7	10,2 ± 2,1	9,8 ± 0,7	5
	Profunda	15,7 ± 6,2	19,8 ± 5,7	17,7 ± 5,3	5
	Total	28,4 ± 6,4	33,0 ± 6,7	30,7 ± 5,2	5
SR	**Superficial**	3,9 ± 0,8	3,4 ± 0,4	3,7 ± 0,6	5
	Média	9,8 ± 2,2	10,5 ± 3,8	10,1 ± 3,0	5
	Profunda	23,1 ± 13,8	20,6 ± 12,6	21,8 ± 13,2	5
	Total	36,7 ± 16,6	34,5 ± 16,3	35,6 ± 16,4	5
RC	**Superficial**	4,6 ± 1,4	4,6 ± 0,5	4,6 ± 0,8	5
	Média	14,6 ± 7,2	13,3 ± 4,2	13,9 ± 5,4	5
	Profunda	24,4 ± 11,1	25,1 ± 8,2	24,8 ± 8,5	5
	Total	43,5 ± 18,3	43,0 ± 12,1	43,2 ± 14,0	5

5.3.2 Fêmur

A tabela 8 mostra os resultados da análise do número de condrócitos das zonas superficial, média e profunda da cartilagem articular, bem como a média total desse número nos côndilos lateral e medial da cartilagem articular do fêmur nos grupos C, SR e RC.

Os resultados mostram que houve uma diminuição da densidade numérica de condrócitos bicondilar nos animais do SR em relação aos do C na zona profunda, sendo 11,1 (±1,6) no C e 9,4 (±2,2) no SR ($P<0,05$). O número total de condrócitos foi menor no côndilo medial do SR que do C ($P<0,001$) (Tabela 8).

Nos animais do RC encontramos um aumento na densidade numérica de condrócitos bicondilar na zona profunda em relação aos do SR, sendo 13,6 (±1,2) no RC e 9,4 (±2,2) no SR ($P<0,001$). O número total de condrócitos foi maior no côndilo medial do RC que do SR ($P<0,001$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Demonstrativo das médias do número de condrócitos das zonas da cartilagem articular da epífise distal do fêmur nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2012

Fêmur Número de Condrócitos					
Grupo	**Zona**	**Côndilo**			**N**
		Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	**Superficial**	4,7 ± 0,6	4,9 ± 0,6	4,8 ± 0,6	5
	Média	8,7 ± 1,1	8,6 ± 1,2	8,7 ± 1,0	5
	Profunda	10,5 ± 0,8	11,8 ± 3,5	11,1 ± 1,6*	5
	Total	23,8 ± 1,7	25,3 ± 3,5**	24,6 ± 2,2	5
SR	**Superficial**	4,9 ± 0,5	3,8 ± 0,7	4,3 ± 0,5	5
	Média	9,0 ± 1,5	6,1 ± 1,1	7,5 ± 0,9	5
	Profunda	9,9 ± 3,2	9,0 ± 1,4	9,4 ± 2,2#	5
	Total	23,8 ± 3,9***	18,9 ± 2,2	21,3 ± 2,7	5
RC	**Superficial**	4,5 ± 0,9	4,5 ± 0,4	4,5 ± 0,6	5
	Média	7,8 ± 1,4	7,8 ± 1,0	7,8 ± 0,5	5
	Profunda	12,9 ± 2,0	14,3 ± 2,4	13,6 ± 1,2	5
	Total	25,2 ± 3,3	26,6 ± 3,5##	25,9 ± 1,3	5

*Significante em relação ao SR na zona profunda (P<0,05); **Significante em relação ao número total no côndilo medial do SR (P<0,001); *** Significante em relação ao número total no côndilo medial do SR (P<0,001); # Significante em relação ao RC na zona profunda (P<0,001); ## Significante em relação ao número total no côndilo medial do SR (P<0,001).

5.4 DETERMINAÇÃO DO VOLUME DOS NÚCLEOS DOS CONDRÓCITOS

Neste tópico serão apresentados os resultados do volume nuclear dos condrócitos nas cartilagens articulares estudadas.

5.4.1 Tíbia

A tabela 9 mostra os resultados da análise do volume dos núcleos dos condrócitos das zonas superficial, média e profunda da cartilagem articular da tíbia, bem como o volume nuclear total médio dos condrócitos da cartilagem nos côndilos lateral e medial nos grupos C, SR e RC.

Os resultados mostram que não houve diferença no volume nuclear dos condrócitos entre os grupos C e SR e entre SR e RC (P>0,05) (Tabela 9).

Tabela 9 - Demonstrativo das médias do volume dos núcleos dos condrócitos nas zonas da cartilagem articular da epífise proximal da tíbia nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2012

Tíbia Volume dos núcleos dos Condrócitos					
Grupo	**Zona**	**Côndilo**			**N**
		Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	**Superficial**	28,4 ± 16,7	26,4 ± 16,1	27,4 ± 16,0	5
	Média	40,0 ± 28,0	37,8 ± 22,8	38,9 ± 25,0	5
	Profunda	59,0 ± 26,0	65,2 ± 31,0	62,1 ± 27,5	5
	Total	127,5 ± 68,7	129,5 ± 65,1	128,5 ± 66,1	5
SR	**Superficial**	27,3 ± 8,6	25,9 ± 7,1	26,6 ± 6,8	5
	Média	39,0 ± 13,6	39,0 ± 18,0	39,0 ± 13,4	5
	Profunda	59,4 ± 19,5	64,5 ± 15,2	62,0 ± 17,0	5
	Total	125,7 ± 39,2	129,4 ± 31,6	127,6 ± 33,5	5
RC	**Superficial**	27,8 ± 9,8	29,2 ± 11,7	28,5 ± 9,7	5
	Média	44,7 ± 24,8	46,4 ± 23,1	45,6 ± 23,2	5
	Profunda	87,3 ± 48,7	110,1 ± 37,9	98,7 ± 43,2	5
	Total	143,7 ± 89,0	165,7 ± 93,8	154,7 ± 91,1	5

5.4.2 Fêmur

A tabela 10 mostra os resultados da análise do volume dos núcleos dos condrócitos das zonas superficial, média e profunda da cartilagem articular do fêmur, bem como o volume nuclear total médio dos condrócitos da cartilagem nos côndilos lateral e medial nos grupos C, SR e RC.

Os resultados demonstram que houve uma diminuição do volume nuclear total dos condrócitos no côndilo medial. Os valores bicondilares foram diminuidos de 125,2 (±17) no C para 101 (±24,1) no SR ($P<0,001$), devido a diminuição do volume total no côndilo medial de 133 (±16,9) no C para 92,3 (±30,1) no SR ($P<0,001$) (Tabela 10).

Os animais do RC apresentaram um aumento do volume nuclear total dos condrócitos bicondilar. Os valores médios foram 107,3 (±30,1) no RC e 101 (±24,1) no SR ($P<0,05$). A comparação do volume nuclear entre os côndilos lateral e medial do RC não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10 -Demonstrativo das médias do volume dos núcleos dos condrócitos nas zonas da cartilagem articular da epífise distal do fêmur nos diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2012

Fêmur Volume dos núcleos dos Condrócitos					
Grupo	**Zona**	**Côndilo**			**N**
		Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	**Superficial**	16,3 ± 3,9	18,5 ± 4,0	17,4 ± 3,2	5
	Média	26,8 ± 7,3	31,6 ± 4,9	29,2 ± 5,0	5
	Profunda	74,0 ± 20,8	83,2 ± 18,3	78,6 ± 12,2	5
	Total	117,2 ± 30,9*	133,3 ± 16,9**	125,2 ± 17,0#	5
SR	**Superficial**	17,1 ± 8,4	13,8 ± 2,6	15,4 ± 4,3	5
	Média	25,9 ± 4,5	24,1 ± 8,6	25,0 ± 5,1	5
	Profunda	66,9 ± 30,2	54,4 ± 21,4	60,7 ± 18,2	5
	Total	109,9 ± 37,6***	92,3 ± 30,1	101,1 ± 24,1##	5
RC	**Superficial**	24,4 ± 10,2	20,4 ± 7,0	22,4 ± 8,0	5
	Média	25,5 ± 8,8	33,9 ± 23,4	29,7 ± 15,0	5
	Profunda	56,4 ± 11,4	54,0 ± 17,7	55,2 ± 9,3	5
	Total	106,2 ± 19,6	108,3 ± 45,6	107,3 ± 30,1	5

*Significante em relação ao volume total do côndilo medial do C (P<0,05); **Significante em relação ao volume total no côndilo medial do SR (P<0,001); ***Significante em relação ao volume total no côndilo medial do SR (P<0,05); #Significante em relação ao SR total bicondilar (P<0,001); Significante em relação ao volume total no RC (P<0,05).

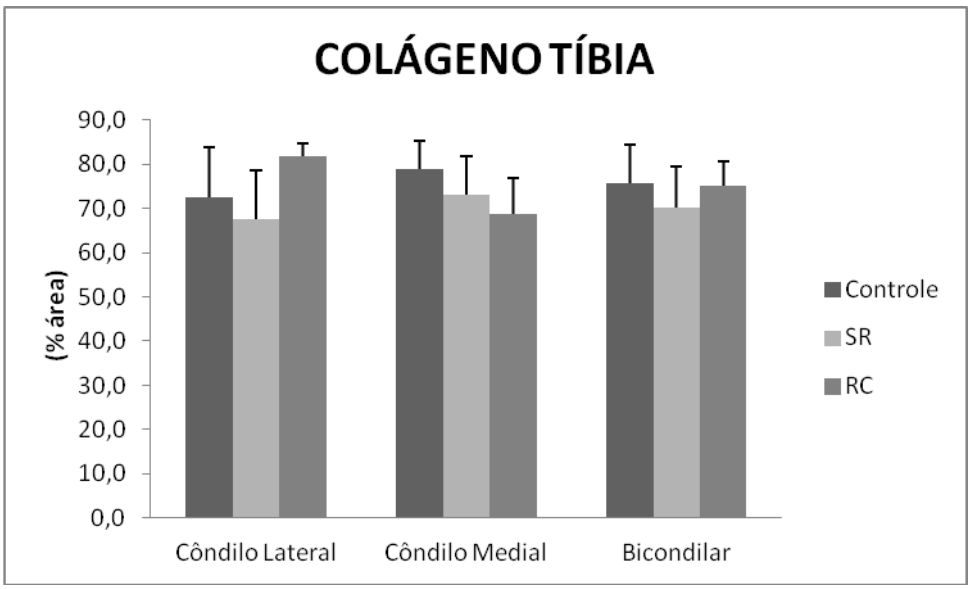
5.5 MORFOMETRIA DO COLÁGENO

A seguir serão apresentados os resultados da proporção volumétrica de colágeno da cartilagem articular da tíbia e do fêmur, respectivamente.

5.5.1 Tíbia

O gráfico 3 e o apêndice b (Tabela 11), mostram os resultados das análises da morfometria do colágeno da cartilagem articular da tíbia e do osso adjacente nos côndilos lateral e medial separadamente e em conjunto (bicondilar) nos grupos C, SR e RC, em função do envelhecimento e da alimentação.

Gráfico 3 – Os dados mostram a proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular por área nos côndilos lateral e medial da tíbia entre os diferentes grupos avaliados (Controle – C; Sem restrição – SR; Restrição calórica – RC)



Os resultados demonstram que não houve diferença nas médias da proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular entre os grupos C x SR (P>0,05) (Apêndice b. Tabela 11).

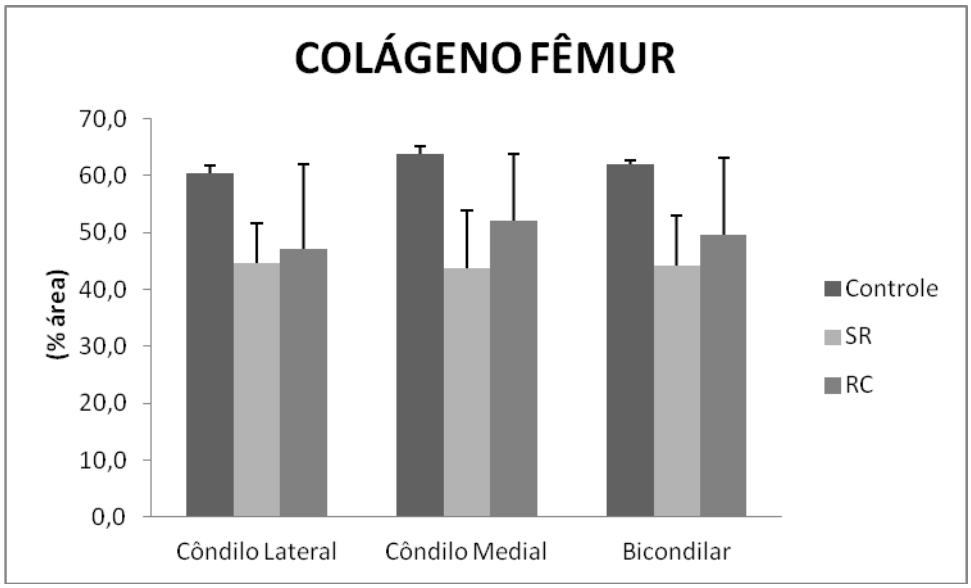
Os animais do RC mostraram um aumento do volume do colágeno no côndilo lateral em relação ao SR, sendo 81,7 (±3) para o RC e 67,6 (±11) para o SR (P<0,05). O valor médio também foi maior no côndilo lateral que o medial dentro do RC (P<0,05) (Apêndice b. Tabela 11).

A comparação estatística dos valores bicondilares das médias da proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular, entre os grupos C x SR e SR x RC não mostrou significância estatística (P>0,05) (Apêndice b. Tabela 11).

5.5.2 Fêmur

O gráfico 4 e o apêndice c (Tabela 12), mostram os resultados das análises da morfometria do colágeno da cartilagem articular do fêmur e do osso adjacente nos côndilos lateral e medial separadamente e em conjunto (bicondilar) nos grupos C, SR e RC, em função do envelhecimento e da alimentação.

Gráfico 4 – Os dados mostram a proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular por área nos côndilos lateral e medial da tíbia entre os diferentes grupos avaliados (Controle – C; Sem restrição – SR; Restrição calórica – RC).



Os resultados mostram que houve uma diminuição da proporção volumétrica das fibras colágena nos animas do SR em relação aos do C em ambos os côndilos. Os

valores bicondilares foram 62,1 (±0,6) no C e 44,3 (±8,7) no SR (P<0,001). No côndilo medial, obtivemos 63,8 (±14,4) no C e 43,8 (±10,2) no SR (P<0,001). Para o côndilo lateral as médias foram 60,4 (±1,3) no C e 44,7 (±7) no SR (P<0,001) (Apêndice c. Tabela 12).

Os animais do RC apresentaram um aumento do volume do colágeno apenas no côndilo medial, sendo 52,1 (±11,7) no RC e 43,8 (±10,2) no SR (P<0,05). Esse aumento repercutiu na média bicondilar, cujos valores foram 49,6 (±13,6) e 44,3 (±8,7) para o RC e SR respectivamente (P<0,05) (Apêndice c. Tabela 12).

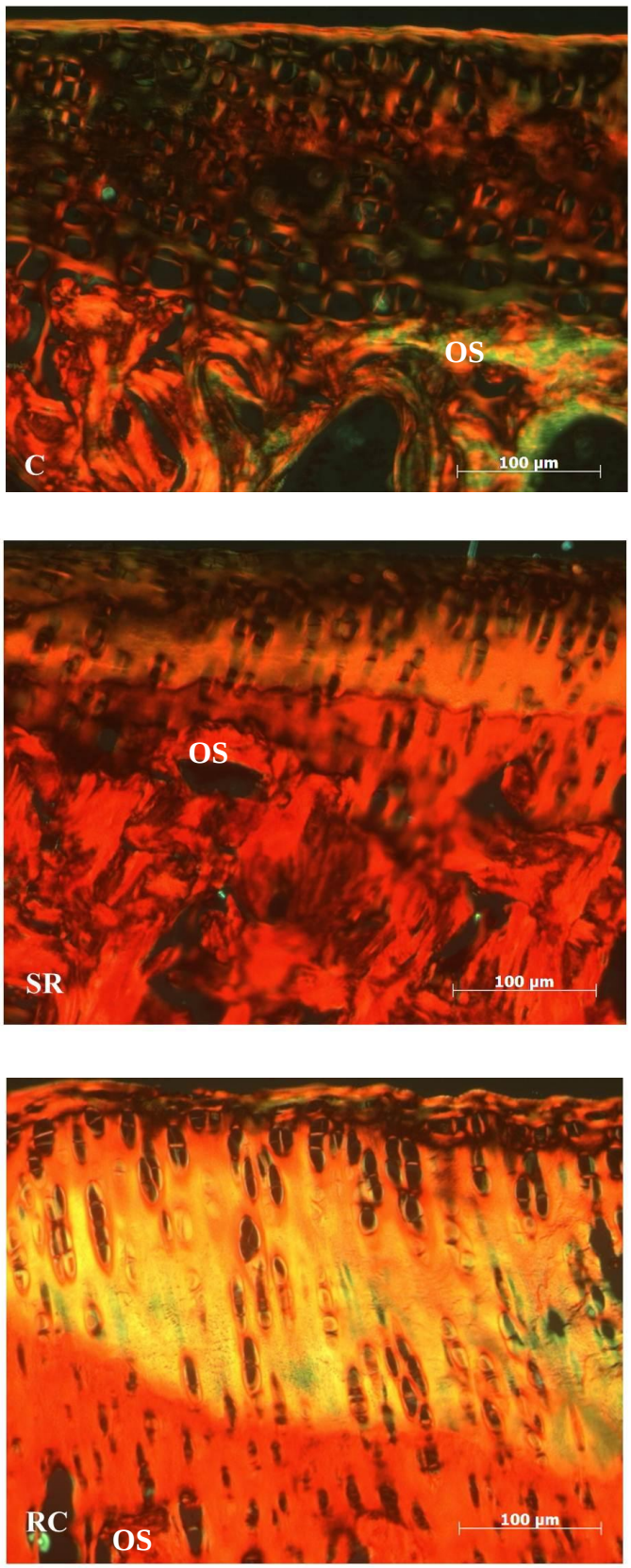
5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS DE COLÁGENO

As análises da identificação dos tipos de colágeno nas cartilagens articulares da tíbia e do fêmur, através da utilização de microscópio de luz polarizada serão apresentados a seguir.

5.6.1 Tíbia

A figura 4, mostra o aspecto das fibras colágenas ao longo da cartilagem articular da tíbia nos animais dos três grupos, coradas com Picrossírius e observadas em microscópio de luz com utilização de filtros de polarização.

Figura 4 – Cortes histológicos da cartilagem articular da tíbia mostrando a distribuição das fibras colágenas nas zonas da cartilagem nos três grupos estudados (C, SR e RC); Osso subcondral (OS) Picrosirius



No grupo C, observamos na zona superficial, a presença das cores amarela (fibras tipo II), laranja (tipo I) e verde (tipo III), sendo a amarela predominante em relação as outras duas. Na zona média, encontramos as cores verdes (tipo III) e amarronzadas, sendo a marrom predominante em relação a verde. O tom amarronzado, pode ser diferenciado claramente do tom alaranjado do colágeno tipo I encontrado nas zonas superficial e profunda, sugerindo então que o colágeno amarronzado represente fibras do tipo II (Figura 4). A zona profunda apresentou as cores laranja (tipo I), verde (tipo III) e marron (tipo II), sendo a última preponderante em relação as outras duas. A análise dos côndilos isoladamente, mostrou equilíbrio de fibras colágenas tipo II entres os côndilos nesse grupo.

No grupo SR, notamos a presença de fibras colágenas esverdeadas (tipo III) e amarronzadas (tipo II) na zona superficial, sendo a cor verde predominante em relação a marrom; alaranjadas (tipo I) e amarronzadas (tipo II) nas zonas média e profunda. A cor marrom predominou na zona média, enquanto a laranja na zona profunda. (Figura 4). A análise dos côndilos isoladamente, mostrou o predominio de fibras colágenas tipo II no côndilo medial desse grupo em relação ao côndilo lateral.

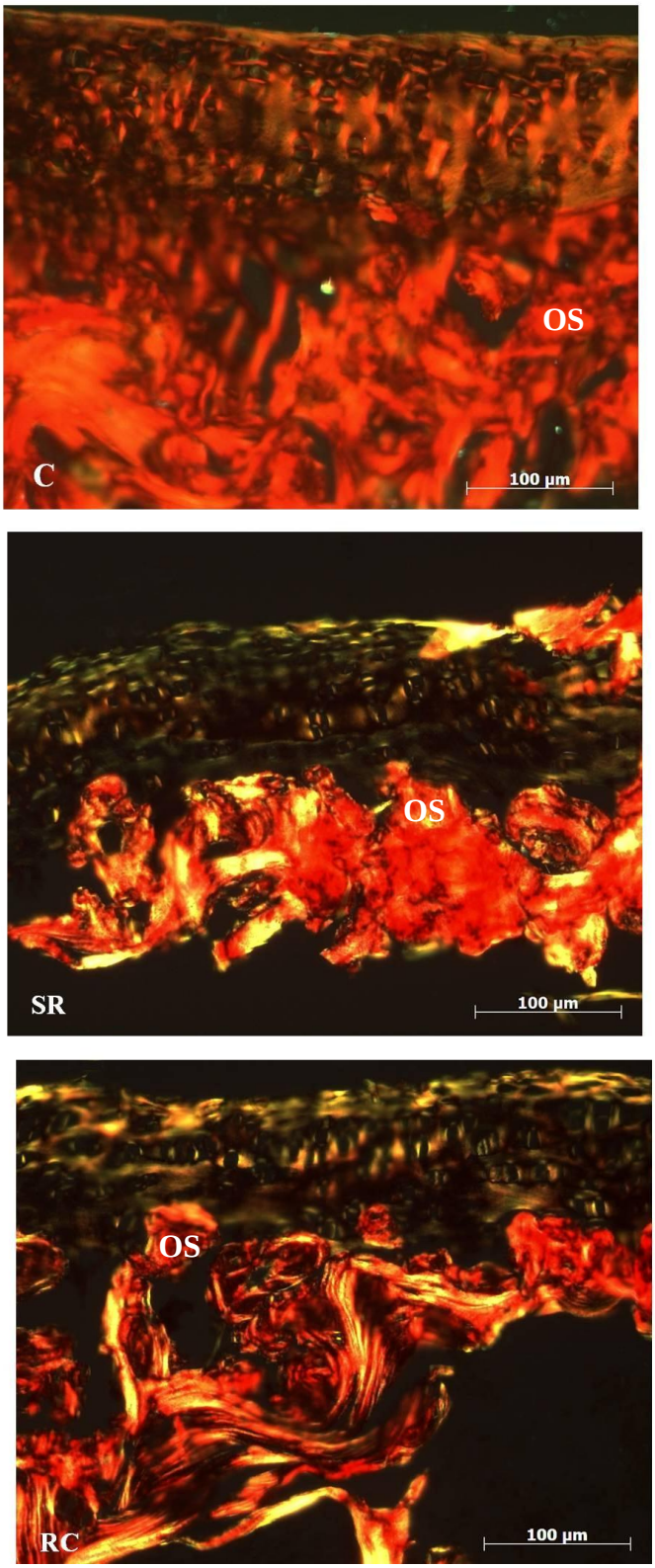
No grupo RC, observamos a presença de fibras colágenas amarelas (tipo II), laranjas (tipo I) e verdes (tipo III) na zona superficial, sendo a cor laranja preponderante em relação as outras duas. Na zona média houve predominância das fibras amarronzadas (tipo II), mas também foram encontradas fibras laranjas (tipo I). Na zona profunda notamos as cores amarela (tipo II), laranja (tipo I) e verde (tipo III), sendo as duas primeiras dominantes em relação a última(Figura 4). A avaliação dos côndilos separadamente, mostrou a predominancia de fibras colágenas tipo II no côndilo lateral desse grupo em relação ao côndilo medial.

A comparação entre os grupos, mostrou predominio de fibras colágenas tipo II em ambos os côndilos do grupo C em relação aos côndilos lateral e medial do SR, no côndilo no lateral do RC em relação ao lateral do SR e no medial do SR em relação ao medial do RC.

5.6.2 Fêmur

A figura 5, mostra o aspecto das fibras colágenas ao longo da cartilagem articular do fêmur nos animais dos três grupos, coradas com Picrossírius e observadas em microscópio de luz com utilização de filtros de polarização.

Figura 5 – Cortes histológicos da cartilagem articular do fêmur mostrando a distribuição das fibras colágenas nas zonas da cartilagem nos três grupos estudados (C, SR e RC); Osso subcondral (OS) Picrosirius



Nos animais do grupo C, notamos na zona superficial, a presença das cores amarela (fibras tipo II) e laranja (tipo I), sendo a amarela predominante em relação a laranja. Nas zonas média e profunda, encontramos as cores marrom (tipo II) e laranja (tipo I), sendo a marrom predominante em relação a laranja (Figura 5). A análise dos côndilos isoladamente, mostrou equilíbrio de fibras colágenas tipo II entres os côndilos nesse grupo.

No grupo SR, encontramos as cores verde (tipo III) e amarela (tipo II) na zona superficial, sendo a verde predominante em relação a amarela. Nas zonas média e profunda observamos as cores verde (tipo III), marron (tipo II) e amarela (tipo II), sendo a marrom, preponderante em relação as outras. Encontramos também na zona profunda, a cor vermelha (tipo I) em pequena proporção (Figura 5). A análise dos côndilos isoladamente, mostrou equilíbrio de fibras colágenas tipo II entres os côndilos nesse grupo.

No grupo RC, observamos a presença das cores amarela (tipo II), laranja (tipo I) e verde (tipo III) nas zonas superficial, média e profunda. Na última zona encontramos também, a cor marrom (tipo II). A cor amarela prevaleceu nas zonas superficial é média e a marrom na profunda (Figura 5). A análise dos côndilos isoladamente, mostrou equilíbrio de fibras colágenas tipo II entres os côndilos nesse grupo.

A comparação entre os grupos mostrou predominio de fibras colágenas tipo II em ambos os côndilos do grupo C em relação aos côndilos lateral e medial do SR. Porém, observamos equilíbrio de fibras colágenas tipo II na comparação entre os côndilos entre os grupos SR e RC.

5.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

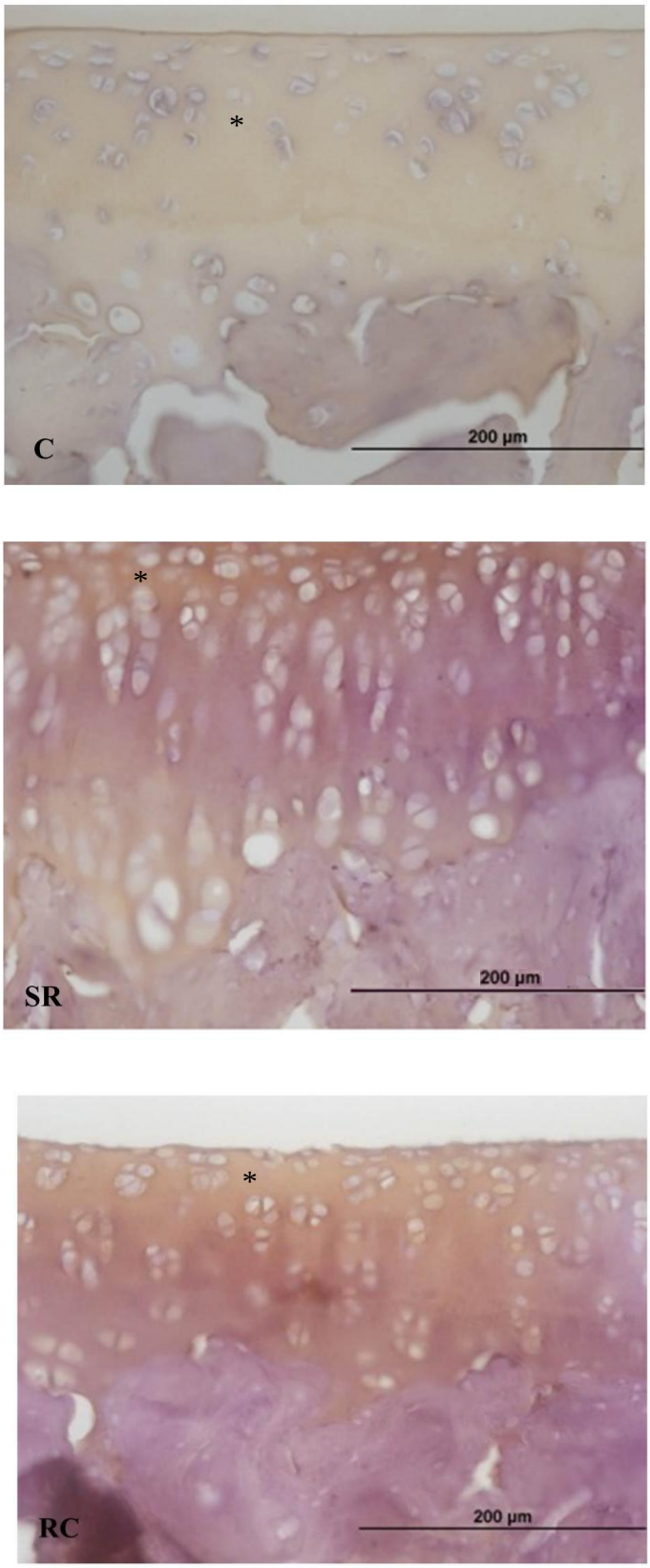
A avaliação da imunohistoquímica foi realizada de forma qualitativa, através de análises de imagens digitalizadas com objetivas de 40X.

O apêndice d (Tabela 13), mostra a relação dos resultados da imunohistoquímica com os dados da polarização encontrados ao longo da cartilagem articular da tíbia e do fêmur nos três grupos estudados.

5.7.1 Tíbia

A figura 6 mostra o aspecto dos cortes histológicos da cartilagem articular da tíbia dos animais dos 3 grupos, marcados pela técnica de imunohistoquímica.

Figura 6 - Cortes histológicos da cartilagem articular da tíbia mostrando a marcação do colágeno tipo II em bege (*) por Imunohistoquímica, nos três grupos estudados (C, SR e RC)



No grupo C observamos a marcação do colágeno tipo II em toda a matriz extracelular da cartilagem articular da tibia de forma homogênea em todos os animais (Figura 6).

Os grupos SR e RC apresentaram algumas áreas de marcação heterogêna, porém essa diferença na marcação dos animais do RC, não foi tão intensa quanto no SR (Figura 6).

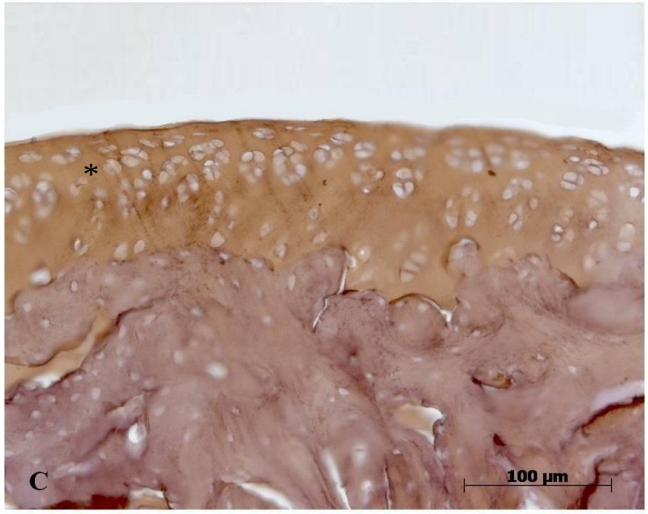
Analisando os côndilos separadamente, observamos uma marcação menos irregular no côndilo lateral do RC em relação ao côndilo medial do mesmo grupo e também em relação ao côndilo lateral do SR.

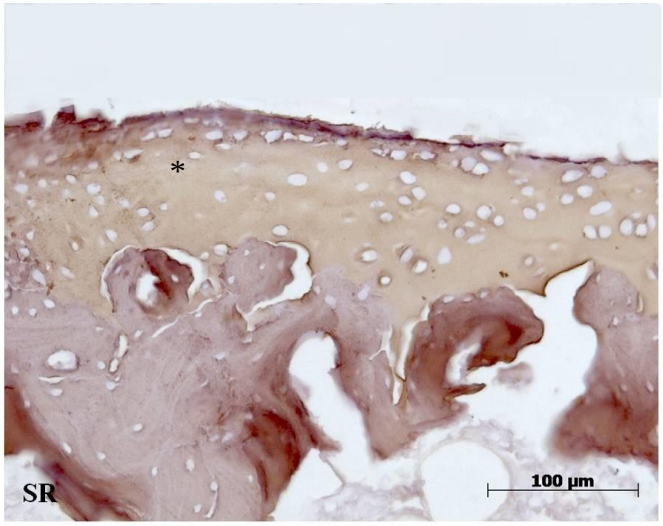
Quando avaliamos os côndilos mediais, identificamos menor irregularidade na marcação do côndilo medial do SR que no côndilo lateral do mesmo grupo e também em relação ao côndilo medial do RC.

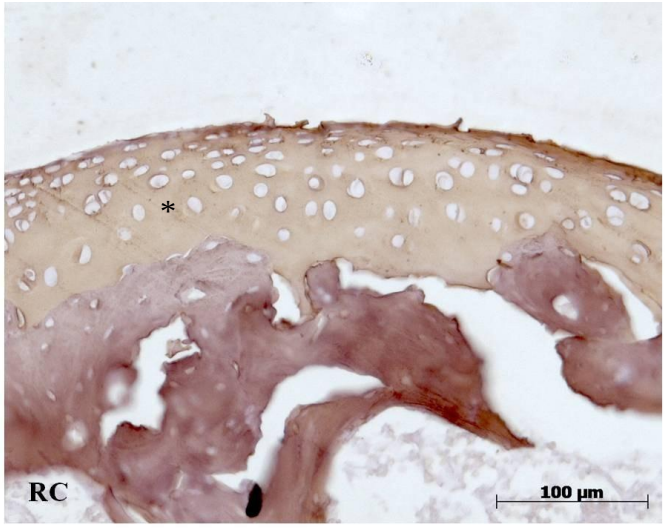
5.7.2 Fêmur

A figura 7 mostra o aspecto dos cortes histológicos da cartilagem articular do fêmur dos animais dos 3 grupos, marcados pela técnica de imunohistoquímica.

Figura 7 - Cortes histológicos da cartilagem articular do fêmur mostrando a marcação do colágeno tipo II em bege (*) por Imunohistoquímica, nos três grupos estudados (C, SR e RC)







No grupo C observamos a marcação do colágeno tipo II em toda a matriz extracelular da cartilagem articular do fêmur de forma homogênea em todos os animais (Figura 7).

Os grupos SR e RC apresentaram algumas áreas de marcação pouco heterogêna de maneira equilibrada entre eles (Figura 7).

Na análise dos côndilos separadamente, observamos equilíbrio na irregularedade de marcação entre os côndilos entre os grupos SR e RC.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram as alterações sobre a massa corpórea, sobre a espessura das zonas da cartilagem articular, sobre a densidade numérica de condrócitos, sobre o volume dos núcleos dos condrócitos e sobre o colágeno nas cartilagens articulares da tíbia e do fêmur em relação ao envelhecimento e à restrição calórica.

Os efeitos do envelhecimento e da restrição calórica na massa corpórea dos animais, segundo os dados obtidos demonstram que os ratos do SR e do RC ganharam massa durante o período experimental. Porém esse ganho teve comportamento diferente entre os dois grupos.

Os animais do SR apresentaram aumento de massa durante todo o experimento. Já os animias do RC, aos oito meses, apresentaram uma perda de massa, seguida de ganho até o final do experimento, no entanto esse ganho de massa foi significativamente menor que nos animais do SR. O coeficiente de crescimento exponencial foi maior para os animais do grupo SR. Quanto maior o coeficiente de crescimento exponencial, mais rápido o ganho de massa, logo o grupo SR, ganhou peso mais rapidamente que o RC. O coeficiente de determinação indica o quanto os resultados se aproximam do modelo de regressão de crescimento exponencial da massa, ou seja, quantos dos dados tiveram o mesmo comportamento, assim, no grupo SR, 97% dos dados batem com o modelo de regressão e no grupo RC, 81% ($P<0,0001$).

Os dados encontrados em relação ao grupo SR confirmam os achados da literatura, que demonstram que o processo natural do envelhecimento causa aumento de massa em ratos até meados dos 20 meses de idade (BAILEY et al., 1993; HOLLOSZY, 1997; ATHANASIOU et al., 2000; WANG et al., 2006).

Em relação ao RC, os dados convergem ao trabalho de Athanasiou et al. (2000), que demonstraram um aumento de massa corpórea menos intenso em ratos entre os 6 e 18 meses devido à restrição alimentar. Porém divergem de Holloszy (1997) que demostraram não haver diferenças de massa significante entre 6 e 18 meses em animais submetidos à restrição e Bailey et al. (1993), que notaram uma aumento de massa até os

15 meses em animais com alimentação restrita, com posterior perda até os 18 meses. Essas divergências podem ser devidas a diferenças na metodologia da restrição. Todos os três trabalhos citados utilizaram restrição alimentar e não restrição calórica. Athanasiou et al. (2000), utilizaram um modelo de 40% do *ad libitum*. Holloszy (1997), utilizaram um modelo de 30% do *ad libitum* e Bailey et al. (1993) alternava a alimentação dos ratos, sendo um dia *ad libitum* e outro com 18-25% do *ad libitum*.

No presente estudo, a administração de dieta com 31% de calorias reduzidas, foi capaz de reduzir o ganho de massa corpórea de ratos entre 8 e 18 meses de idade. Prevenindo o ganho esperado de massa durante o envelhecimento, sendo um fator protetor da cartilagem articular, uma vez que o sobrepeso e a obesidade estejam associados a osteoartrose por mecanismos biomecânicos e metabólicos. Os mecanismos biomecânicos sugerem que a obesidade aumenta a carga e o impacto exercido sobre a cartilagem articular do joelho, agindo assim como um impulso para o processo de fibrilação e degradação. Enquanto os mecanismos metabólicos sugerem que além da carga mecânica, pode haver fatores metabólicos sistêmicos que servem como ligação entre obesidade e osteoartrose do joelho (LEE; KEAN, 2012). Além disso, sabe-se que a obesidade causa um ambiente inflamatório. O tecido adiposo, que antigamente pensava-se ser um simples armazenador de energia, é aceito atualmente como um órgão endócrino que pode secretar substâncias como citocinas e adipocitocinas. Essas adipocitocinas, que são encontradas no fluido sinovial e no plasma de pacientes com osteoartrose, podem influenciar a homeostase, tendo, portanto, um papel importante na relação entre obesidade e osteoartrose de joelho (SOWERS; KARNOVEN, 2010; LEE; KEAN, 2012).

Os resultados sobre a espessura da cartilagem mostraram que o envelhecimento ocasionou resultados diferentes entre as cartilagens articulares da tíbia e do fêmur. Na tíbia houve aumento da espessura da zona profunda, resultando em um aumento da espessura total (soma das três zonas) não havendo diferença entre os côndilos lateral e medial. No fêmur houve uma diminuição importante da espessura da mesma zona, ocasionando diminuição na espessura total, além disso, a espessura do côndilo medial foi menor que o lateral. Embora Wang et al. (2006) e Stockwell (1967) tenham afirmado que a espessura da cartilagem distal do fêmur não muda com o avanço da idade, nossos achados confirmam os dados da literatura que demonstram que há uma redução da

espessura com o envelhecimento decorrente da diminuição de uma das três zonas da cartilagem. Essa redução ocorre provavelmente devido a menor atividade dos condrócitos com o envelhecimento (KARNOVEN et al., 1994; HUDELMAYER et al., 2001), podendo contudo, ser indício de osteoartrose, cuja principal característica é o dano focal que inclui fibrilação e afinamento (KERIN et al., 2002). A assimetria entre os côndilos pode ser reflexa ao efeito de fatores mecânicos (KARNOVEN et al., 1994; HUDELMAYER et al., 2001), pois de acordo com Buckwalter e Mankin (1998), a sobrecarga devido ao uso da articulação cria sinais mecânios, elétricos e fisicoquímicos que ajudam na atividade dos condrócitos de síntese e degradação. Nossos resultados referentes à tíbia podem estar relacionados à grande estresse mecânico, pois segundo Andriachi e Mundermann (2006), a espessura da cartilagem aumenta com grandes cargas de peso. Nossos dados concordam com os de Athanasiou et al. (2000) que encontraram aumento da espessura da cartilagem articular do ombro de ratos entre 6 e 18 meses de idade. Esse aumento da espessura também pode ser indício de doença degenerativa (MANKIN et al., 1974).

Os efeitos da restrição calórica sobre a espessura da cartilagem mostraram, também, resultados diferentes entre as cartilagens articulares da tíbia e do fêmur. Na tíbia, não houve diferença na espessura, logo entendemos que a restrição calórica não muda os efeitos do envelhecimento sobre a espessura da cartilagem articular da tíbia, confirmando os achados de Athanasiou et al. (2000), que mostraram que ratos entre 6 e 18 meses com ou sem restrição alimentar de 40% do *ad libitum*, sofrem aumento da espessura da cartilagem articular do ombro. No fêmur houve aumento da espessura total no côndilo medial, ocasionado por um aumento da zona profunda. Mostrando assim, que a restrição calórica impede a diminuição da espessura da cartilagem articular do fêmur causada pelo envelhecimento.

Os dados do envelhecimento sobre o número de condrócitos foram diferentes entre as cartilagens articulares do fêmur e tíbia. Houve um aumento do número de condrócitos no côndilo lateral da tíbia. No fêmur observamos, assim como na espessura, uma diminuição do número de condrócitos causado por uma diminuição da zona profunda. O número total de condrócitos foi menor no côndilo medial. Isso já era esperado, pois segundo Stockwell (1967) e Oda et al. (2007), ocorre uma diminuição da espessura e da densidade celular da cartilagem articular com a idade. Essa diminuição

pode, contudo, ser devido a apoptoses relacionadas à osteoartrose (HORTON et al., 2006; AIGNER et al., 2007). Quanto à tíbia, os resultados também foram coerentes, já que ambos, espessura e número de células aumentaram, exceto pela diferença entre os côndilos, que não ocorreu na espessura. Segundo Corvol (2000) e Mobasheri (2002), os condrócitos são responsáveis pela manutenção das propriedades mecânicas da cartilagem, que permite à cartilagem mudar sua estrutura para satisfazer as demandas, logo nossos achados ssugerem que uma cartilagem mais espessa apresente uma matriz proporcionalmente maior, necessitando de mais condrócitos para mantê-la com mesma eficiência.

A restrição calórica sob o envelhecimento ocasionou resultados opostos na tíbia e no fêmur quanto ao número de condrócitos. Na tíbia observamos aumento da densidade celular bicondilar sem diferença entre lateral e medial, mostrando que a restrição calórica intensifica os efeitos do envelhecimento sobre o número de condrócitos da cartilagem articular da tíbia. Porém no fêmur houve aumento da densidade celular, ocasionado por aumento importante na zona profunda, sendo o número total de condrócitos maior no côndilo medial, coerente com o resultado da espessura, logo a restrição calórica impede os efeitos do envelhecimento sobre o número de condrócitos da cartilagem articular do fêmur.

Quanto ao volume dos núcleos dos condrócitos, o envelhecimento não alterou esse aspecto na cartilagem articular da tíbia. No entanto, no fêmur ocasionou uma diminuição no volume total dos núcleos no côndilo medial. Sabendo que o metabolismo dos condrócitos é responsável pela manutenção da matriz através de um balanço entre anabolismo e catabolismo (KUETTNER et al., 1991; POOLE et al., 1992; BUKWALTER; MANKIN, 1998; CORVOL, 2000; HUBER et al., 2000; DUDHIA, 2005; YANG et al., 2005; HORTON, 2006; CAIRNS, 2010), os resultados encontrados na tíbia contradizem a literatura, porém os do fêmur, mesmo que em apenas um dos côndilos, concordam com Karnoven et al. (1994), Hudelmayer et al. (2001) e Martin e Buckwalter (2002), que mostraram que o envelhecimento diminui a habilidade dos condrócitos na manutenção e reparo da matriz pela diminuição da sua atividade sintética.

A restrição calórica também não alterou o volume dos núcleos dos condrócitos da cartilagem articular da tíbia, porém no fêmur causou um aumento do volume total dos núcleos sem diferenças entre os côndilos. Dessa maneira, a restrição calórica ameniza, os efeitos do envelhecimento, uma vez que iguala o volume dos núcleos dos condrócitos entres os côndilos lateral e medial da cartilagem articular do fêmur. A literatura mostra que a ingestão calórica altera a atividade metabólica (DUFFY et al., 1990; HART et al., 1990). No presente estudo encontramos um aumento do metabolismo relacionado a restrição calórica.

A literatura relata que ocorrem mudanças na densidade, composição e/ou organização do colágeno durante o processo de envelhecimento (ATHANASIOU et al., 2000; KERIN, 2002; GOLDRING; GOLDRING, 2007). No presente estudo, em relação ao envelhecimento, encontramos alteração na densidade do colágeno apenas na cartilagem articular do fêmur, sendo uma diminuição bicondilar. Em relação a organização dos tipos de colágeno, nossos dados referentes à imunohistoquímica mostraram uma marcação mais heterogênea do colágeno tipo II tanto no fêmur quanto na tíbia, sendo mais evidente no côndilo lateral da tíbia sugerindo uma proporção menor desse tipo de fibras. Esses resultados também foram confirmados pela polarização que mostraram predominância do colágeno tipo II apenas na zona média da tíbia e nas média e profunda do fêmur desse grupo. A alteração da marcação do côndilo lateral da tíbia, também foi confirmada pela polarização, que mostrou predomínio de fibras colágenas tipo II no côndilo medial em relação ao lateral do SR. Assim, o envelhecimento exerceu efeitos sobre o tipo, porém não sobre a quantidade total de colágeno da cartilagem articular da tíbia, principalmente no côndilo lateral, enquanto no fêmur houve diminuição na quantidade e na qualidade, sugerindo uma diminuição do colágeno tipo II na cartilagem articular do fêmur. Segundo Yang et al. (2005), durante o envelhecimento ocorre síntese anormal dos componentes da matriz da cartilagem, o que não encontramos em relação ao colágeno.

A restrição calórica exerceu efeitos sobre a proporção volumétrica das fibras colágenas das cartilagens articulares de maneiras diferentes, pois houve aumento no côndilo lateral da tíbia e no medial do fêmur. Sendo assim, a restrição calórica aumenta a proporção volumétrica de fibras colágenas no côndilo lateral da tíbia de ratos idosos, no entanto ameniza os efeitos do envelhecimento apenas sobre o côndilo medial do

fêmur, mas não no lateral. O comportamento diferenciado entre os côndilos tibiais pode ser indício de doença degenerativa, pois segundo Felson (2009), pacientes com osteoartrose de joelho tendem a sustentar peso progressivamente no côndilo lateral. Segundo Goldring e Goldring (2007) nos estágios iniciais de osteoartrose, na tentativa de regeneração, há evidências de aumento da atividade sintética de componentes da matriz, como colágeno tipo II. Essas evidências foram confirmadas apenas na cartilagem articular da tíbia pela imunohistoquímica e pela polarização, que mostraram respectivamente uma marcação de colágeno tipo II menos heterogênea e uma predominância de fibras colágenas tipo II no côndilo lateral dos animais do RC em relação ao côndilo medial e também em relação ao lateral do SR. Quanto ao fêmur, não houve diferenças na marcação e na polarização entre os côndilos, sugerindo que o colágeno aumentado no côndilo medial, não foi predominantemente o tipo II.

Sabendo que o colágeno apresenta papel fundamental na estrutura da cartilagem, nossos resultados são controversos em relação ao trabalho de Athanasiou et al. (2000), que relataram que a restrição alimentar de 40% do *ad libitum*, não afeta a integridade estrutural da cartilagem articular da cabeça do úmero de ratos aos 18 meses. Essa controvérsia, mais uma vez, pode ser atribuída à diferença de metodologia utilizada em nosso estudo.

Em relação à análise qualitativa, observou-se a presença do colágeno tipo II nas três zonas da cartilagem de todos os três grupos (C, SR e RC) no fêmur e na tíbia. Ainda relacionado a esses dados, o colágeno tipo II foi predominante em todas as zonas do grupo C no fêmur e na tíbia. No SR, prevaleceu apenas na zona média da tíbia e nas zonas média e profunda no fêmur. No grupo RC a preponderância do colágeno tipo II ocorreu nas zonas média e profunda na tíbia e nas três zonas da cartilagem articular do fêmur. Entre os grupos, observamos diferenças de predominância desse tipo de fibras na tíbia e no fêmur apenas em ambos os côndilos do grupo C em relação aos a ambos do SR. Ainda na tíbia, encontramos preponderância no côndilo no lateral do RC em relação ao lateral do SR e no medial do SR em relação ao medial do RC.

Os dados da polarização foram confirmados pela imunohistoquímica, que mostrou a presença de colágeno tipo II de forma homogênea apenas no grupo C tanto no fêmur quanto na tíbia, com atenuação e irregularidade da marcação do colágeno tipo II no RC

e de maneira mais acentuada no SR na tíbia. Essa atenuação e irregularidade de marcação ocorreram de maneira semelhante no RC e SR no fêmur. Analisando os côndilos separadamente, observamos uma marcação menos irregular no côndilo lateral do RC em relação ao côndilo lateral do SR e no côndilo medial do SR em relação ao côndilo medial do RC. Essa diminuição do colágeno tipo II pode estar relacionada à osteoartrose, uma vez que tal patologia esteja associada com ruptura da organização estrutural das fibras colágenas tipo II da cartilagem hialina (KASARAGOD et al., 2012). Dessa forma, nossos resultados mostram que a restrição calórica ameniza os feitos do envelhecimento sobre os tipos de colágeno e sobre a organização do colágeno tipo II na matriz da zona superficial da cartilagem articular do fêmur e da zona profunda da cartilagem articular da tíbia, porém não é capaz de mudar a alteração sofrida sobre a zona superficial da cartilagem articular da tíbia.

Oda et al. (2007), compararam a cartilagem da epífise distal do fêmur de ratos Wistar aos 3, 12 e 32 meses de idade, mostrando que na zona superficial, entre os 3 e 12 meses, o colágeno tipo I é substituído pelo colágeno tipo II e persiste até os 32 meses, indo de encontro ao nosso resultado em relação aos grupos C e SR. Porém esse mesmo estudo mostrou que o colágeno tipo III é encontrado nas zonas média e profunda da cartilagem articular entre os 12 e 32 meses. Esse tipo de colágeno não foi encontrado nos animais do grupo SR.

As alterações do tipo e da prevalência do colágeno tipo II observadas ao longo da cartilagem articular do fêmur e da tíbia nos grupos experimentais SR e RC, em maior e menor intensidade respectivamente, podem ser devido ao aumento da descarga de peso sobre a articulação, decorrente do ganho de peso nesses animais, principalmente do SR, que ganharam mais massa corpórea durante o experimento, pois de acordo com Roth e Mow (1980) e Volpi e Katz (1991), as mudanças no colágeno dependem das forças que atuam sobre a cartilagem articular, que influenciam a remodelação e a reorientação das fibras colágenas na cartilagem.

Nossos resultados demonstram que as mudanças sofridas nas cartilagens articulares do fêmur e da tíbia pelo envelhecimento podem ser alteradas pela ingestão de dieta de baixa caloria, de maneira benéfica ou não. Dessa maneira o

acompanhamento nutricional mostra-se importante para a melhoria da qualidade de vida em idosos, atuando na prevenção do desenvolvimento e da progressão de osteoartrose.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Sabendo que as mudanças da cartilagem articular relacionadas à idade aumentam o risco de osteoartrose (MARTIN; BUCKWALTER, 2002), podemos concluir que:

- A cartilagem articular da tíbia e do fêmur respondem de maneiras diferentes ao envelhecimento e a restrição calórica;

- As alterações sofridas pela cartilagem articular da tíbia decorrentes do envelhecimento, sugerem início de doença degenerativa;

- Uma restrição calórica de 31% no envelhecimento, causa alterações na cartilagem articular da tíbia compatíveis com osteoartrose avançada;

- As alterações sofridas pela cartilagem articular do fêmur decorrentes do envelhecimento, são compatíveis com tal processo natural;

- Uma restrição calórica de 31% é capaz de amenizar as alterações decorrentes do envelhecimento na cartilagem articular do fêmur.

REFERÊNCIAS

ADAMS, C. S.; HORTON JR., W. E. Chondrocyte apoptosis increases with age in the articular cartilage of adult animals. **Anat. Rec.,** v. 250, p. 418-425, 1998.

AIGNER, T.; HAAG, J.; MARTIN, J.; BUCKWALTER, J. Osteoarthritis: aging of matrix and cells-going for a remedy. **Curr. Drug. Targets,** v. 8, n. 2, p. 325-331, 2007.

ALY, K. B.; PIPKIN, J. L.; HINSON, W. G.; FEUERS, R. J.; DUFFY, P. H.; LYN-COOK, L.; HART, L. W. Caloric restriction induces stress proteins in the hypothalamus of rats. **Mech. Ageing. Dev.,** v. 76, p. 11-23, 1994.

ANDRIACCHI, T. P.; MÜNDERMANN, A. The role of ambulatory mechanics in the initiation and progression of knee osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.,** v. 18, n. 5, p. 514-518, 2006

ARMSTRONG, C. G.; MOW, V.C. Variations in the intrinsic mechanical properties of human cartilage with age, degeneration, and water content. **J. Bone Joint Surg. Am.,** v. 64, p. 88-94, 1982.

AROKOSKI, J. P.; JURVELIN, J. S., VÃÃTAINEN, U.; HELMINEN, H. J. Normal an pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. **Scand J Med Sci Sports**, v. 10, p. 186-198, 2000.

ATHANASIOU, K. A.; ZHU, C. F.; WANG, X.; AGRAWAL, C. M. Effects of aging and dietary restriction on the structural integrity of rat articular cartilage. **Ann of Biomed Eng.,** v. 28, p. 143-149, 2000.

ATRA, E. **Artrose, reumatologia prática.** Rio de Janeiro: Eleá CiênciaEditorial: 1995, p.58-63.

AVERY, N. C.; BAILEY, A. J. Enzymic and non-enzymic cross-linking mechanisms in relation turnover of collagen: relevance to aging and exercise. **Scand J Med Sci Sports,** v. 15, p. 231-240, 2005.

BAILEY, J. M.; BARKER, R. L.; BEAUCHENE, R. R. Age-Related changes in rat adipose tissue cellularity are altered by dietary restriction and exercise. **J Nutr.,** v. 123, n.1, p. 52-58, 1993.

BEAUPRÉ, G. S.; STEVENS, S. S.; CARTER, D. R. Mechanobiology in development, maintenace, and degeneration of articular cartilage. **J Rehabil Res Dev.,** v. 37, n. 2, p. 145-151, 2000.

BLOEBAUM , W. The morphology of the surface of artcular cartilage in adult rats. **J Anat.,** v. 131, p. 333-346, 1980. (Supplement, 2).

BOGOSLAVSKY, A. **Alterações da cartilagem hialina da cabeça do fêmur de ratos Wistar corredores, em função do envelhecimento**. 2006. 96 f. – Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo**,** 2006.

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. **Instr Course Lect.,** v. 47, p. 477-486, 1998.

BUCKWALTER, J. A.; MANKIN, H. J. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. **Instr Course Lect.,** v. 47, p. 487-504, 1998.

CAIRNS, D. M.; LEE, P. G.; UCHIMURA, T.; SEUFERT, C. R.; KWON, H.; ZENG, L. The role of muscle cells in regulating cartilage e matrix production. **J Orthop Res.,** v. 28, n. 4, p. 529-536, 2010.

CASTANO OREJA, M. T.; QUINTÁS RODRIGUEZ, M.; CRESPO ABELLEIRA, A.; GIRÁLDEZ GARCIA, M. A.; SAAVEDRA GARCIA, M. A.; JORGE BARREIRO, F. J. Variation in articular cartilage in rabbits between weeks six and eight. **Anat. Rec.,** v. 241, n. 1, p. 34-38, 1995.

CORVOL, M. T. The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis. **Joint Bone Spine,** v. 67, p. 557-560, 2000.

CULAV, E. M.; CLARK, C. H.; MERRILEES, M. J. Connective Tissues: Matrix composition and its relevance to physical therapy. **Phys Ther.,** v. 79, n. 3, p. 308-319, 1999.

DAHLBERG, L.; ROSS, H.; SAXNE, T.; HEINEGARD, D.; LARK, M. W.; HOERRNER, L. A.; LOHMANDER, L. S. Cartilage metabolism in the injuried and injured knee of the same patient. **Ann Rheum Dis.,** v. 53, p. 823-827, 1994.

DUDHIA, J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. **Cell Mol Life Sci.,** v. 62, p. 2241-2256, 2005.

DUFFY, P. H., FEUERS, R. J., NAKAMURA, K. D., LEAKEY, J. A., HART, R. W. Effect of chronic caloric restriction on the synchronization of various physiological measures in old female fischer-344 rats. **Chronobiol. Int.,** v. 7, p. 113-214, 1990.

ECKSTEIN, F.; HUDELMAIER, M.; PUTZ, R. The effects of exercise on human articular cartilage. **J.Anat.,** v. 208, p.491-512, 2006.

FELSON, D. T. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. **Arthritis Res. Ther.,** v. 11, n. 1, p. 203-214, 2009.

FELSON, D. T.; ANDERSON, J. J.; NAIMARK, A.; WALKER, A. L.; MEENAN, R. F. Obesity and knee osteoarthritis. **Ann Intern Med.,** v. 1**,** p. 18-24, 1988.

FITZGERALD, G. K.; CHILDS, J. D.; RIDGE, T. M.; IRRGANG, J. J. Agility and perturbation training for a physically active individual with knee osteoarthritis. **Phys Ther**., v. 82, n. 4, p.372-82, 2002.

FONTANA, L.; KLEIN, S. Aging, adiposity and caloric restriction. **JAMA,** v. 297, n. 9, p. 986-994, 2007.

FONTINELE, R.G. **Efeitos da atividade física na estrutura da cartilagem articular do joelho de ratas ooforectomizadas.** 2008. 86 f. - Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo**,** 2007.

GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R. Osteoarthritis. **J. Cell. Physiol.**, v. 213, p. 626-634, 2007.

GUERRA, M. F. M.; BAEZA, E. D.; HERNÁNDEZ, J. J. S.; RUIZ, J. P. G. Chondrocyte cloning in aging and osteoarthritis of the hip cartilage. Morphometric analysis in transgenic mice bovine growth hormone. **Acta Orthop Scand.,** v. 75, n. 2, p. 210-216, 2004.

HARDINGHAM, T.; RAYAN, V.; LEWTHWAITE, J. C. Regulation of cartilage matrix synthesis by chondrocytes. **Rev Rhum Ed Fr.,** v. 61, n. 9, p. 93-98, 1994. Supplement 2.

HARDINGHAM, T.; TEW, S.; MURDOCH, A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. **Arthritis Res.,** v. 4, n. 3, p. 63-68, 2002.

HART, R. W.; DIXIT R.; TURTURO, A.; LEAKEY, J. E. A.; FEUERS, R.; DUFFY, P.; BUFFINGTON, C.; COWAN, G.; LEWIS, S.; PIPKIN, J.; LI, S. Y. Adaptative role of caloric intake on the degenerative disease processes. **Toxicol Sci.,** v. 52, p. 3-23, 1999. Supllement

HART, R. W.; TURTURO, A. Dietary restriction and cancer. **Environ Health Perspect.,** v.105, p. 989-982, 1997.

HATTORI, S.; OXFORD, C.; REDDI, A. H. Identification on superficial zone articular chondrocytes stem/progenitor cells. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 358, n. 1, p. 99-103, 2007.

HOLLOSZY, J.O. Mortality rate and longevity of food-restricted exercising male rats: a reevaluation. **J. Appl. Physiol.,** v. 82, p. 399-403, 1997.

HORTON JR, W. E.; BENNION, P.; YANG, L. Cellular, molecular, and matrix changes in cartilage during aging and osteoarthritis. **J. Musculoskeklet Neuronal Interact.,** v. 6, n. 4, p. 379-381, 2006.

HUBER, M.; TRATTNIG, S.; LINTNER, F. Anatomy, biochemistry and physiology of articular cartilage. **Invest Radiol.,** v. 35, n. 10, p. 573-580, 2000.

HUDELMAIER, M.; GLASER, C.; ENGLMEIER, K. H.; REISER, M.; PUTZ, R.; ECKSTEIN, F. Age-related changes in the morphology on deformational behavior of knee joint cartilage. **Arthritis Rheum.,** v. 44, n. 11, p. 2556-2561, 2001.

HURSTING S. D.; LAVIGNE J. A.; BERRIGAN D.; PERKINS S. N.; BARRETT J. C. Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. **Annu Rev Med.,** v. 54, p. 131-152, 2003.

IBGE (FUNDAÇÃO INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Censo demográfico:** Brasil, 2010. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrossirius red staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J.,** v. 11, p. 447-455, 1978.

KAAB, M. J.; ITO, K.; CLARK, J. M.; NOTZLI, H. P. Deformation of articular cartilage collagen structure under static and cyclic loading. **J Orthop Res.,** v. 16, n. 6, p. 743-751, 1998.

KARVONEN, R. L.; NEGENDANK, W. G.; TEIGE, R. A.; REED, R. A.; MILLER, P. R.; FERNANDEZ, F. Factors affecting articular cartilage thickness in osteoarthritis and aging. **J Rheumatol.,** v. 21, n. 7, p. 1310-1318, 1994.

KASARAGOD, D. K.; LU, Z.; JACOBS, J.; MATCHER, S. J. Experimental validation of an extended Jones matrix calculus model to study the 3D structural orientation of the collagen fibers in articular cartilage using polarization-sensitive optical coherence tomography. **Biomedical Optics Express.,** v. 3, n. 3, p. 378-387, 2012.

KEMPSON, G. E.; SPIVETY, C. J.; SWANSOR, S. A. V.; FREEMAN, M. A. R. Patterns of cartilage stiffness on normal and degenerate human femoral heads. **J Biomech.,** v. 4, p. 597-609, 1971.

KERIN, A.; PATWARI, P.; KUETTNER, K.; COLE, A.; GRODZINSKY, A.; Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects. **Cell. Mol. Life Sci.,** v. 59, p. 27-35, 2002.

KIM, H. A.; SUH, D.; SONG, Y. W. Relationship between chondrocyte apoptosis and matrix depletion in human articular cartilage. **J Rheum.,** v. 28, n. 9, p. 2038-2045, 2001.

KRAUS, V. B.; HUEBNER, J. L.; GROOT, J.;BENDELE. A. The OARSI Histopathology Initiative - Recommendations for Histological Assessments of Osteoarthritis in the Guinea Pig. **Osteoarthr. Cartil.,** v. 18, n. 3, p. 35-52, 2010.

KUETTNER, K. E.; AYDELOTTE, M. B.; THONAR, E. J. Articular cartilage matrix and structure: a minireview. **J Rheumatol Suppl.,** v. 27, p. 46-48, 1991.

LEE, R.; KEAN, W. F. Obesity and knee osteoarthritis. **Inflammopharmacol.,** v. 20, p. 53-58, 2012.

LOGROSCINO, G.; SESSO, H. D.; PAFFENBARGER JR, R. S..; LEE, I. Body mass index and risk of Parkinson's disease: A prospective cohort study. **Am J Epidemiol.,** v. 166, n. 10, p. 1186-1190, 2007.

LOHMANDER, L. S.; IONESCU, M.; JUGESSUR, H.; POOLE, A. R. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. **Arthritis Rheum.,** v. 42, n. 3, p. 534-544. 1999.

LOHMANDER, L. S.; YOSHIHARA, Y.; ROOS, H.; KOBAYASHI, T.; YAMADA H. I.; SHINM, M. Procollagen II C-propeptide in joint fluid: changes in concentrations with age, time after joint injury and osteoarthritis. **J. Rheumatol.,** v.23, p.1765-1769, 1996.

LU, M.; HINSON, W. G.; TURTURRO, A.; ANSON, J.; HART, R. W. Cell cycle analysis in bone marrow and kidney tissues of dietary restricted rats. **Mech. Ageing Dev.,** v. 59, p. 111-121, 1991.

LU, M. H.; HINSON, W. G.; TURTURRO, A.; SHELDON, W.; HART, R. W. Cell proliferation by dell cycle analysis in young and old dietary restricted mice. **Mech. Ageing Dev.,** v. 68, p. 151-162, 1993.

LUTZ, W. K., Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis. **Muta. Res.,** v. 238, p. 287-295, 1990.

LOTHE, K.; SPYCHER, M. A.; RUTTNER, J. R. Human articular cartilage in relation to age, A morphometric study. **Exp Cell Biol.,** v. 47, n. 1, p. 22-28, 1979.

MAFFULLI, N.; KING, J. B. Effects of physical activity on some components of skelectal system. **Am J Sports Med.,** v. 13, n. 6, p. 393-407, 1992.

MANKIN, H. J. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. **N.Engl. J. Med.,** v. 291, p. 1335-1340, 1974.

MARI, R. B. **Efeitos da alimentação com diferentes níveis calóricos nos neurônios mioentéricos no cólon de ratos Wistar durante o processo de envelhecimento.** 2009. 83 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. Human chondrocytes senescence and osteoarthritis. **Biorheology.,** v. 39, p. 145-152, 2002.

MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. **Biorheology.,** v. 3, p. 257-264, 2002.

MARTIN, B.; MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S. Caloric restriction and intermittent fasting: two potential diets for successful brain aging. **Ageing Res Rev.**, v. 5, p. 332-353, 2006.

MATTSON, M. P. Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. **Annu Rev Nutr**., v. 25, p. 237-260, 2005.

MEACHIM, G. Effect of age on the thickness of adult articular cartilage at the shoulder joint. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 30, p. 43-46, 1971.

MOBASHERI, A. Role of chondrocytes death and hipocellularity in aging human cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis. **Med. Hypotheses,** v. 58, n. 3, p. 193-197, 2002.

MOLLENHAUER, J.; BEE, J. A.; LIZARBE, M. A. VON DER MARK, K. Role of anchorin CII, a 31,000-mol wt membrane protein, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. **J Cell Biol.,** v. 98, p. 1572-1579, 1984.

NEWTON, P. M.; MOW, V. O.; GARDNER, T. R.; BUCWALTER, L. A.; ALBRIGHT, J. P. The effect of Iifelong exercise on canine articular cartilage. **Am J Sports Méd.,** v. 25, n. 3, p. 282-287, 1997.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL) **Nutrient requirements of laboratory animals**. 4. ed. Washington: Academic Press, 1995. p. 11-79.

ODA, J. Y. **Estudo Morfoquantitativo das alterações decorrentes do envelhecimento na cartilagem articular da epífise distal do fêmur de ratos**. 2005. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ODA, J. Y.; MAIFRINO, L. B. M.; SOUZA, R. R. Variation in articular cartilage in rats between 3 and 32 months old. A histomorphometric and scanning electron microscopy study. **Biogerontology.,** v. 8, p. 345-352, 2007.

POOLE, A. R.; KOJIMA, T.; YASUDA, T.; MWALE, F.; KOBAYASHI, M.; LAVERTY, S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 391, p. 26-33, 2001.

POOLE, A. R., WEBBER, C.; PIDOUX, I.; CHOI, H.; ROSENBERG, L. C. Localization of a dermatan sulfate proteoglycan (DS-PGII) in cartilage and the presence of an immunologically related species in other tissues. **J Histochem Cytochem.,** v. 34, n. 5, p. 619-625, 1986.

POOLE, C. A.; AYAD, C.; GILBERT, R. T. Chondrons from articular cartilage. **J Cell Sci.,** v. 103, p. 1101-1110, 1992.

PORTO, G. S.; PEREIRA, J. N. B.; TIBÚRCIO, V. G.; STABILLE, S.R.; FARIA, H.G.; GERMANO, R.M.; MARI, R.B. Effect of caloric restriction on myenteric neuroplasticity in the rat duodenum during aging. **Auton. Neurosci.,** v. 168, n. 1, p. 43-47, 2012.

ROTH, V.; MOW, V. C. The intrinsic tensile behavior of bovine articular cartilage and its variation with age. **J. Bone Jint Surg.,** v. 62, n. 7, p. 1102-1117, 1980.

SALVATORE, C. A.; SCHREIDER, G. Pesquisas cariométricas no ciclo estral e gravídico. **Mem Inst Butantã,** v. 20, p. 39-78, 1947.

SAXON, L.; FINCH, C.; BASS, S.; Sports participation, sports injuries an osteoarthritis. **Sports Med.,** v. 28, n. 2, p. 123-135, 1999.

SOWERS, M. R.; KARVONEN-GUTIERREZ, C. A.; The evolving role of obesity in knee osteoarthritis. **Curr. Opin. Rheumatol.,** v. 22, n. 5, p. 533-537, 2010.

STOCKWELL, R. A. Lipid content of human costal and articular cartilage. **Ann Rheum Dis.**, v. 26, n. 6, p. 481-486, 1967.

STOCKWELL, R. A. The cell density of human articular and costal cartilage. **J. Anat.,** v. 101, p. 753-763, 1967.

VERZIJL, N.; DE GRROL, J.; BEM, Z. C.; BRAU-BENJAMIM, O.; MAROUDAS, A.; BANK, R. A.; Crosslinking by advanced glycation and products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage a possible mechanism through which age is a risk factor for ostearthritis. **Arth and Rheum.,** v. 46, p. 114-123, 2002.

VOLPI, M.; KATZ, E. P.; On the adaptive structures of the collagen fibrils of bone and cartilage. **J. Biomech.,** v. 24, n. 1, p. 67-77, 1991.

WANG, L.; KALU, D. N.; BANU, J.; THOMAS, J. B.; GABRIEL, N.; ATHANASIOU, K. Effects of ageing on the biomechanical properties of rat articular cartilage. **Proc. IMechE.** Part H: J. Engineering In Medicine**,** v. 220, p. 573-278, 2006.

WEINDRUCH, R.; WALFORD, R. L. Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: effect on life-span and spontaneous cancer incidence. **Science,** v. 215, n. 4538, p. 1415-1418, 1982.

WICK, G.; JANSEN-DURR, P.; BERGER, P.; BLASCO, I.; GRUBECK-LOEBSTIN, B. Diseases of aging. **Vacine**, v. 18, p. 1567-1583, 2000..

WLUKA, A. E.; WOLFE, R.; DAVID, S. R.; STUCKEY, S.; CICUTTINI, F. M. Tibial cartilage volume change in healthy postmenopausal women: a longitunal study. **Ann Rheum Dis.,** v. 63, p. 444-449, 2004.

WU, J. Z.; HERZOG, W. Elastic anisotropy of articular cartilage is associated with the microestrutures of collagen fibers and chondrocytes. **J Biomech.**, v. 35, n. 7, p. 931--942, 2002.

YANG, L.; CARLSON, S. G.; MCBURNEY, D.; MORTON, W. E. Multiple signais induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis. **J. Bio. Chem.,** v. 280, p. 31156-31165, 2005.

ANEXO A

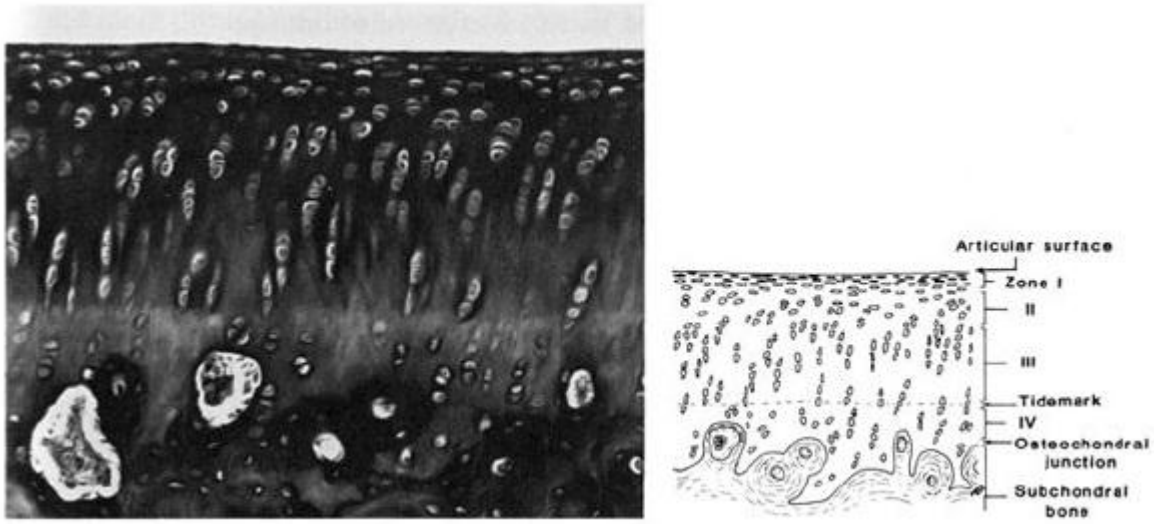
Tabela 1- Composição percentual e química das dietas experimentais de acordo com os níveis de energia

Ingredientes	**Unidade**	**Dieta A**	**Dieta B**
Milho	kg	42,711	-
Soja	kg	36,101	46,200
Trigo	kg	11,482	3,200
Fosfato Bicálcico	kg	2,035	2,700
Inerte	kg	-	23,750
Calcário	kg	0,136	0,300
Amido	kg	-	19,050
Óleo de soja	kg	2,735	-
Sal comum	kg	0,300	0,300
Premix Vitamínico[1]	kg	1,000	1,000
Premix Mineral [2]	kg	3,500	3,550
Composição analisada			
Energia bruta	Kcal/kg	3900	2700
Proteína bruta	%	22,0	22,0
Fibra bruta	%	4,0	3,0
Cálcio	%	0,70	0,9
Fósforo total	%	0,80	0,8

[1]Composição por kg do produto: Vit. A, 400.000 UI; Vit. D3, 100.000UI; Vit E, 7500mg; Vit. K1, 75mg; Vit. B12, 2500mcg; Ac. Fólico, 200mg; Ac. Nicotínico, 3000mg; biotina, 20mg; pantotenato de cálcio , 1600mg; pirodoxina-Hcl, 700mg; riboflavina, 600mg; tiamina Hcl, 600mg.
[2]Composição por kg do produto: boro, 14,26; cálcio, 142,94; cloro, 44,9; cobre, 172,41; cromo, 28,65; enxofre, 8,60; ferro, 1000mg; flúor, 28,72; fósforo, 44,61; iodo, 5,93mg; lítio, 2,85mg; magnésio, 14,48mg; manganês, 300mg; molibdênio, 4,32; níquel, 14,31; potássio, 102,81mg; selênio, 4,28mg; silício, 143,26mg; sódio, 29,38mg; vanádio, 2,87mg; zinco, 860mg.
Fonte: (MARI, 2009).

ANEXO B

Figura 1- Demonstração das zonas da cartilagem articular em comparativo entre esquema e corte histológico.



Fonte: (KRAUS et al., 2010).

APÊNDICE A

Tabela 2 - Médias das pesagens, seguidas pela significância estatística - São Paulo – 2012

Idade animal	SR (dieta A) $e^{\frac{-1,3}{t}}$	RC (dieta B) $e^{\frac{-2,6}{t}}$
6 meses	398a	396a
7 meses	495a	482a
8 meses	523a	463b
9 meses	535a	471b
10 meses	544a	483b
11 meses	550a	486b
12 meses	554a	506b
13 meses	553a	510b
14 meses	553a	512b
15 meses	554a	514b
16 meses	563a	512b
17 meses	570a	514b
18 meses	567a	514b

*Médias com letras diferentes no sentido de linha diferem ($p<0,05$) pelo teste de Tukey. Coeficiente de crescimento exponencial ($e^{(x/t1)}$).

APÊNDICE B

Tabela 11 - Demonstrativo das médias da proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular por área nos côndilos lateral e medial da tíbia entre os diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2012

Tíbia Colágeno (% área)				
Grupo	**Côndilo**			**N**
	Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	72,5 ± 11,3	78,9 ± 6,5	75,7 ± 8,7	5
SR	67,6 ± 11,0**	73,0 ± 8,8	70,3 ± 9,1	5
RC	81,7 ± 3,0*	68,8 ± 8,0	75,2 ± 5,5	5

* Significante em relação ao côndilo medial no RC (P<0,05); ** Significante em relação ao RC no côndilo lateral (P<0,05).

APÊNDICE C

Tabela 12 - Demonstrativo das médias da proporção volumétrica das fibras colágenas da matriz extracelular por área nos côndilos lateral e medial do fêmur entre os diferentes grupos avaliados, seguidas pelo desvio padrão e significância estatística - São Paulo – 2012

Fêmur Colágeno (% área)				
Grupo	**Côndilo**			**N**
	Lateral	**Medial**	**Bicondilar**	
C	60,4 ± 1,3**	63,8 ± 1,4	62,1 ± 0,6*	5
SR	44,7 ± 7***	43,8 ± 10,2#	44,3 ± 8,7##	5
RC	47,1 ± 15	52,1 ± 11,7###	49,6 ± 13,6	5

* Significante em relação ao SR bicondilar (P<0,001); ** Significante em relação ao C no côndilo medial (P<0,05); ***Significante em relação ao C no côndilo lateral (P<0,001); #Significante em relação ao C no côndilo medial (P<0,001); ##Significante em relação ao RC bicondilar (P<0,05); ###Significante em relação ao SR no côndilo medial (P<0,05).

APÊNDICE D

Tabela 13 – Análise qualitativa demonstrando os dados referentes aos tipos de colágeno encontrados ao longo das zonas superficial, média e profunda (ZS, ZM, ZP) da cartilagem articular da tíbia e do fêmur, relacionados com a imunohistoquímica nos três grupos estudados – São Paulo - 2012

Fêmur	**Grupo C**	**Grupo SR**	**Grupo RC**	**Tíbia**	**Grupo C**	**Grupo SR**	**Grupo RC**
ZS tipo colágeno	I, II	II, III	I, II, III	**ZS tipo colágeno**	I, II, III	II, III	I, II, III
ZM tipo colágeno	I, II	II, III	I, II, III	**ZM tipo colágeno**	II, III	I, II	I, II
ZP tipo colágeno	I, II	I, II, III	I, II, III	**ZP tipo colágeno**	I, II, III	I, II	I, II, III
Predominância colágeno II (Zona)	Todas	ZM ZP	Todas	**Predominância colágeno II (Zona)**	Todas	ZM	ZM ZP
Marcação Imunohistoquímica	=	≠	≠	**Marcação Imunohistoquímica**	=	≠	≠

= Marcação homogênea; ≠ Marcação Heterogênea.