WILLIAN GRASSI BAUTZ

**Análise da estrutura e padrão de expressão de lubricina, SMAD2
fosforilada na cadeia de ligação e colágeno tipo I na cartilagem articular
da mandíbula durante o envelhecimento**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Edson Aparecido
Liberti

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bautz, Willian Grassi

Análise da estrutura e padrão de expressão de
lubricina, SMAD2 fosforilada na cadeia de ligação e
colágeno tipo I na cartilagem articular da mandíbula
durante o envelhecimento / Willian Grassi Bautz. --
São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Edson Aparecido Liberti.

Descritores: 1.Articulação temporomandibular
2.Proteínas Smad 3.Cartilagem articular 4.Colágeno
tipo I 5.Lubricina 6.Proteoglicano 4
7.Envelhecimento

USP/FM/DBD-370/17

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/04/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 041/14 intitulado: **“Análise imunohistoquímica e ultra-estrutural da cartilagem articular da mandíbula de ratos Wistar idosos”** utilizará 30 animais da espécie rato, apresentado pelo Departamento de Fisiopatologia Experimental.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Edson Aparecido Liberti

Pesquisador (a) Executante: Willian Grassi Bautz

CEUA-FMUSP, 24 de Abril de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

DEDICATÓRIA

*Esta obra é dedicada aos meus amados
filhos, Mateus e Maria Isabel, à
minha querida esposa, Leticia, e à
minha adorada mãe, Sonia!*

AGRADECIMENTOS

À minha querida esposa, Leticia Nogueira da Gama de Souza Bautz, pelo amor, carinho, companheirismo e apoios científicos e emocional. Sem sua colaboração esse trabalho não teria se concretizado.

Aos meus amados filhos Mateus Gama Souza Bautz e Maria Isabel Gama Souza Bautz que chegaram na minha vida durante a realização dessa tese e foram o principal combustível para que eu pudesse finalizá-la. Propiciaram incríveis momentos de alegria, amor, carinho e felicidade. Vocês me ensinaram o que é o verdadeiro amor! Amo vocês!

À minha querida Mãe, Sonia Grassi Bautz, pelo amor incondicional, carinho e suporte. Deu-me a vida e a possibilidade de vivê-la em plenitude.

Aos meus queridos Diego Grassi Bautz (irmão), Junia Mara (cunhada), e Bernardo Bautz (meu sobrinho) pela amizade, carinho e incentivo.

Ao Professor e Amigo Dr. Edson Aparecido Liberti por ter-me recebido de braços abertos em seu Laboratório de Anatomia Funcional Aplicada à Clínica e à Cirurgia (LAFACC) (VQM) e pela orientação, paciência, compreensão, dedicação, apoio, amizade e valiosos ensinamentos, primordiais para a realização deste trabalho e para a minha formação como Anatomista. Um verdadeiro exemplo de Mestre!

A todos os meus Familiares, em especial aos meus queridos Tios: Pedro Graça, Alcimar Grassi, Delcimar Grassi, João Antônio Grassi, Maria Luiza Grassi e Marcio Grassi, pelo apoio, amizade, amor e por estarem sempre presentes nos momentos cruciais da minha vida.

À minha tia Norma Sueli (“tia Moma”) pelos momentos que passou na companhia de meus filhos me dando segurança e suporte para que pudesse realizar meu trabalho.

Aos meus sogros Geraldo Elizo e Heloísa, pelo carinho e incentivo na realização desse estudo.

Ao Professor e Amigo Dr. Rogério Albuquerque Azeredo (UFES) pelo incentivo, carinho, apoio, ensinamentos e amizade e, ainda, por iniciar-me no estudo da Anatomia Humana.

Ao Professor e amigo Dr. Luís Ronaldo Picosse pelos ensinamentos essenciais para minha formação e por integrar minha banca de qualificação.

Ao Professor e amigo Dr. Daniel Siqueira (UFES) pela amizade e ensinamentos.

Aos Funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela prontidão e auxílio na realização deste trabalho, em especial a Marta Maria da Silva Riguetti, Sebastião Aparecido Boleta, Sonia Regina Yokomizo, Cristiane Vitor Pinheiro, Maria Cristina dos Santos Faustino.

Ao Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez e Profa. Dra. Thelma Parada, por fazerem parte de minha banca de qualificação.

Aos Professores e amigos da Universidade Federal do Espírito Santo, Josemberg Baptista da Silva; Ricardo Eustáquio da Silva, Eduardo Henrique Beber e Breno Valentim Nogueira pelas discussões e sugestões valiosas para a realização deste trabalho.

Aos técnicos administrativos do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo: Maria do Carmo, Jarbas, Luciene, Viviane e Rafaela pela contribuição.

Aos Professores e Técnicos Administrativos do Departamento Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo que me apoiaram na realização deste trabalho

A Universidade Federal do Espírito Santo por conceder-me a possibilidade de afastar-me de minhas atividades e dedicar-me integralmente e exclusivamente ao doutorado.

Aos membros da Secretaria da Pós-graduação em Fisiopatologia Experimental da FMUSP, Sra. Tânia Regina de Souza, Sra. Vanda Mariscal, Sr. Igor Tolgyesi e Sra. Gisele Souza por se mostrarem sempre solícitos no desempenho de suas atividades.

À Profa. Dra. Elia Tamasso Espin Garcia Caldini, por aceitar ser minha orientadora enquanto aguardava a transferência para o Prof. Tit. Edson Aparecido Liberti.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta apresentação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	XVII
LISTA DE TABELAS	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	XXI
RESUMO.....	XXV
ABSTRACT.....	XXVII
1 INTRODUÇÃO.....	29
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	31
2.1 Envelhecimento: dados demográficos	31
2.2 Cartilagem articular da cabeça da mandíbula (CAM)	32
<i>2.2.1 Aspectos morfológicos da CAM durante a fase de crescimento da cabeça da mandíbula.....</i>	<i>32</i>
<i>2.2.2 Aspectos morfológicos da CAM na fase madura e no envelhecimento ...</i>	<i>33</i>
2.3 Conteúdo da matriz extracelular da CAM	37
<i>2.3.1 Colágeno tipo I.....</i>	<i>37</i>
<i>2.3.2 Proteoglicanos</i>	<i>39</i>
2.4 Lubricina e proteína da zona superficial: produtos do gene proteoglicano 4 (PRG4).....	40
2.5 SMADs: proteínas da via canônica da superfamília do TGF-β	46
2.6 A atividade condroprotetora do TGF-β através da via SMAD2/3	49

2.7	TGF-β regula a produção de lubricina	52
2.8	Fosforilação da cadeia de ligação da SMAD2 (p-SMAD2L).....	53
3	OBJETIVOS	55
3.1	Objetivo Geral	55
3.2	Objetivos Específicos.....	55
4	MÉTODOS.....	57
4.1	Modelo experimental	57
4.2	Microscopia de luz.....	58
4.3	Imuno-histoquímica.....	58
4.4	Análise qualitativa	60
4.5	Análise quantitativa	60
<i>4.5.1</i>	<i>Determinação da densidade total de células da CAM</i>	<i>60</i>
<i>4.5.2</i>	<i>Determinação da densidade de células p-SMAD2L.....</i>	<i>61</i>
<i>4.5.3</i>	<i>Determinação da porcentagem de células p-SMAD2L.</i>	<i>64</i>
4.6	Análise estatística.....	64
4.7	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	64
5	RESULTADOS	67
5.1	Análise qualitativa	67
<i>5.1.1</i>	<i>Aspectos morfológicos.....</i>	<i>67</i>
<i>5.1.2</i>	<i>Aspectos relativos ao conteúdo proteoglicano da CAM.....</i>	<i>73</i>

5.1.3	<i>Padrão de expressão imuno-histoquímica do colágeno tipo I.....</i>	79
5.1.4	<i>Padrão de expressão imuno-histoquímica da lubricina.....</i>	83
5.1.5	<i>Padrão de expressão imuno-histoquímica da p-Smad2L.</i>	87
5.1.6	<i>Associação dos padrões de expressão imuno-histoquímica da lubricina e p-SMAD2L.....</i>	87
5.2	Análise quantitativa	95
5.3	Aspectos ultraestruturais	96
5.3.1	<i>Condrócitos.....</i>	96
5.3.2	<i>Matriz territorial</i>	97
6	DISCUSSÃO.....	103
7	CONCLUSÕES.....	117
8	REFERÊNCIAS	119

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotomicrografia evidenciando as camadas que compõem a CAM de rato jovem em corte coronal	33
Figura 2 – Esquema da transmissão de sinal da superfamília do TGF- β	48
Figura 3 – Organograma da ação do TGF- β na CA saudável e na OA	52
Figura 4 – Metodologia aplicada na determinação da densidade total de células	62
Figura 5 – Metodologia aplicada na determinação da densidade de células p-SMAD2L	63
Figura 6 – Fotomicrografias dos cortes coronais da CAM dos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F)	69
Figura 7 – Fotomicrografias das alterações nas CAMs do grupo idoso	71
Figura 8 – Fotomicrografias dos cortes coronais da CAM dos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F) corados pelo método do azul de toluidina/fast green	75
Figura 9 – Fotomicrografias dos cortes coronais da CAM dos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F) corados pelo método da safranina-O/fast green	77
Figura 10 – Fotomicrografias da expressão de colágeno do tipo I na CAM dos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F)	81
Figura 11 – Fotomicrografias da expressão de lubricina nos terços lateral, intermédio e medial da CAM dos grupos jovem (A-C), adulto (D-F) e idoso (G-I)	85

Figura 12 – Fotomicrografias da expressão da p-SMAD2L na CAM de ratos jovens.....	89
Figura 13 – Fotomicrografias da expressão de p-SMAD2L nos grupos adulto (A-C) e idoso (D-F).....	91
Figura 14 – Associação entre a expressão da lubricina e p-SMAD2L nos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F)	93
Figura 15 – Representação gráfica da média ($\pm$ DP) da densidade total de células, da densidade de células p-SMAD2L e da porcentagem de células p-SMAD2L.	96
Figura 16 – Micrografia eletrônica de transmissão dos condrócitos da CAM ...	99
Figura 17 – Micrografia eletrônica de transmissão da camada madura da CAM	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre as idades do rato e do homem	57
Tabela 2 – Média ($\pm$ DP) da densidade total de células da CAM, densidade de células p-SMAD2L e percentagem de células p-SMAD2L.	95

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ActR	Receptor de Ativina
ALK	Cinase semelhante ao receptor da ativina, do inglês, “activin receptor-like kinase”
Agc	Gene para agrecana
ATM	Articulação temporomandibular
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMPR	Receptor de BMP
CA	Cartilagem articular
CAM	Cartilagem articular da cabeça da mandíbula
CDK	Cinases dependentes de ciclina
Co-SMAD	SMAD cofator
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
Da	Dalton
DAB	3’3-Diaminobenzidina
DP	Desvio padrão
ECM	<i>Extracellular matrix</i> (inglês)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico
ERK1	Cinases reguladas por sinal extracelular 1
ERK2	Cinases reguladas por sinal extracelular 2

et al.	e outros
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GAG	Glicosaminoglicano
GDF	Fatores de desenvolvimento e crescimento
GSK	Glicogênio sintase cinase
HCl	Ácido clorídrico
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (inglês)
HtrA1	Protease essencial para sobrevivência em elevadas temperaturas A1, do inglês: <i>high temperature requirement A1 serine protease</i>
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
Ihh	<i>Indian hedgehog</i> (inglês)
IL-1 β	Interleucina 1 beta
I-SMAD	SMADs inibitórias
JNK	c-Jun N-terminal cinase
KDa	Quilo Dalton
LCA	Ligamento cruzado anterior do joelho
LGP	Glicoproteína lubrificante
MAPK	Proteínas cinases ativadas por mitógeno
MCC	<i>“Mandibular condylar cartilage”</i> (inglês)
MEC	Matriz extracelular

MIS	Substância Inibidora Mülleriana
MISR	Receptor de MIS
MMP	Metaloproteinases da matriz
Mpa	Megapascal
OA	Osteoartrite
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
p38	Proteína p38
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	Enzima fosfatidilinositol-3-cinase
PRG4	Proteoglicano 4
PRP	Plasma rico em plaquetas
p-SMAD	R-SMAD fosforilada na cadeia C-terminal
p-SMAD2	SMAD2 fosforilada na cadeia C-terminal
p-SMAD2L	SMAD2 fosforilada na cadeia de ligação
p-valor	Valor de probabilidade
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RI	Receptores transmembranas serina/treonina cinases tipo I
RII	Receptores transmembranas serina/treonina cinases tipo II
R-SMAD	SMADs reguladas pelo receptor

Ser Serina

SMAD Família de 8 proteínas envolvidas na via de sinalização do TGF- β . Esse termo deriva da junção da abreviatura de duas proteínas homólogas; a MAD – mãe contra a proteína decapentaplégica (*mothers against decapentaplegic*) descoberta na *Drosophila*, e a SMA, do gene *sma* para tamanho corporal pequeno (*small body size*) presente no *Caenorhabditis elegans*

SZP Proteína da Zona Superficial

T. A Temperatura ambiente

TGF- β Fator de crescimento transformador beta

T β RI Receptor de TGF- β tipo I

T β RII Receptor de TGF- β tipo II

Thr Treonina

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa

VEGF Fator de crescimento endotelial e vascular

WHO *World Health Organization* (inglês)

Wnt *Wingless type* (Inglês)

RESUMO

Bautz WG. *Análise da estrutura e padrão de expressão de lubricina, SMAD2 fosforilada na cadeia de ligação e colágeno tipo I na cartilagem articular da mandíbula durante o envelhecimento* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A cartilagem articular da cabeça da mandíbula (CAM) é constituída por uma cartilagem secundária recoberta por tecido conjuntivo fibroso e, portanto, definida como fibrocartiláginea. Ela é constantemente submetida a forças de compressão e cisalhamento decorrentes da mastigação necessitando de lubrificação e capacidade de reparo. O envelhecimento é considerado um dos principais fatores para o aparecimento de alterações degenerativas nas articulações sinoviais. A lubricina é reconhecidamente um proteoglicano encontrado nas cartilagens articulares cuja função primordial é a lubrificação limítrofe. A via SMAD2, tem sido associada à capacidade de manutenção e reparo da cartilagem, e a sua fosforilação na cadeia de ligação (p-SMAD2L) foi relacionada ao aumento no tempo de fosforilação na cadeia C-terminal (p-SMAD2) e da transcrição gênica. **Objetivo:** Estudar as alterações morfológicas da CAM e as expressões da lubricina, p-SMAD2L e do colágeno tipo I no envelhecimento. **Métodos:** cortes coronais da CAM de ratos wistar com 2, 12 e 24 meses de vida foram corados pelas técnicas da hematoxilina e eosina, azul de toluidina e safranina-O. A imuno-histoquímica foi usada para detectar a localização da lubricina, p-SMAD2L e colágeno tipo I. **Resultados:** Notou-se modificações estruturais atribuídas ao processo natural do envelhecimento da CAM. Ainda, se verificou um aumento do colágeno tipo I nas camadas mais profundas e cartilaginificação da matriz extracelular (MEC) nas camadas superficiais. No grupo idoso, houve redução na concentração de proteoglicanos, na expressão da lubricina e na densidade e porcentagem de células p-SMAD2L. **Conclusões:** a CAM sofre modificações com o envelhecimento, inclusive degenerativas, e diminui sua capacidade de lubrificação e reparo em virtude da menor expressão da lubricina e p-SMAD2L. Sugere-se que a p-SMAD2L está envolvida na produção e acúmulo da lubricina na CAM.

Descritores: articulação temporomandibular; proteínas Smad; cartilagem articular; colágeno tipo I; lubricina; proteoglicano 4; envelhecimento

.

ABSTRACT

Bautz WG. *Analysis of the structure and expression of lubricin, SMAD2 phosphorylated at linker regions and type I collagen in mandibular condylar cartilage in aging* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

The mandibular condylar cartilage (MCC) consists of a secondary cartilage covered by fibrous connective tissue and, therefore, defined as fibrocartilage. It is constantly subjected to compression and shear forces resulting from chewing requiring lubrication and repair capability. Aging is considered one of the main factors for the appearance of degenerative changes in synovial joints. Lubricin is a proteoglycan found in articular cartilages whose primary function is boundary lubrication. SMAD2 signaling pathway has been associated with cartilage maintenance and repair, and its phosphorylation in the linker region (p-SMAD2L) was related to the increase in half-life of C-terminal phospho-SMAD2 (p-SMAD2) and gene transcription. **Objective:** To study the morphological alterations of MCC and the expressions of the lubricin, p-SMAD2L and type I collagen in aging. **Methods:** Coronal sections of the MCC from wistar rats with 2, 12 and 24 months old were stained with hematoxylin and eosin, toluidine blue and safranin-O. Immunohistochemistry were used for detection of lubricin, p-SMAD2L and type I collagen. Also, the total cell density, p-SMAD2L cells density and percentage were determined. **Results:** Structural modifications of the MCC related with natural aging process were observed. An increase in the expression of type I collagen in the deeper layers and “cartilaginification” of the extracellular matrix (ECM) in the superficial layers were detected. In the old group, it was observed a reduction in proteoglycan content, in the expression of the lubricin and in the density and percentage of positive cells for the p-SMAD2L. **Conclusion:** MCC undergoes structural and degenerative modifications with aging and decreases its lubrication and repair capacity due to the lower expression of the lubricin and p-SMAD2L. This study suggests that p-SMAD2L is involved in the production and accumulation of the lubricin in MCC.

Descriptors: temporomandibular joint; Smad protein; cartilage, articular; collagen type I; lubricin; proteoglycan 4; aging

1 INTRODUÇÃO

A articulação temporomandibular (ATM) é a articulação sinovial entre a fossa mandibular e o tubérculo articular do osso temporal, superiormente, e a cabeça da mandíbula, inferiormente^{1,2}. Logo, é construída por acidentes ósseos que se formam a partir da ossificação intramembranosa cujas faces articulares são revestidas por uma cartilagem articular (CA) secundária, que aparece entre a décima e a décima-quarta semana de vida intrauterina, recoberta por uma camada fibrosa derivada do perióstio³. Ainda, diferentemente das CAs da maioria das demais articulações sinoviais que são remanescentes de cartilagem hialina do modelo cartilaginoso primordial dos ossos e nunca tomam parte no processo de crescimento,² a cartilagem articular da cabeça da mandíbula (CAM) é uma estrutura fibrocartilaginosa⁴ responsável pelo crescimento pré e pós-natal do processo condilar e de suas adaptações anatômicas e biomecânicas^{3,5}.

A CAM é submetida a forças funcionais, compressivas e friccionais, resultantes dos complexos movimentos mandibulares que incluem rotação e translação⁶⁻⁸. Assim, para manter a sua integridade, é essencial um baixo coeficiente de atrito obtido, em parte, pela lubrificação das faces articulares. A lubrificina é um proteoglicano presente em diversos tecidos que compõem as articulações sinoviais, onde atua, principalmente, como um lubrificante limítrofe. É considerada um fator crítico para manutenção da função e homeostase articular, sendo sua ausência relatada em diferentes modelos experimentais de osteoartrite (OA), tanto na ATM quanto em outras articulações⁹⁻¹².

O fator de crescimento transformador beta (TGF- β), através de sua via de sinalização, SMADⁱ2/3, desempenha um papel essencial na manutenção e

ⁱ SMAD – Família de 8 proteínas envolvidas na via de sinalização do TGF- β . Esse termo deriva da junção da abreviatura de duas proteínas homólogas: a MAD – mãe contra a proteína decapentaplégica (“*mothers against decapentaplegic*”) descoberta na *Drosophila*, e a SMA, do gene *sma* para tamanho corporal pequeno (“*small body size*”) presente no *Caenorhabditis elegans*.

reparo da CA¹³ e na produção e acúmulo de lubricina em culturas monocamadas e explantes de diversas células e tecidos articulares^{14–20}.

A OA é a doença articular com maior incidência na população. É uma doença degenerativa, caracterizada pela degradação da CA, fibrose da membrana sinovial, formação de osteófitos e esclerose do osso subcondral, resultando em edema, dor, rigidez na articulação e perda da mobilidade²¹. Tem como fatores de risco a predisposição genética, etnia, sexo feminino, obesidade, trauma e estresse mecânico^{21–24}, sendo que, o principal para o início e progressão da doença é o **envelhecimento**^{25,26}.

A prevalência da OA aumenta com a idade, não importando qual articulação está sendo estudada, podendo afetar mais de um terço da população com mais de 40 anos e, ainda, chegar a 75% das pessoas com mais de 65 anos. Sua incidência aumenta rapidamente após os 40 anos de idade²². As estimativas são de que 9,6% dos homens e 18% das mulheres com mais de 60 anos apresentam sintomas da doença, no mundo²¹, sendo que, 80% desses tem limitações no movimento e 25% são incapazes de realizar suas atividades²⁷.

Diversos componentes celulares e da matriz extracelular (MEC) tem sido alvo de estudos para elucidar a relação entre o envelhecimento e a etiologia da OA, não só na ATM como em outras articulações. Porém, o real mecanismo ainda não está totalmente esclarecido. Para isso, é necessário conhecer como as alterações decorrentes do processo natural de envelhecimento influenciam a população celular e o conteúdo da MEC nas diferentes camadas que compõem a CA. Como parte disso, pretende-se investigar a expressão de lubricina e SMAD2, envolvidas na manutenção da CAM, bem como, do colágeno do tipo I, um dos componentes da MEC diretamente relacionado a resistência mecânica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Envelhecimento: dados demográficos

De acordo com a Divisão de População da Organização das Nações Unidas²⁸ (ONU) a população mundial atingiu a marca de 7,3 bilhões em julho de 2015. Desse número, 26% eram de pessoas com menos de 15 anos, 62% entre 15 e 59 anos e 12% maiores de 60 anos (aproximadamente 900 milhões). Atualmente, a população mundial cresce num ritmo de 1,18% ao ano e deverá alcançar a marca de 8,5 bilhões em 2030 e ultrapassar os 9,7 bilhões em 2050. Esse aumento, é fruto principalmente do aumento da expectativa de vida, e traz como consequência um envelhecimento da população. Dados da Organização Mundial da Saúde²⁹ (OMS), em 2015, mostraram que pela primeira vez na história da humanidade a maioria das pessoas tinha a expectativa de viver além dos 60 anos de idade. Globalmente, a expectativa de vida ao nascimento deve aumentar de 70 anos entre 2010 e 2015, para 77 anos entre 2045 e 2050²⁸.

O envelhecimento da população tem sido marcante em todo o mundo, e progride mais rapidamente nos países desenvolvidos. O número de pessoas idosas tende a alcançar 1,4 bilhão em 2030 e 2,1 bilhões em 2050. Em 2015, o Brasil era o quinto país mais populoso do planeta ultrapassando os 207 milhões de habitantes. Desses, 23% eram pessoas menores de 15 anos, 65,2% com idade entre 15 e 59 anos, e 11,7% maiores de 60 anos, com média de idade de 31,3 anos. A perspectiva é de que em 2050 esse número supere os 238 milhões com 15% de pessoas menores de 15 anos, 55,7% com idade entre 15 e 59 anos e, 29,3% maiores de 60, com média de idade de 44,8 anos²⁸. De acordo com esses dados, em 2050, teremos no Brasil quase o dobro de pessoas com mais de 60 anos do que jovens com menos de 15 anos de idade.

2.2 Cartilagem articular da cabeça da mandíbula (CAM)

A CA reveste a face articular dos ossos que compõem as articulações sinoviais fornecendo uma superfície extremamente lisa e resistente, destituída de pericôndrio e banhada pela sinóvia, permitindo movimentos quase sem fricção, com coeficiente de atrito entre 0,01 – 0,02 que vai diminuindo à medida que a carga aumenta. É construída para resistir às grandes forças de compressão e cisalhamento, especialmente durante o movimento² e deve ser capaz de fazê-lo durante anos²⁵.

A CAM difere da maioria das CAs de outras articulações sinoviais em seus aspectos embriológicos; ontogênicos, crescimento pós-natal, e arquitetura histológica³⁰. Em termos estruturais, a ATM se diferencia em dois aspectos: 1 - suas faces articulares são revestidas por fibrocartilagem, também presente nas articulações acromioclavicular e esternoclavicular³¹, ao passo que as demais são de cartilagem hialina; 2 – apresenta um disco articular, também fibrocartilaginoso, separando a cavidade articular em dois compartimentos: supradiscal e infradiscal^{32,33}.

2.2.1 Aspectos morfológicos da CAM durante a fase de crescimento da cabeça da mandíbula

A CAM é composta por camadas determinadas pelos diferentes conteúdos celulares e componentes da MEC⁵. Durante o período de crescimento da cabeça da mandíbula, ela acumula em sua estrutura aspectos semelhantes ao da lâmina epifisial e aspectos de uma CA qualquer. Está constituída por cinco camadas e uma zona de erosão na frente de ossificação. As camadas são: *camada fibrosa* composta por poucos e achatados fibroblastos inseridos em um tecido conjuntivo fibroso; *camada proliferativa* de células pequenas com formato poligonal e com poucas fibras colágenas; *camada de transição* com células achatadas sem gotículas lipídicas no citosol; *camada madura* com condrócitos em formato ovoide, rodeadas por grande quantidade de matriz cartilaginosa e;

camada hipertrófica localizada na transição com o tecido ósseo, apresenta células hipertróficas com estruturas citoplasmáticas desorganizadas^{34–37} (Figura 1).

Figura 1 – Fotomicrografia evidenciando as camadas que compõem a CAM de rato jovem em corte coronal

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Observe as camadas que compõem a CAM em fase de crescimento: Fi – *camada fibrosa*; Pr – *camada proliferativa*; Tr – *camada de transição*; Ma – *camada madura*; Hi – *camada hipertrófica*. HE. Barra de escala: 20µm

2.2.2 Aspectos morfológicos da CAM na fase madura e no envelhecimento

A ossificação endocondral da CAM é mais rápida na fêmea do que em machos, portanto, as alterações com a idade, ocorrem em tempos e velocidade

diferentes em relação ao sexo. O processo de adelgaçamento da CAM de ratos com a idade ocorre durante o segundo e terceiro mês de vida em fêmeas e se prolonga até o quarto mês em machos³⁸. Em geral, após a maturação do processo condilar da mandíbula há um aumento na espessura do osso subcondral, o qual também se torna mais compacto e com menos e menores espaços vasculares na interface cartilagem/osso^{38,39}.

Após finalizado o período de crescimento (aproximadamente 20 anos para mulheres e 30 para os homens), a CAM apresenta-se composta de forma semelhante a uma articulação sinovial qualquer, exceto pelo fato de ser fibrocartilágnea^{39,40}. A espessura total da CAM³⁷ e o número de condrócitos diminuem com a idade⁴¹. Ela está composta por três camadas³¹ sem limites bem definidos, mas com uma gradual transição de uma para outra³⁴⁻³⁶. São elas: *camada fibrosa*; *camada proliferativa* e *camada madura*.

A *camada fibrosa* sofre um processo de modificação estrutural gradual com a idade, exibindo aumento de áreas de fibrocartilagem com fibras paralelas e consequente diminuição de áreas de tecido conjuntivo fibroso^{40,42}. Seu crescimento se dá pela atividade mitótica de seus fibroblastos e pela produção celular da *camada proliferativa*. Nos idosos, exibe aumento nas alterações degenerativas como: desarranjo das fibras colágenas e fibrilação⁴³, semelhante ao que ocorre no joelho⁴⁴.

A *camada proliferativa* atua como um importante reservatório de células precursoras de condrócitos das camadas subjacentes⁵, e portanto, desempenham um papel importante no crescimento e na remodelação da CAM que leva a alterações na sua espessura e forma. Diferentes regiões da *camada proliferativa* podem exibir diferentes graus de densidade celular, o que está relacionado aos diferentes tipos de estímulos biomecânicos aos quais estão submetidas⁴⁵. Com o envelhecimento ela sofre uma diminuição da densidade celular⁴³, aumento da quantidade de fibras colágenas e de áreas de fibrocartilagem e, cada vez menos se apresenta como uma camada bem delimitada. Essas alterações são progressivas e avançam até a senilidade^{39,40,42}.

A *camada madura* restringe-se as partes anterior e média da CAM com predomínio de tecido fibrocartilaginoso e espessas fibras colágenas que se inserem radialmente no osso subcondral^{40,42}. Ainda, há aparente redução no número de condrócitos⁴³. A *camada hipertrófica* diminui progressivamente de espessura e desaparece após os 30 anos, no homem^{40,42} e entre o terceiro e quarto mês nos ratos³⁸.

Os condrócitos passam a exibir fenótipo de senescência que incluem: diminuição no comprimento do telômero e aumento na expressão de β -galactosidase, uma enzima marcadora da senescência⁴⁶. Ainda, diminuem sua atividade sintética e habilidade de manutenção da MEC e, também, produzem proteoglicanos menores e mais irregulares⁴⁷. Uma outra característica da idade é o acúmulo de espécies de oxigênio reativo e de produtos da glicação avançada (uma reação não enzimática entre açúcares reduzidos, como a glicose, frutose ou ribose e, grupos amino livres de proteínas, como resíduos de lisina e arginina, lipídeos e/ou ácidos nucleicos) que nos condrócitos aumentam a produção de citocinas inflamatórias, diminuem a produção de colágeno tipo II, e aumentam a expressão de metaloproteinases da matriz (MMP). Além disso, na MEC, esses produtos aumentam as ligações cruzadas na trama de colágeno (pentosidina), aumentando sua dureza e, conseqüentemente, tornam a CA mais friável e susceptível ao estresse mecânico^{25,47-49}.

Essas alterações nos condrócitos e nos componentes da MEC da CA, com a idade, diminuem suas propriedades mecânicas e deixa-a susceptível a degeneração⁵⁰. Quase a metade dos indivíduos com mais de 75 anos apresentam lesões degenerativas da ATM⁵¹. Ainda, mudanças na MEC e células da CA, presumivelmente, agravam um ao outro, uma vez que, uma MEC alterada eleva o estresse mecânico nas células, enquanto que a perda ou disfunções das células leva a deficiência na síntese da MEC, aumenta a degradação e dificulta sua regeneração⁵².

O potencial de resposta à estímulos de compressão mecânica foi reduzido em culturas explantes da CA de bovinos idosos, com menor produção de componentes da MEC (colágeno tipo II, fibronectina e perlecana) e de fatores

de crescimento (fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e proteína morfogenética óssea tipo dois (BMP-2)). Ainda, forças de compressão dinâmica excessivas (12MPa) promoveram fissuras verticais que se aprofundaram até a camada média provocadas, provavelmente, pela maior dureza e menor capacidade de deformação das CAs idosas⁵³.

Em joelhos de ratos com 2 anos de idade, a CA mostrou alterações com padrão semelhantes ao da OA: aparecimento de fissuras, lacunas aumentadas sem núcleos correspondente, aumento do número de grupos isógenos (*clusters*), avanço da frente de ossificação em direção à face articular, diminuição no número de condrócitos, diminuição na expressão de colágeno tipo II e aumento da expressão de MMP-13⁵⁴ a qual está associada à degeneração e a OA³⁵.

A CAM de idosos exibiu aumento no desarranjo das fibras colágenas, fibrilação na *camada fibrosa*, aparente redução no número de células mesenquimais indiferenciadas na *camada proliferativa* e de condrócitos na *camada madura*⁴³. Ainda, diversos componentes da MEC tiveram sua expressão reduzida, como por exemplo: colágenos tipos I, II, IV, V; fibronectina e seu receptor e laminina⁵⁵.

Além da variação temporal (desenvolvimento/idade), existe também uma variação regional na distribuição dos componentes da MEC da CAM⁵⁶. A parte anterior e média da CAM, regiões submetidas às forças de compressão e cisalhamento, diferem profundamente em relação a parte posterior após a maturação. Enquanto que nas duas primeiras (anterior e média) as *camadas fibrosa, proliferativa e madura* estão presentes, na parte posterior, é possível observar apenas duas camadas: uma com tecido conjuntivo denso e outra subjacente, semelhante a *camada proliferativa*⁴⁰.

A CAM também se modifica em resposta ao estresse mecânico a que é submetida ao longo do tempo. Uma dieta mais dura resulta em aumento na espessura da CAM de animais⁵⁷⁻⁵⁹. A perda de suporte oclusal posterior leva a um aumento na expressão de colágeno tipo II, interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF) na CAM⁶⁰. O desvio lateral da

mandíbula também gera uma sobrecarga na CAM de ambos os lados, com diminuição na expressão de componentes da MEC (agrecana e colágeno tipo II) na CAM ipsilateral compatível com o que ocorre quando forças excessivas são impostas à ATM, gerando um fenótipo de degeneração⁶¹.

2.3 Conteúdo da matriz extracelular da CAM

As células são as responsáveis pela homeostase da cartilagem através da produção dos componentes da MEC⁴⁷ que, por sua vez, são responsáveis pelas propriedades elásticas e de resiliência da CA. A MEC é dinâmica e está continuamente exposta a fatores anabólicos e catabólicos. Ela consiste em **água** (60%-80%), **colágeno**, **proteoglicanos**, **glicoproteínas estruturais**, **ácido hialurônico (AH)**, poucos **lipídeos** e **componentes inorgânicos**⁶². As células da fibrocartilagem sintetizam a MEC tanto no período de crescimento, quanto no estado maduro. Assim, ela é capaz de responder à estímulos externos como: forças mecânicas, alterações nutricionais, variações de hormônio e fatores de crescimento^{63(p191)}.

2.3.1 Colágeno tipo I

O colágeno consiste em cerca de 2/3 da massa da CA desidratada⁶⁴. Ele forma uma rede tridimensional que confere a CA sua forma, estabilidade, resistência à tensão e cisalhamento^{31,62,65} e, contrabalanceia a força osmótica por turgor determinada pela alta capacidade hidrofílica dos proteoglicanos⁶².

Em relação ao tipo de colágeno, o tipo I é encontrado em todas as camadas da CAM^{5,66}, o que indica um ponto diferencial para as demais CAs, sendo essas compostas predominantemente por fibras colágenas do tipo II. Durante o crescimento, em ratos, o colágeno tipo I é fortemente evidente na *camada fibrosa* e fracamente nas demais camadas, sendo que nas *camadas madura e hipertrófica* ele é encontrado na periferia dos condrócitos e condrócitos

hipertróficos, respectivamente^{67,68}. Sinais positivos de hibridização para colágeno tipo I são observados em células de todas as camadas da CAM, exceto naquelas da *camada hipertrófica*. Em ratos adultos, os sinais ficam mais fracos na *camada fibrosa* e são marcantes nas *camadas proliferativa e madura*³⁴. Em CAM de macacos no fim da adolescência, os sinais para colágeno tipo I são fracamente observados na *camada fibrosa* e intensos na *camada proliferativa*⁵⁶.

Na CAM, as fibras colágenas formam semiarcos, inicialmente arranjados paralelamente à superfície articular e em seguida se aprofundando na cartilagem num trajeto oblíquo ou vertical terminando de forma perpendicular na junção com o osso subcondral³⁷. Durante o movimento mandibular, a CAM sofre uma força de cisalhamento devido à natureza incongruente das superfícies articulares da ATM, que quando excessiva, pode promover danos irreversíveis na cartilagem⁶⁵. A presença do colágeno tipo I na constituição da *camada fibrosa*, com sua organização principalmente disposta no sentido anteroposterior, confere a CAM uma maior capacidade de resistir às forças de tensão do que a cartilagem hialina e, também, é importante para a pressurização do fluido intersticial nas camadas subjacentes da CAM reduzindo a deformação decorrente das forças de compressão e fricção⁶⁹. Nas camadas mais profundas, mesmo ainda estando presentes feixes de fibras colágenas do tipo I, a resistência a tensão é bem menor. Nessas camadas, as fibras colágenas tipo I parecem ser importantes na resistência a forças de cisalhamento na interface da camada superficial com as demais, e assim, evitarem o deslocamento de uma sobre a outra⁶⁹.

O colágeno tipo II está presente apenas nas *camadas madura e hipertrófica* da CAM em crescimento, sendo mais intenso na primeira^{56,57,59,66–68,70}. A quantidade de colágeno tipo II na *camada madura* também varia de acordo com a região da CAM, sendo mais evidente nas partes anterior e média do que na posterior⁶⁸. Sinais positivos de hibridização para colágeno tipo II, foram fortemente exibidos nas células das *camadas madura e hipertrófica* durante o crescimento e apenas na *camada madura* em CAM pós-crescimento³⁴. Em joelhos de humanos idosos, o dano inicial para o colágeno tipo II, ocorre na camada superficial e parte superior da camada média, se aprofundando com o

aumento da degeneração, sempre ao redor dos condrócitos, implicando-os no processo de desnaturação do colágeno⁷¹.

A marcação para colágeno tipo III é apenas fracamente observada e somente ocorre na *camada fibrosa*^{56,70}.

O colágeno tipo X desempenha um importante papel na ossificação endocondral⁷². Está restrito às células da *camada hipertrófica* nos ratos em crescimento, e em poucas células na parte profunda da *camada madura* após a maturação^{34,59,73}.

2.3.2 Proteoglicanos

Os proteoglicanos constituem de 20% a 40% da massa desidratada da cartilagem hialina. Estão localizados internamente a rede de colágeno, ao qual estão ligados mecanicamente e quimicamente^{62,65}. São moléculas com um núcleo proteico ligado covalentemente a múltiplas cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) sulfatados, principalmente, sulfato de condroitina e sulfato de queratana mas também podendo ser sulfato de dermatana e sulfato de heparana⁵⁰. Essas moléculas parecem escovas de limpar tubos, onde a proteína representa a parte central e as moléculas de GAGs correspondem as cerdas da escova⁴. Formam um agregado molecular enorme (medindo até 4µm) através de ligações não covalentes com uma única molécula de ácido hialurônico, uma GAG de até 25 mil unidades dissacarídicas não-sulfatadas repetidas⁷⁴. São responsáveis por manter a resistência a compressão, resiliência e rigidez da CA⁵⁰.

As GAGs são cadeias polissacarídicas não-ramificadas compostas de unidades dissacarídicas repetidas. São chamadas assim porque um dos dois açúcares no dissacarídeo repetido é sempre um amino açúcar (N-acetilglucosamina ou N-acetilgalactosamina) o qual na maioria das vezes é sulfatado. O segundo açúcar é, normalmente, um ácido urônico (glucurônico ou idurônico). As altas densidades de cargas negativas, decorrentes dos grupos

sulfato e carboxil dos carboidratos, atraem uma nuvem de cátions que são osmoticamente ativos, fazendo com que grande quantidade de água seja absorvida pela matriz (água de solvatação) criando uma pressão por turgor, que permite que a matriz suporte forças de compressão⁷⁴. Na CA, a pressão de turgor é contrabalanceada pela rede de fibras colágenas^{62,69}.

Quando forças compressivas agem sobre a CA, a pressão hidrostática interna excede a pressão por turgor e o líquido intersticial é expulso da MEC. Esse processo acaba por contribuir com a lubrificação da face articular⁶², e também, por gerar uma força de repulsão entre as cargas negativas das GAGs na MEC, a qual, é essencial para a resiliência da CA. Cessada a carga, a água é atraída novamente pelos proteoglicanos, a qual leva junto com ela gases e nutrientes presentes na sinóvia⁴.

A principal proteoglicana presente na MEC da CAM é a agrecana. Durante o período de crescimento, ela está presente nas *camadas madura e hipertrófica*, porém, com o passar do tempo, a intensidade da marcação para essa molécula diminui³⁶. Além dela, a decorina está presente principalmente nas camadas mais profundas na CAM, e se torna mais abundante no adulto⁷⁵ e a lubricina, está presente nas camadas mais superficiais⁷⁶.

2.4 Lubricina e proteína da zona superficial: produtos do gene proteoglicano 4 (PRG4)

Radin et al.⁷⁷ e Swann e Radin⁷⁸ observaram que a sinóvia de bovinos apresentava uma fração glicoproteica, livre de hialuronato, responsável pela lubrificação articular. Entre os componentes dessa fração, a glicoproteína lubrificante I (LGP-I) foi identificada como uma molécula com proporções iguais de peptídeos e carboidratos (43% e 44%, respectivamente) com massa molecular de 227,5KDa, e responsável pela característica de lubrificação da sinóvia⁷⁹. Após, Swann et al.⁸⁰ sugeriram o uso do termo “Lubricina” em referência à LGP-I, devido sua propriedade de lubrificante limítrofe (do inglês “*boundary lubrication*”). A concentração de lubricina encontrada na sinóvia de

joelhos de bovinos foi de 14,3mg/ml e de 29mg/ml em humanos portadores de disfunções articulares⁸¹.

Assim, a lubricina foi definida como uma glicoproteína semelhante à mucina com múltiplos domínios proteicos. Pós-tradução, ela é O-glicosilada com $\beta(1-3)$ -Gal-GalNAcⁱ, incompletamente coberta com NeuAcⁱⁱ⁷⁹⁻⁸¹. Essa forma pós-tradução exibe alta carga negativa e, conseqüentemente, alto poder de hidratação o qual é essencial para que desempenhe sua função de lubrificação limítrofe⁸².

Mais tarde, Schumacher et al.⁷⁶ descreveram uma proteoglicana secretada por condrócitos da camada superficial da CAs de joelho bovinos, com massa molecular de 345KDa e contendo poucas cadeias de sulfato de condroitina e sulfato de queratana (menos do que 10% em massa) nomeando-a de Proteína da Zona Superficial (SZP) (do inglês: “*superficial zone protein*”). Posteriormente, Flannery et al.¹⁴ constaram que a SZP é homóloga da proteína precursora do fator estimulante de megacariócito e, apresenta um eixo central com 2 domínios semelhantes à mucina ricamente O-ligado a oligossacarídeos: o maior com repetições KEPATTT/Pⁱⁱⁱ e o menor com repetições XXXTTX^{iv}; ladeado por domínios terminação amino e carboxila (N- e C-terminal), ricos em cisteína, que são homólogos aos domínios somatomedina B e hemopexina da vitronectina, respectivamente. Esta molécula ainda apresenta sítios potenciais para oligossacarídeos N-ligados e um sitio (...DEAGSG^v...) com potencial de ligação à GAG (sulfato de condroitina)¹⁴.

Atualmente, sabe-se que a lubricina, a SZP, o precursor do fator de estimulação de megacariócitos^{83,84} e a hemangiopoietina⁸⁵ são diferentes produtos da expressão do gene Proteoglicano 4 (PRG4)⁸³, todos com significativa homologia⁸⁴. A mutação nesse gene está relacionada a síndrome

ⁱ Gal: Galactose; GalNAc: N-acetilgalactosamina;

ⁱⁱ NeuAC: ácido N-acetilneuramínico.

ⁱⁱⁱ Aminoácidos: K-lisina; E-ácido glutâmico, P-prolina, A-alanina, T-treonina.

^{iv} Aminoácidos: X- qualquer aminoácido; T-treonina

^v Aminoácidos: D-ácido aspártico; E-ácido glutâmico; A-alanina, G-glicina S-serina

pericardite-coxa vara-artropatia-camptodactilia, uma doença autossômica recessiva^{86,87}.

A proteína precursora do fator de estimulação de megacariócitos possui 1404 aminoácidos, construído a partir de 12 exonas, com massa molecular de 151,096Da, portanto, maior do que a massa molecular dos aminoácidos que compõem a lubricina que é de 120KDa⁸⁸. Em humanos, a lubricina, produzida por sinoviócitos e a SZP, produzida por condrócitos da CA, compartilham uma estrutura similar, exibindo as exonas 1, 3 e 6-12 do fator de estimulação de megacariócitos, e variavelmente, as exonas 2, 4 e 5. A diferença sugere que algumas exonas podem ser perdidas ou desligadas, resultando nas diferenças entre a lubricina e a SZP⁸⁴.

Hoje são conhecidas 7 isoformas para lubricina, sendo 6 encontradas na CA humana⁸⁹. As formas predominantes são aquelas que carecem das exonas 4 e 5, ou exonas 2, 4 e 5⁸³. A lubricina e a SZP podem diferir também em modificações pós-tradução devido às ligações de oligossacarídeos⁸⁴. Na sinóvia de paciente portadores de OA, a lubricina se apresenta em duas formas: ou como uma glicoproteína, ou como um proteoglicano. Na forma de proteoglicano ela apresenta ligações com o sulfato de condroitina-6 e/ou sulfato de queratana⁸⁹.

Diante da variabilidade de isoformas e termos para definir os produtos do gene PRG4, o termo lubricina foi adotado, uma vez que, ele representa melhor a função destas moléculas nas articulações sinoviais.

A lubricina é considerada como de fundamental importância para a função e integridade articular devido ao seu papel condroprotetor e principalmente à sua característica de lubrificante limítrofe. Tem sido encontrada em diferentes tecidos, como: sinóvia⁸¹; membrana sinovial²⁰; condrócitos da CA⁷⁶; superfície e interior do menisco articular^{12,90}; corpo adiposo infrapatelar¹⁹; fibroblastos da *camada fibrosa* da CAM⁹¹; MEC e células do disco articular e zona bilaminar da ATM⁹²⁻⁹⁴; ligamentos das articulações sinoviais^{20,95,96}; ligamento periodontal⁹⁷; plasma rico em plaquetas⁹⁸; cartilagem derivada de

células tronco mesenquimais⁹⁹; tendões musculares¹⁰⁰ e alguns tipos de tumores¹⁰¹.

A marcação imuno-histoquímica para lubricina foi fortemente detectada onde os fibroblastos da *camada fibrosa* tangenciam a face articular da CAM de bovinos⁹¹ e ao longo de toda a região superficial da CAM numa profundidade de até 100µm em ratos¹⁰². Em camundongos, foi observada nas *camadas fibrosa e proliferativa*¹⁰³. Em indivíduos saudáveis, a concentração de lubricina na sinóvia foi de $7,496 \pm 0,468$ µg/ml, enquanto que, na OA da ATM, ela cai para $5,689 \pm 1,313$ µg /ml, porém, nessas concentrações, não é observada diferenças significativas no coeficiente de atrito. A lubricina está significativamente em menor concentração na sinóvia de pacientes com OA da ATM¹⁰⁴.

A lubricina é expressa nas estruturas da articulação do joelho, incluindo: CA do fêmur¹⁰⁵, tíbia e patela; ligamento cruzado anterior (LCA) e menisco articular¹⁰⁶.

Em cultura de sinoviócitos e condrócitos obtidos do joelho de bovinos^{17,107,108} e em células da CAM de suínos⁶⁶, a expressão de lubricina foi muito maior naqueles da camada superficial do que nos das demais, mesmo quando tratadas com o TGF-β¹⁷. Em joelhos de ratos, nos estágios iniciais da artrite induzida por antígeno, a presença da lubricina estava diminuída na superfície articular e na sinóvia, ao passo que, há um aumento na expressão de IL-1β e de catepsina B. Essa última é capaz de degradar a lubricina *in vitro*, incluindo seu domínio semelhante a mucina (exona 6) e, conseqüentemente, diminui sua capacidade de lubrificação⁹.

A lubricina também é encontrada formando uma fina e densa camada na superfície articular da CA de joelhos humanos com OA, mesmo em áreas desprovidas de condrócitos e, algumas vezes, formando uma zona difusa na matriz numa profundidade de 50µm a 200µm da superfície. Os depósitos de cartilagem situados no osso subcondral também exibiram marcação para lubricina, ora na região periférica, ora na região central, tanto na MEC quanto nos condrócitos agregados¹⁰⁹. Ainda, sua presença aumenta em pontos de

ossificações ectópicas sugerindo que esta molécula participa do processo de ossificação estimulando-o, ou inibindo-o, num mecanismo de *feedback* negativo⁸³. No menisco articular e sinóvia, a expressão de lubricina é menor quando a OA está instalada¹².

A lubricina tem um papel fundamental na função articular onde desempenha funções biológicas muito distintas incluindo: lubrificação limítrofe, inibição da adesão celular e da deposição de proteína na superfície articular, inibição da proliferação celular num mecanismo dependente da adesão⁸⁵, prevenção da apoptose de condrócitos^{110,111} e garante resistência à fricção e cisalhamento, protegendo contra artrite associada à degradação e ao desgaste¹⁰. A capacidade de inibir a adesão celular parece ser dependente da estrutura globular dos domínios N- e C- terminais⁸⁵.

Diversos estudo têm avaliado, *in vitro*, a expressão da lubricina em células de diferentes locais, associada a presença de fatores de crescimento e morfogênese, tais como: TGF- β 1, BMP-7, fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas PDGF¹⁶; TGF- β 2; TGF- β 3¹⁷; plasma rico em plaquetas (PRP)⁹⁸; e/ou citocinas catabólicas, exemplo: IL-1 α , IL-1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e enzimas proteolíticas como a catépsina B^{16,112}.

Os fatores TGF- β ^{16,18,20}, FGF-2, IGF-1, PDGF¹⁶, BMP-7^{16,19} e o PRP⁹⁸ promovem um acúmulo de lubricina quando adicionados aos meios de cultura. Em contrapartida, as citocinas, IL-1 β ^{16,20}, IL-1 α , e TNF- α ¹⁶ estão relacionadas à diminuição na sua expressão.

Na ATM, a IL-1 β em culturas explantes da CAM⁹¹, o TNF- α em culturas de sinoviócitos¹¹³ e, a IL-1 α em cultura de condrócitos⁷ reduziram substancialmente a produção de lubricina, sendo que, o efeito negativo da segunda foi revertido pela adição de TGF- β ⁷.

Em humanos com ruptura do LCA há aumento na concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e procatepsina B na sinóvia, a qual também exibe menor concentração de lubricina no primeiro ano pós-trauma. Como a diminuição na

concentração das citocinas e enzima resulta na recuperação da concentração de lubricina, supõem-se que essas moléculas estimulam enzimas proteolíticas que degradam a lubricina e determina a perda de seu efeito condroprotetor¹¹².

Em ratos, a transecção do LCA resulta em redução na expressão de lubricina na CA^{114–116}, sendo que, a aplicação de exercício físico forçado, diminui ainda mais a expressão¹¹⁴. Nesses casos, a injeção de lubricina no joelho é capaz de aumentar a área de expressão de lubricina na CA¹¹⁵, de promover um efeito condroprotetor e de reduzir o processo degenerativo instalado pela transecção e exercício¹¹⁴. O mesmo é observado em ratos menissectomizados, onde a lubricina injetada determina menores graus de lesão e degeneração da CA¹⁰.

Na mandíbula de ratos, o desvio funcional lateral durante o fechamento da boca reduz amplamente a expressão de lubricina em áreas de ambas as CAMs, a qual é retomada quando é cessado o estresse físico¹⁰².

A simulação do movimento articular¹¹⁷, a aplicação de forças de cisalhamento em culturas da CA de bovinos¹⁰⁵, a aplicação de forças de tensão cíclica em culturas de CAM⁶⁶, bem como, a carga articular induzida por corrida, em baixa e moderada intensidade¹¹⁸ são capazes de aumentar a expressão do RNAm para lubricina, enquanto que, a compressão dinâmica não a modifica¹¹⁷. A atividade física moderada é capaz de recuperar, em parte, a diminuição progressiva na expressão da lubricina na CA e na sinóvia de ratos adultos (12 meses) e idosos (24 meses) em comparação com ratos jovens (2 meses)¹¹⁹. Ainda, a produção de lubricina é retomada em ratos treinados com plataforma vibratória e esteira de corrida, reduzindo os efeitos degenerativos da OA induzida por glicocorticoides, como por exemplo, inibindo a apoptose¹¹⁰. Em humanos, a concentração de lubricina sérica aumenta em indivíduos saudáveis submetidos a exercícios de corrida e ciclismo¹²⁰.

Camundongos modificados para superexpressão do gene PRG4 apresentam CAs sem alterações histológicas e moleculares decorrentes da OA relacionada à idade ou induzida pela transecção do LCA, reforçando o papel

protetor da lubricina. Porém, esse efeito condroprotetor, parece não estar relacionado a apenas a capacidade de lubrificante limítrofe da lubricina, mas também, pela regulação de fatores de transcrição específicos para hipertrofia e catabolismo de condrócitos. Como exemplo, a SMAD7, uma inibidora da via de sinalização do TGF- β , é inibida em animais que superexpressam o PRG4 e, como o TGF- β impede a diferenciação terminal dos condrócitos, a lubricina pode bloquear a hipertrofia dos condrócitos via inibição da SMAD7¹²¹.

A utilização da lubricina recombinante tem demonstrado uma redução no dano à cartilagem pós desestabilização do menisco medial do joelho, com diminuição na concentração da IL-1 β no soro e na sinóvia¹²². Ainda, essa molécula tem exibido um comportamento anti-inflamatório ao se ligar antagonicamente aos receptores do tipo Toll (família de proteínas transmembranas de tipo I que formam uma parte do sistema imunológico inato), os quais são ativados durante a OA e artrite reumatoide^{123,124} e, uma ação antiproliferativa num mecanismo dependente de sua ligação ao CD44, na proliferação celular da sinóvia induzida pela IL-1 β e TNF- α em pacientes com artrite reumatoide¹²⁵.

2.5 SMADs: proteínas da via canônica da superfamília do TGF- β

As SMADs são 8 proteínas intracelulares responsáveis pela transmissão dos sinais dos fatores de crescimento da superfamília do TGF- β . Elas são divididas em 3 subgrupos: as SMADs reguladas pelo receptor (R-SMAD – SMADs 1/5/8 e 2/3), a SMAD cofator (Co-SMAD – SMAD4) e as SMADs inibitórias (I-SMAD – SMADs 6/7)^{126–128}. As R-SMADs e a SMAD4 contêm 2 domínios altamente conservados denominados de MAD homólogo 1 e 2 (MH1 e MH2), N- e C- terminal, respectivamente, unidos por uma cadeia peptídica menos conservada, a cadeia de ligação (do inglês: *linker*)^{126,129}.

A superfamília do TGF- β incluem as 3 isoformas do TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), as BMPs, os fatores de desenvolvimento e crescimento (GDF), as Ativinas, as Inibinas e a Substância Inibidora Mülleriana (MIS)¹³⁰.

Esses fatores de crescimento desempenham um importante papel no desenvolvimento e na homeostase de diversos tecidos. Eles regulam a proliferação, diferenciação, apoptose e migração celular; o desenvolvimento embrionário, e ainda, controlam a síntese e a degradação da MEC^{131,132}.

A transmissão dos sinais desses fatores ocorre através de sua ligação a um complexo formado por receptores transmembranas serina/treonina cinases tipo I (RI) e tipo II (RII), presentes na forma de homodímeros na superfície da célula. Dependendo do fator envolvido, a ligação ocorre primeiro nos RI ou RII homodímeros, ou ainda ao heterotetrâmero RI/RII. A ligação estabiliza esse complexo fator/receptor, permitindo que o RII ative o RI através de sua fosforilação, o qual agora é capaz de recrutar e fosforilar a sequência SXSⁱ da extremidade C-terminal (domínio MH2) das R-SMADs. A R-SMAD fosforilada (p-SMAD) forma com a SMAD4 um complexo trimérico (2 moléculas p-SMAD e 1 molécula de SMAD4) que é transportado para o núcleo para interagir com o DNA ou fatores de transcrição. As I-SMADs competem preferencialmente pela ligação aos receptores tipo I com as R-SMADs interferindo no processo de fosforilação (Figura 2)^{13,126}.

De acordo com as R-SMADs que são fosforiladas na transmissão do sinal, é possível, distinguir duas subfamílias dos fatores de crescimento: a **subfamília do TGF- β** que inclui as isoformas 1, 2 e 3 do TGF- β , Ativinas A e B, GDF8, 9 e 11, Nodals e BMP-3 que transmitem sinais preferencialmente pelas SMADs 2/3; e a **subfamília da BMP** composta por BMPs 2 e 4 a 10, MIS, GDF1, 3, 5, 6 e 7 que transmitem via SMADs 1/5/8¹³³.

Foram identificados diferentes RIIs (T β RⁱⁱⁱII, ActRⁱⁱⁱ-II, ActR-IIB, BMPR^{iv}-II, BMPR-IIB e MISR^v-II) e RIs (T β RI/ALK^{vi}-5, ALK-1, ActR-IB/ALK-4, ALK-7, BMPR-IA/ALK-3, BMPR-IB/ALK-6 e ActR-I/ALK2) que se combinam

ⁱ S- Serina; X- qualquer outro aminoácido.

ⁱⁱ T β R - Receptor de TGF- β

ⁱⁱⁱ ActR - Receptor de Ativina

^{iv} BMPR - Receptor de BMP

^v MISR - Receptor de MIS

^{vi} ALK - cinase semelhante ao receptor da ativina, do inglês, “*activin receptor-like kinase*”

seletivamente em complexos funcionais produzindo diversidade e seletividade na transmissão do sinal intracelular¹²⁶. As SMADs 2/3 são fosforiladas pelos receptores T β RI (ALK-5), ActR-IB (ALK-4) e ALK7 como resultado da ligação dos fatores da subfamília do TGF- β . Já as SMADs 1/5/8 são ativadas pelos receptores ALK-1, ActR-I (ALK-2), BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6)^{126,130}.

Figura 2 – Esquema da transmissão de sinal da superfamília do TGF- β

Fonte: Adaptado de Feng e Derynck (2005)¹²⁶

Legenda: O TGF- β forma uma ligação estável com o complexo de receptores RI e RII, permitindo a fosforilação do RI, o qual ativa o R-SMAD pela fosforilação da sequência SXS. Duas moléculas de p-SMAD se unem a SMAD4 e constituem um complexo trimérico que é transportado para o núcleo. RI- receptor tipo I; RII - receptor tipo II; R-SMAD - SMAD regulada pelo receptor; p-SMAD - SMAD fosforilada; SMAD4 - SMAD cofator; MC - Membrana celular. P - radical fosfato; S - serina; X - aminoácido qualquer

2.6 A atividade condroprotetora do TGF- β através da via SMAD2/3

Enquanto que a transmissão de sinais via BMP/SMAD1/5/8 desempenha um importante papel nos estágios iniciais da condrogênese promovendo a condensação e diferenciação dos condrócitos¹²⁸, a via TGF- β /SMAD 2/3 é essencial no desenvolvimento, crescimento¹³⁴, manutenção da homeostase e no reparo da CA¹³⁵, promovendo a proliferação celular¹³, sintetizando componentes da MEC^{136–138}, como colágeno tipo II e proteoglicanos^{134,139,140} e, também, inibindo a expressão da MMP-13¹⁴⁰ e a diferenciação terminal dos condrócitos e, portanto, bloqueando a calcificação da MEC, invasão vascular, diferenciação osteoblástica e ossificação¹³⁴.

O TGF- β sinaliza predominantemente através dos receptores T β RII e T β RI (ALK-5). Após ligação ao T β RII, ocorre a ativação por fosforilação do T β RI, que recruta e fosforila as SMAD2/3 (p-SMAD2 e p-SMAD3). Uma vez fosforiladas elas se ligam à SMAD4, formando a estrutura trimérica que migra para o núcleo onde interagem com coativadores; corressores e fatores de transcrição que regulam a expressão gênica¹³⁴. Além do receptor T β RI, o TGF- β também pode se ligar ao receptor ALK-1¹⁴¹ e ALK-2 transmitindo seus sinais através das proteínas SMADs 1/5/8¹²⁶, a qual está relacionada a hipertrofia dos condrócitos e indução da expressão da MMP-13¹⁴².

O estímulo mecânico fisiológico é essencial no desenvolvimento e na manutenção da CA¹⁴³ e, a via do TGF- β /SMAD2/3 parece estar associada através da sua atividade anabólica e produção da MEC. Estudos com compressão dinâmica em níveis fisiológicos (3Mpa) e excessivos (12Mpa), em culturas explantes da CA de bovinos, mostraram potencial indução da via TGF- β /T β RI/SMAD2/3 e repressão da via TGF- β /ALK1/SMAD1/5/8¹⁴⁴ demonstrando que a primeira é usada pelo condrócitos para a resposta mecânica e manutenção da CA. Ainda, observa-se uma rápida perda na expressão da p-SMAD2 em cartilagens explantes cultivadas sem carga, a qual é recuperada a partir do momento em que forças compressivas lhe são impostas¹⁴⁵. Porém, a presença

de citocinas inflamatórias, como ocorre na AO, atenua a indução mecânica da via SMAD2/3, mas, não a impede¹⁴³.

Em contrapartida, a diminuição da carga mecânica, como por exemplo, através da ressecção unilateral do músculo masseter, aumenta a expressão de asporina, uma proteoglicana da MEC, e diminui a expressão do TGF- β 1 do lado afetado, sugerindo que a asporina sequestra o TGF- β 1 da MEC e assim, bloqueia a transmissão do sinal via SMAD¹⁴⁶.

Em dois modelos de OA em camundongos, induzida e espontânea, a perda do conteúdo de proteoglicanos da CA é acompanhada da redução na expressão de TGF- β 3 e p-SMAD2, sendo que, em locais onde a OA é mais severa, as células são negativas para essas moléculas¹⁴⁷. Ainda, nos estágios iniciais na OA espontânea uma grande quantidade de condrócitos de toda a CA, expressam a p-SMAD2/3, enquanto que, poucos e somente aqueles com fenótipo hipertrófico são positivos para p-SMAD1/5/8. Com a progressão da doença, há uma mudança na via de transmissão dos sinais do TGF- β , com a via SMAD2/3 diminuindo e a via SMAD 1/5/8 aumentando¹⁴⁸. Estudo recente demonstra que a via canônica da *wingless type* (Wnt), também envolvida na patogênese da OA, é capaz de induzir a mudança da transmissão de sinais do TGF- β da via SMAD2/3 para a via SMAD 1/5/8¹⁴⁹.

As 3 isoformas do TGF- β estão presentes em condrócitos da CAM de suínos de 0 a 3 anos de idade, sendo que, a expressão desses fatores é maior nas *camadas madura e hipertrófica* e menor na *camada proliferativa*¹⁵⁰. Foi demonstrado que na CAM de camundongos com OA, induzida ou espontânea, o TGF- β contrapõe a atividade catabólica aumentada da IL-1 β na tentativa de impedir o desenvolvimento da doença¹⁵¹. Isso sugere que o efeito condroprotetor desse fator também está relacionado a sua capacidade antagonica aos efeitos deletérios da IL-1 β ^{147,152}.

Apesar de sua característica condroprotetora, a via SMAD2/3 pode se manifestar também em modificações da articulação com a OA. O aumento excessivo na atividade da via TGF- β /SMAD2/3 foi associado a formação de

osteófitos^{138,147,148} e ao aumento na formação óssea subcondral, o qual adquire um fenótipo esclerótico¹⁴⁸. Isso ocorre porque o TGF- β ativado pela reabsorção óssea osteoclástica é capaz de recrutar células tronco mesenquimais e promover a formação de osteóide¹⁵³ (Figura 3). O bloqueio dessa via através do tratamento com diferentes inibidores: T β RII solúvel, se liga com alta afinidade aos TGF- β 1 e 3¹³⁸; Halofuginona, uma substância bloqueadora da fosforilação do SMAD2/3¹⁵⁴ e o bloqueador do receptor T β RI (SB-505124)¹⁵³ é capaz de evitar a formação de osteófitos e preservar a microarquitetura do osso subcondral em modelos de OA^{153,154}. Porém, doses elevadas dessas substâncias levam a redução na quantidade de proteoglicanos e consequentemente perda de cartilagem^{138,153,154}.

Ainda, Long et al¹⁵⁵ observaram um aumento na expressão de TGF- β 1, p-SMAD2 e da protease essencial para sobrevivência em elevadas temperaturas A1 (HtrA1, do inglês: *high temperature requirement A1 serine protease*) em modelos experimentais geneticamente modificados de OA, e sugeriram que a via do TGF- β 1/SMAD2 participa de uma resposta inflamatória que leva a degradação da CAM.

Figura 3 – Organograma da ação do TGF- β na CA saudável e na OA

Fonte: Bautz (2017)

2.7 TGF- β regula a produção de lubrificina

As 3 isoformas do TGF- β exibem forte capacidade de estimular a produção de lubrificina, tanto por condrócitos quanto por sinoviócitos, em doses específicas *in vitro*. O aumento na produção da lubrificina é acompanhada do aumento da p-SMAD2. Porém, altas doses, como exemplo: 30ng/ml de TGF β II, resultam em menor tempo de p-SMAD2 nos condrócitos e, portanto, são menos efetivas¹⁷. A produção de lubrificina também aumenta em culturas de condrócitos de ratos expostos a campos eletromagnéticos numa mesma proporção da quantidade de TGF- β 1 e SMAD2¹⁵⁶. A inibição do T β RI com SB431542, nas culturas tratadas com TGF- β e nas expostas aos campos eletromagnéticos, resulta em diminuição da capacidade indutora da síntese de lubrificina por esses

mecanismos, reiterando a importância desse receptor e a ativação da via SMAD2/3 nesse processo^{17,156}.

2.8 Fosforilação da cadeia de ligação da SMAD2 (p-SMAD2L)

Além da fosforilação da cadeia C-terminal (p-SMAD2 e p-SMAD3), a qual é o principal evento para ativação da via, as R-SMADs também são submetidas a fosforilações em sua cadeia de ligação (p-SMAD2L e p-SMAD3L) por proteínas cinases intracelulares que a regulam positivamente ou negativamente¹⁵⁷. Os potenciais sítios de fosforilação nessa região são os resíduos de treonina (Thr) 179, e serina (Ser) 204, Ser208 e Ser213 da SMAD3 e, Thr220, Ser245, Ser250 e Ser255 da SMAD2. Em todos eles, a fosforilação é mediada pela interação entre o TGF- β e o receptor T β RI e envolve vias nucleares como as cinases dependentes de ciclina (CDK) e citoplasmáticas como: glicogênio sintase cinase (GSK), enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPK). Estas incluem as cinases reguladas por sinal extracelular 1 (ERK1) e 2 (ERK2), c-Jun N-terminal cinase (JNK) e proteína p38/MAPK^{158,159}. O bloqueio do receptor T β RI inibe a fosforilação da cadeia de ligação, o que demonstra a interação e cooperação entre as vias de sinalização^{159–161}.

A fosforilação da região de ligação tem sido foco de muitas controvérsias por apresentar funções antagônicas em diferentes tipos celulares. Inicialmente, foi sugerido que ela inibe a sinalização pelo TGF- β , devido a inibição da translocação nuclear e retenção citoplasmática da SMAD¹⁵⁷, como observado em células epiteliais com mutações Ras oncogênicas¹⁶². Por outro lado, a fosforilação dessa região foi relacionada ao aumento no tempo de duração da fosforilação na cadeia C-terminal das SMADs 2/3 e da transcrição gênica¹⁶¹. Em células musculares lisas de vasos houve aumento da síntese de proteoglicano¹⁶³ e aumento da expressão de enzimas envolvidas na síntese de GAGs¹⁵⁹. A fosforilação da cadeia de ligação da SMAD2 mediada pela via ERK2 se mostrou fundamental para as sínteses de colágenos tipos I e III induzidas pelo TGF- β , em fibroblastos¹⁶⁴.

Em cultura de células epiteliais pulmonares (L17) foi observado um aumento da atividade de transcrição decorrente da fosforilação da cadeia de ligação da SMAD2 pela via ERK1 em resposta a ação do TGF- β , ainda, verificou-se que o aumento nos níveis de SMAD2 foi resultado da estabilização dessas proteínas pela fosforilação da região de ligação¹⁶⁵.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar as alterações celulares e da MEC promovidas pelo envelhecimento na cartilagem articular do côndilo da mandíbula de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar na CAM de ratos jovens, adultos e idosos:

- a) Os aspectos estruturais e ultraestruturais
- b) O padrão de distribuição das fibras colágenas tipo I
- c) O padrão de expressão da lubricina
- d) O padrão de expressão da p-SMAD2L (Ser255);
- e) A associação entre o padrão de expressão de lubricina e p-SMAD2

4 MÉTODOS

4.1 Modelo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (número de protocolo: 041/14).

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus*). Para composição dos grupos experimentais e definição das idades dos animais usou-se os dados contidos na Tabela 1, a qual correlaciona a idade do homem com a idade do rato^{166,167}.

Tabela 1 – Relação entre as idades do rato e do homem

Idade do rato em meses	Idade do humano em anos
1,5 mês (puberdade)	12,5 anos (Puberdade)
6 meses	18 anos
12 meses	30 anos
18 meses	45 anos
24 meses	60 anos
30 meses	75 anos
36 meses	90 anos

Fonte: Adaptado de Andreollo et al.¹⁶⁶ e Sengupta¹⁶⁷.

A partir disso, constituiu-se os seguintes grupos:

- a) **Grupo jovem:** 5 animais com 2 meses de idade;
- b) **Grupo adulto:** 5 animais com 12 meses de idade;
- c) **Grupo idoso:** 5 animais com 24 meses de idade.

Esses animais foram mantidos em gaiolas do Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo sem restrição de ração e água, com controle de temperatura entre 23°C e 25°C e ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.2 Microscopia de luz

Os animais foram sacrificados com injeção intraperitoneal de solução de Hypnolⁱ a 3% (Pentobarbital sódico – 30 mg/kg de massa corporal). Após, foram perfundidos através do ventrículo esquerdo inicialmente com solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%) e, a seguir, com solução de paraformaldeído à 4% em tampão fosfato 0,1 M. Em seguida, as ATMs, de ambos os lados, de cada grupo foram acessadas e os côndilos da mandíbula dissecados e removidos junto com o disco articular e, então, imersos na solução fixadora por um período de 24 horas a 4 °C. Após esse período, iniciou-se a descalcificação com solução de ácido etilenodiaminotetracético/sal dissódico (EDTA) à 10% em tampão fosfato (pH 7.4), a qual era renovada a cada 48 horas por aproximadamente 40 dias.

Em seguida, as amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois (do 50^o GL ao absoluto), diafanizados em xilol e incluídos em blocos de parafina fundida a 60 °C. Cortes coronais seriados com 5µm de espessura foram obtidos do côndilo direito e/ou esquerdo da mandíbula e inicialmente submetidos a técnica da Hematoxilina e Eosina para análise morfológica, e Azul de toluidina/*fast green* e Safranina-O/*fast green*^{168,169} para avaliação da MEC da CAM.

4.3 Imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi realizada em cortes obtidos como descrito no item 4.2 para detecção das seguintes moléculas: Lubricina, Colágeno tipo I e p-SMAD2L, para o qual foram utilizados, respectivamente, os anticorpos (Ac): Ac policlonal de coelho Anti-Lubricina (H-140) (Santa Cruz/sc-98454); Ac policlonal de coelho anti-Colágeno I (Abcam/Ab34710); Ac monoclonal de coelho Anti-SMAD2 (phospho S255) (Abcam/Ab188334).

ⁱ Fontoveter – Divisão Veterinária de Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

A técnica de imuno-histoquímica foi a da imunoperoxidase para todos os anticorpos, e realizada da seguinte maneira, de acordo com a recomendação dos fabricantes:

- a) Desparafinização em xilol e reidratação em série decrescente de etanol;
- b) Remoção de pigmento formólico com hidróxido de amônio à 10% em etanol 95%, durante 10 minutos;
- c) Recuperação antigênica: Nesta etapa, foi utilizado o método recomendado pelo fabricante de cada anticorpo primário ou aquele que exibiu melhor resultado nos ensaios realizados previamente. Foram eles:
 - Ac Anti-Lubricina – Solução de Pepsina 0.5% em ácido clorídrico (HCl) 5mM por 20 min a 37 °C e por 10 min a temperatura ambiente (T. A)
 - Ac Anti-Colágeno I – Incubação em solução de tampão Citrato (pH 6) a 95°C por 20 minutos mais 10 min a T.A.
 - Ac Anti-SMAD2 (phospho S255) – Incubação em solução de tampão Tris-EDTA (pH 9,0) a 95 °C por 20 minutos mais 10 min a T. A
- d) Bloqueio de Sítios Inespecíficos com Bloqueador de proteína (Spring Bioscience/DPB - 125) 10 min;
- e) Incubação do anticorpo primário por 12 horas (*overnight*) a 4 °C com as seguintes diluições em PBS: Ac Anti-Lubricina – 1:100; Ac Anti-Colágeno I – 1:200; Ac Anti-SMAD2 (phospho S255) – 1:100. Essas diluições foram determinadas previamente durante a padronização da técnica e seguindo às instruções do fabricante;
- f) Bloqueio da Peroxidase Endógena por 10 min (Spring Bioscience/DHP - 125);
- g) Incubação por 10 min com reagente Complemento (DCMT-999, REVEAL - Sistema de detecção livre de biotina, Spring Bioscience);
- h) Incubação por 15 min. com reagente Conjugado *Horseradish peroxidase* (HRPⁱ) (DHRR-999, REVEAL - Sistema de detecção livre de biotina, Spring Bioscience);
- i) Revelação com o uso do cromógeno 3'3-Diaminobenzidina (DAB) por 1 min (DABC-004 e DABS-125, Spring Bioscience);

ⁱ Enzima encontrada na *Armoracia rusticana*, conhecida como raiz-forte (*horseradish* em inglês)

- j) Contra coloração com hematoxilina de Mayer por 10 segundos;
- k) Desidratação e diafanização;
- l) Montagem das lâminas com Permountⁱ.

4.4 Análise qualitativa

As lâminas foram analisadas sob fotomicroscópio trinocular acoplado à câmera digital (ERc 5s, Carl Zeiss, Alemanha) e um sistema de análise de imagens computadorizada (Axiovision 6.3, Carl Zeiss, Alemanha) pertencentes ao Laboratório de Biologia Celular e do Desenvolvimento e Tumorigênese, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

4.5 Análise quantitativa

Através do sistema de aquisição descrito anteriormente foram capturadas duas fotomicrografias com dimensões de 276,76x207,57mm (0,057mm²) (objetiva de 40X), para cada um dos 5 cortes submetidos à técnica imuno-histoquímica para p-SMAD2L dos 5 animais de cada grupo (**jovem, adulto e idoso**), totalizando 50 imagens por grupo. Posteriormente, essas imagens foram analisadas com o programa *ImageJ* (domínio público, disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>), para se determinar a densidade total de células da CAM e a densidade e a porcentagem de células p-SMAD2L. A metodologia é descrita a seguir.

4.5.1 Determinação da densidade total de células da CAM

As imagens importadas para o *ImageJ* foram convertidas para escala de cinza de 8-bit. Após, foi aplicada a ferramenta “*Adjust: Threshold*” e os limiares

ⁱ *Fisher Scientific*, Nova Jersey, Estados Unidos da América.

inferior e superior foram ajustados interativamente a fim de segmentar as células da coloração de fundo. Em seguida, a contagem do número total de células foi realizada com o comando “*Analyze: Analyze particles*”, o qual foi ajustado para contar estruturas com mais de $3\mu\text{m}^2$ de área (Figura 4). Para o cálculo da densidade total (células/ mm^2), os valores obtidos nas duas fotomicrografias de cada corte foram somados e divididos pela soma de suas áreas ($0,057+0,057=0,114\text{mm}^2$). Os dados foram armazenados no programa *Microsoft Excel 2016*.

4.5.2 Determinação da densidade de células p-SMAD2L.

As imagens foram novamente abertas no *ImageJ* e segmentadas com o *plugin* “*Segmentation: Colour Deconvolution*”, com o vetor HDAB, para separação da coloração de fundo, coloração pela hematoxilina (H) e marcação para o DAB¹⁷⁰. Esta última teve seus limiares ajustados interativamente para marcação positiva ao DAB com a ferramenta “*Adjust: Threshold*”. A contagem foi realizada com “*Analyze: Analyze particles*” para marcações de tamanho acima de $3\mu\text{m}^2$ de área (Figura 5). Para o cálculo da densidade (células p-SMAD2L/ mm^2), procedeu-se de forma semelhante ao descrito no item 4.5.1.

Figura 4 – Metodologia aplicada na determinação da densidade total de células

A) Fotomicrografia aberta no programa “ImageJ”

B) Conversão para imagem 8-bit

C) Ajuste dos limiares (“Threshold”)

D) Resultado da contagem de células

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Fotomicrografia de imunomarcaco para p-SMAD2L em CAM do grupo jovem. Barra de escala: 20m (Objetiva 40X)

Figura 5 – Metodologia aplicada na determinação da densidade de células p-SMAD2L

A) Fotomicrografia aberta no programa “ImageJ”

B) Aplicação do plugin “Colour Deconvolution”

C) Ajuste dos limiares para o DAB (“Threshold”)

D) Resultado da contagem de células

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Fotomicrografia de imunomarcaco para p-SMAD2L em CAM do grupo jovem. Barra de escala 20µm: (Objetiva 40X)

4.5.3 Determinação da porcentagem de células p-SMAD2L.

A porcentagem de células imunopositivas para a p-SMAD2L foi determinada pela razão entre o número de células marcadas pelo DAB e o número total de células obtidas na contagem das duas fotomicrografias de cada corte.

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *Graphpad Prism 6.0*. A normalidade dos dados e a suposição de homogeneidade da variância (homocedasticidade) foram verificadas pelos testes *D'Agostino & Pearson omnibus normality test* e *Brown-Forsythe test*, respectivamente. Para todas as variáveis empregou-se a Análise de Variância com um fator (*Anova One-way*) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para localizar as diferenças entre os grupos. Em todos os testes, p-valor (valor de probabilidade) menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP).

4.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para a MET, 3 animais de cada grupo, após serem anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de Hypnol a 3% (Pentobarbital sódico – 30 mg/kg de massa corporal) e perfundidos via ventrículo esquerdo com solução fixadora de Karnowsky modificada (paraformaldeído a 2%, glutaraldeído a 2,5% e solução tampão cacodilato a 1M, pH7,4) tiveram dissecados seus processos condilares das mandíbula, os quais foram mantidas em glutaraldeído 2,5%, por um período de 2 horas a 4°C, e, então, descalcificados em EDTA 10% (pH7,4) como descrito no item 4.2 . Em seguida, os espécimes foram processados rotineiramente para microscopia eletrônica de transmissão, como segue:

- a) Lavagem em PBS;
- b) Pós-fixação em Tetróxido de Ósmio a 1% durante 2 horas a 4°C;
- c) Tratamento com solução aquosa de acetato de uranila a 1% durante 2 horas;
- d) Desidratação em série crescente de álcoois (do 70° ao absoluto);
- e) Inclusão em Epon;
- f) Obtenção dos cortes ultrafinos;
- g) Coloração com solução de 1% de acetato de uranila alcoólica saturada e citrato de chumbo¹⁷¹;
- h) Análise dos espécimes em microscópio eletrônico de transmissão (FEI-Morgagni 268 D).

5 RESULTADOS

5.1 Análise qualitativa

5.1.1 Aspectos morfológicos

No **grupo jovem** verificou-se que a CAM estava constituída por cinco camadas organizadas e bem definidas: a *camada fibrosa*, composta por muitos fibroblastos alongados inseridos em um tecido conjuntivo denso dispostos em quatro ou cinco faixas; a *camada proliferativa*, com alta densidade de células com formato poligonal; a *camada de transição*, caracterizada por apresentar células alongadas e matriz pouco abundante; a *camada madura* com condrócitos de formato ovoide ligeiramente alongados e com polaridade celular, e localizados em lacunas rodeadas por grande quantidade de matriz cartilágnea, e *camada hipertrófica*, localizada na transição com o tecido ósseo. Observou-se, ainda, um processo de ossificação ativo na transição entre a CAM e o osso subcondral, este exibindo trabéculas ósseas delgadas e espaços medulares amplos (Figura 6A e 6D).

O **grupo adulto** caracterizou-se por apresentar apenas três camadas: a *camada fibrosa*, delgada e com poucos fibroblastos alongados; a *camada proliferativa* com alta densidade celular, e a *camada madura*, também com condrócitos arredondados e com polaridade celular inseridos, numa matriz fibrocartilágnea. Comparativamente ao **grupo jovem**, o osso subcondral apresentou-se mais compacto e com poucos espaços medulares (Figura 6B e 6E).

No **grupo idoso** a CAM também estava constituída por três camadas, porém, com limites pouco precisos entre elas. (Figura 6C e 6F). Quando comparada aos **grupos jovem e adulto**, a *camada fibrosa* distinguiu-se pela sua modificação em fibrocartilagem em algumas amostras (Figura 7A) com a presença de infiltrados de células provenientes da *camada proliferativa*. Nesta,

por sua vez, foi detectada uma sensível redução celular e solução de continuidade em alguns pontos. A população celular também estava diminuída na *camada madura*, que exibiu extensas áreas de matriz fibrocartilaginosa desprovidas de células e corados pela eosina, aspecto sugestivo de alteração no perfil da MEC. O osso subcondral estava compacto e sem espaços medulares próximos à transição com a CAM (Figura 6C e 6F). Essas alterações aparentemente estavam relacionadas ao processo natural do envelhecimento.

A CAM do **grupo idoso** também apresentou alterações degenerativas e sinalizadoras da OA. Áreas de cartilagem calcificada com condrócitos pequenos e núcleo condensado separadas da cartilagem madura por linhas basofílicas ou frente de calcificação (*tidemarks*) foram visualizadas na maioria das amostras, sendo que, em algumas delas, essas áreas eram extensas e determinaram a redução da espessura da cartilagem não calcificada. Ainda, detectou-se a formação de osteófitos associados à invasão vascular da CAM, formação de grupos isógenos (*clusters* ou *Complex chondron*), presença de células com formatos irregulares, desarranjo das células em suas respectivas camadas, presença de áreas de MEC desprovidas de células e redução do compartimento infradiscal da cavidade articular com pontos sugestivos de adesão entre o disco articular e a CAM. Em dois dos cinco animais, notou-se pequenas áreas de fibrilação da *camada fibrosa* da CAM e, em outro, ocorreu deposição de tecido fibroso sobre a face articular. Também se verificou uma amostra com lesão na *camada fibrosa* da CAM contendo material basofílico (Figura 7A-L).

Figura 6 – Fotomicrografias dos cortes coronais da CAM dos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F)

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Em A e D observam-se as 5 camadas distintas da CAM com alta densidade de células: camada fibrosa (Fi), camada proliferativa (Pr), camada de transição (Tr), camada madura (Ma) e camada hipertrófica (Hi). O osso subcondral (O) é trabeculado com grande quantidade de espaços medulares. Em B e E, pode-se notar uma camada fibrosa com poucos fibroblastos alongados (setas); a camada proliferativa apresenta grande número de células poligonais e a camada madura com condrócitos bem diferenciados rodeados por uma matriz fibrocartilaginosa. O osso subcondral é compacto e com poucos espaços medulares. Em C e F, verificou-se que a camada fibrosa exibe infiltrados celulares (setas), provenientes da camada proliferativa e limites mal definidos. A camada proliferativa é irregular com poucas células e ausente em determinadas áreas (cabeças de seta). A camada madura exibe MEC com áreas desprovidas de células (*) e com menor coloração pela hematoxilina. O osso subcondral é compacto sem espaços medulares. O compartimento infra-discal da cavidade articular está reduzido. DA – disco articular, Fi - camada fibrosa, Pr- camada proliferativa, Tr- camada de transição, Ma - camada madura, Hi - camada hipertrófica, O - Osso subcondral. HE. Barra de escala: 50 µm

Figura 7 – Fotomicrografias das alterações nas CAMs do **grupo idoso**

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: A - Nota-se camada fibrosa (Fi) com aspecto fibrocartilágineo, presença de grupos isógenos (cabeças de seta), áreas de MEC com ausência de células (*) e cartilagem calcificada (CC) com condrócitos pequenos e núcleos condensados (setas). B - Face articular irregular (setas), adesão entre o disco articular (DA) e a CAM (cabeça de seta). C - Deposição de tecido conjuntivo entre a face articular da CAM e o disco articular (DA). D - Fibrilação da face articular com desorganização na disposição das células na CAM (cabeças de setas). E - Perda da continuidade da camada proliferativa (Pr) com redução na população de células, também observada na camada madura (Ma). Redução do espaço articular com adesão entre o disco articular (DA) e a CAM (setas). F - Formação de grupos isógenos (cabeças de setas) e presença da linha basofílica (setas) e cartilagem calcificada (CC). G - Grande densidade de células com formatos irregulares na camada fibrosa (Fi) com lesão de aspecto basofílico (setas), e calcificação da cartilagem (CC). H - Desorganização das células da CAM com a presença de extensas áreas de MEC sem células (*) e condrócitos pequenos com condensação do núcleo (setas). I - Camadas fibrosa (Fi), proliferativa (Pr) e madura (Ma) com células em arranjo desorganizado. J - Formação de osteófito (setas) no terço medial da CAM e presença de avanço e duplicação da linha basofílica (cabeças de setas). K - Redução da espessura de cartilagem madura (CM) decorrente do avanço da área de cartilagem calcificada (CC). L - Invasão vascular (V) com formação de osteófito (setas) na cartilagem calcificada (CC). DA – disco articular, Fi - camada fibrosa, Pr - camada proliferativa, Ma - camada madura, CC - cartilagem calcificada, V – vaso sanguíneo. HE. Barra de escala: 50 µm

5.1.2 Aspectos relativos ao conteúdo proteoglicano da CAM

No **grupo jovem** notou-se nas *camadas proliferativa, de transição, madura e hipertrófica* coloração das matrizes territorial e interterritorial tanto pelo azul de toluidina, quanto pela safranina-O, enquanto que, a *camada fibrosa* exibiu apenas fraca coloração pela safranina-O (Figura 8A e 8D, Figura 9A e 9D).

No **grupo adulto** a coloração catiônica foi intensa nas *camadas proliferativa e madura* e suave na *camada fibrosa*, semelhante ao observado no **grupo jovem** (Figura 8B e 8E, Figura 9B e 9E).

No **grupo idoso** ocorreu uma diminuição na intensidade das colorações pelo método do azul de toluidina e da safranina-O, demonstrando a redução no conteúdo proteoglicano da MEC (Figura 8C e 8F, Figura 9C e 9F).

Figura 8 – Fotomicrografias dos cortes coronais da CAM dos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F) corados pelo método do azul de toluidina/*fast green*

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Em A e D, observa-se a coloração pelo azul de toluidina nas matrizes territorial (setas) e interterritorial (*) das camadas proliferativa (Pr), de transição (Tr), madura (Ma) e hipertrófica (Hi), sendo nas duas últimas com maior intensidade. Em B e E, nota-se nas camadas proliferativa (Pr) e madura (Ma) a coloração pelo azul de toluidina nas matrizes territorial (setas) e interterritorial (*), sendo que, esta também exibe áreas coradas pelo *fast green* (**). Em C e F, verifica-se a fraca presença de coloração pelo azul de toluidina localizada em diminutas áreas da matriz interterritorial (*) da camada madura (Ma) a qual está intensamente corada pelo *fast green* (**). Já a matriz territorial dessa camada exibe coloração intensa (setas) ao azul de toluidina. DA – disco articular, Fi - camada fibrosa, Pr - camada proliferativa, Tr - camada de transição, Ma - camada madura, Hi - camada hipertrófica, O - Osso subcondral. Barra de escala: 50μm

Figura 9 – Fotomicrografias dos cortes coronais da CAM dos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F) corados pelo método da safranina-O/fast green

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Em A e D, observa-se a coloração fraca pela safranina-O na matriz da camada fibrosa (Fi), moderada nas camadas proliferativa (Pr) e de transição (Tr) e intensa nas matrizes territorial (setas) e interterritorial (*) das camadas madura (Ma) e hipertrófica (Hi). Em B e E, nota-se coloração fraca na camada fibrosa (Fi) e intensa nas matrizes interterritorial (*) e territorial (setas) das camadas proliferativa (Pr) e madura (Ma). Em C e F verifica-se coloração ausente na camada fibrosa (Fi), fraca na matriz interterritorial (*) e intensa na matriz territorial (setas) de alguns condrócitos da camada madura (Ma). DA - disco articular, Fi - camada fibrosa, Pr - camada proliferativa, Tr - camada de transição, Ma - camada madura, Hi - camada hipertrófica, O - Osso subcondral. Barra de escala: 50µm

5.1.3 Padrão de expressão imuno-histoquímica do colágeno tipo I

No **grupo jovem**, detectou-se a presença de colágeno tipo I nas *camadas fibrosa e madura* da CAM. Na primeira evidenciou-se feixes de fibras colágenas densamente agrupados e dispostos paralelamente à face articular, tanto no sentido lateromedial quanto no sentido anteroposterior; na segunda, a marcação não permitiu observar a formação desses feixes (Figura 10A e 10D).

No **grupo adulto**, os feixes de fibras colágenas da *camada fibrosa* estavam dispostos paralelamente à superfície da CAM, enquanto que nas *camadas proliferativa e madura* esses feixes constituíam arcos, com a parte horizontal dos mesmos situando-se na primeira, e seus prolongamentos verticais na segunda, estes, se inserindo de forma radial e perpendicular ao osso subcondral (Figura 10B e 10E).

No **grupo idoso** os feixes de fibras colágenas estavam dispostos de forma semelhante ao **grupo adulto**, porém, bastante adensados, conferindo à CAM uma característica essencialmente fibrocartilaginosa (Figura 10C e 10F).

Figura 10 – Fotomicrografias da expressão de colágeno do tipo I na CAM dos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F)

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Em A e D, nota-se na camada fibrosa a presença de fibras colágenas paralelas à face articular no sentido lateromedial (contorno de seta) e anteroposterior (cabeças de seta) e, na camada madura (Ma), tanto a MEC quanto os condrócitos (contornos de cabeças de seta) são imunorreativos. As camadas proliferativa (Pr), transição (Tr) e hipertrófica (Hi) não exibem marcações. Em B e E, observa-se um padrão em arcos das fibras colágenas do tipo I, inicialmente paralelas (contorno de setas) à face articular nas camadas fibrosa (Fi) e parte superior da proliferativa (Pr) para, em seguida, arquearem-se profundamente na camada madura (Ma) num trajeto oblíquo (setas pretas) e, então, se inserirem no osso subcondral (O). Em C e F, verifica-se um arranjo semelhante ao encontrado no grupo adulto, porém, numa maior intensidade. Ainda, é possível verificar a presença de ilhas de tecido ósseo no interior da CAM (*). DA – disco articular, Fi - camada fibrosa, Pr - camada proliferativa, Tr - camada de transição, Ma - camada madura, Hi - camada hipertrófica, O - Osso subcondral. Barra de escala: 50µm

5.1.4 Padrão de expressão imuno-histoquímica da lubricina

No **grupo jovem**, a expressão da lubricina foi detectada nas *camadas fibrosa, proliferativa* (Figura 11A-C) e parte superficial da *camada madura* (Figura 14A) da CAM, sendo mais intensa em toda a face articular da *camada fibrosa*, onde formou uma faixa contínua ao longo da mesma (Figura 11A-C).

No **grupo adulto** a densa faixa de lubricina na *camada fibrosa* próximo à face articular também foi verificada. A marcação da lubricina estendeu-se profundamente por aproximadamente 100µm desde a *camada fibrosa*, atravessando a *camada proliferativa*, e atingindo a parte superior da *camada madura* (Figura 11D-F).

No **grupo idoso**, a imunomarcação para a lubricina na *camada fibrosa* foi bastante tênue, principalmente no que se refere à face articular; nas demais camadas notou-se a presença da lubricina, de forma mais marcante, na parte inferior da *camada proliferativa*, e na parte superior da *camada madura* (Figura 11G-I).

Figura 11 – Fotomicrografias da expressão de lubricina nos terços lateral, intermédio e medial da CAM dos grupos jovem (A-C), adulto (D-F) e idoso (G-I)

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Pode-se observar nos grupos jovem (A-C) e adulto (D-F) a presença da lubricina nas camadas fibrosa (*), proliferativa (**) e madura (***), sendo que, na face articular da camada fibrosa, ela formou uma faixa contínua (cabeças de setas) nos terços lateral (A e D), intermédio (B e E) e medial (C e F) da CAM. Já no grupo idoso (G-I), apenas a parte inferior da camada proliferativa e a parte superior da camada madura (*) foram imunomarcadas, destacando-se a ausência da lubricina na face articular (contornos de cabeça de seta). DA – Disco Articular. Barra de escala: 20µm

5.1.5 Padrão de expressão imuno-histoquímica da p-Smad2L.

A p-SMAD2L foi detectada tanto no citoplasma quanto no núcleo das células da CAM nos **grupos jovem, adulto e idoso**.

Células p-SMAD2L foram encontradas em todas as camadas da CAM do **grupo jovem**, destacando-se a *camada madura* onde, qualitativamente, a quase totalidade das células foram imunopositivas (Figura 12A-E).

Na CAM do **grupo adulto** as *camadas fibrosa, proliferativa e madura* também exibiram alta densidade de células p-SMAD2L (Figura 13A-C).

Em contrapartida, no **grupo idoso**, poucas células foram imunopositivas para a p-SMAD2L. Qualitativamente, as regiões vizinhas das *camadas proliferativa e madura* apresentaram maior densidade de células p-SMAD2L (Figura 13D-F).

5.1.6 Associação dos padrões de expressão imuno-histoquímica da lubricina e p-SMAD2L.

Quando se compara a localização e o padrão de expressão da lubricina e p-SMAD2L dentro dos grupos estudados, pode-se sugerir uma associação entre essas moléculas. Assim, nos **grupos jovem** (Figura 14A e 14D) e **adulto** (Figura 14B e 14E), tanto a lubricina quanto a p-SMAD2L estão presentes nas *camadas fibrosa, proliferativa* e parte superficial da *camada madura*, ao passo que no **grupo idoso**, essas moléculas estão expressas em áreas adjacentes das *camadas proliferativa e madura* (Figura 14C e 14F).

Figura 12 – Fotomicrografias da expressão da p-SMAD2L na CAM de ratos jovens

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Em A, verifica-se alta densidade de células p-SMAD2L em todas as camadas da CAM. Em B, nota-se grande número de células p-SMAD2L nas camadas fibrosa (seta) e proliferativa (cabeça de seta) e, em C, na camada madura (setas). Em D e E, verifica-se marcações citoplasmáticas e nucleares tanto nos fibroblastos (setas) da camada fibrosa quanto nos condrócitos da camada madura (setas), respectivamente. Barra de escala: 20µm

Figura 13 – Fotomicrografias da expressão de p-SMAD2L nos grupos adulto (A-C) e idoso (D-F)

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: A e D – Nota-se o diferente padrão de marcação da CAM para p-SMAD2L nos grupos adulto e idoso, respectivamente. B – Grande densidade de células p-SMAD2L no grupo adulto nas camadas fibrosa (Fi), proliferativa (Pr) e madura (Ma). C – maior aumento de B, onde verifica-se células com marcação no núcleo (setas). E – apenas algumas poucas células da camada proliferativa e as células da parte superior da camada madura expressam a p-SMAD2L. F – maior aumento de D, observa-se menores proporção e densidade de células p-SMAD2L (setas). DA – disco articular, Fi - camada fibrosa, Pr - camada proliferativa, Ma - camada madura. Barra de escala: 20µm

Figura 14 – Associação entre a expressão da lubricina e p-SMAD2L nos grupos jovem (A e D), adulto (B e E) e idoso (C e F)

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Observa-se que a lubricina é expressa onde as células são positivas para p-SMAD2L. Em A-C, nota-se a marcação da lubricina na MEC e no citoplasma dos condrócitos (setas). Em- D-F, verifica-se a presença de marcações nucleares e citoplasmáticas para p-SMAD2L (setas). DA – disco articular, Fi - camada fibrosa, Pr - camada proliferativa, Tr - camada de transição, Ma - camada madura. Barra de escala: 20µm

5.2 Análise quantitativa

Os dados apresentados na Tabela 2 e Figura 15 mostram que a densidade total de células, bem como, a densidade e porcentagem de células p-SMAD2L reduziram significativamente com a idade. No **grupo idoso**, a densidade total de células foi 47,63% e 11,35% menor do que o encontrado nos **grupos jovem e adulto**, respectivamente. Ainda, os dados relativos a porcentagem de células p-SMAD2L revelaram que apenas 29,18% das células da CAM do **grupo idoso** expressaram a p-SMAD2L, ao passo que, os **grupos jovem e adulto** exibiram 82,69% e 64,24% de células imunomarcadas, respectivamente. Além disso, o **grupo idoso** também exibiu uma expressiva diminuição da densidade de células p-SMAD2L, a qual foi 81,41% e 59,65% menor em relação aos **grupos jovem e adulto**, respectivamente. Juntos estes dados mostram que o **grupo idoso** não só exibiu redução da densidade de células, total e p-SMAD2L, como também apresenta menor proporção de células expressando a p-SMAD2L.

Tabela 2 – Média ($\pm$ DP) da densidade total de células da CAM, densidade de células p-SMAD2L e porcentagem de células p-SMAD2L.

Grupo	Densidade total de células (células/mm²)	Densidade de células p-SMAD2L (p-SMAD2L/mm²)	% p-SMAD2L
Jovem	5.175 $\pm$ 428,9 ^a	4.271 $\pm$ 393,1 ^d	82,64 $\pm$ 5,625 ^g
Adulto	3.057 $\pm$ 403,7 ^b	1.968 $\pm$ 348,8 ^e	64,24 $\pm$ 6,325 ^h
Idoso	2.710 $\pm$ 552,3 ^c	794,1 $\pm$ 250,1 ^f	29,18 $\pm$ 6,673 ⁱ

NOTA: Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos após teste de análise de variância (ANOVA) e de comparações múltiplas de Tukey ($p < 0,05$ entre b e c; $p < 0,0001$ entre as demais comparações).

Figura 15 – Representação gráfica da média ($\pm$ DP) da densidade total de células, da densidade de células p-SMAD2L e da porcentagem de células p-SMAD2L.

Fonte: Bautz (2017)

NOTA: Os asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas entre os grupos após teste de análise de variância (ANOVA) e de comparações múltiplas de Tukey. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$

5.3 Aspectos ultraestruturais

5.3.1 Condrócitos

O **grupo jovem** exibiu condrócitos com formato ovoide, ligeiramente alongados com processos citoplasmáticos. No citoplasma, observou-se o retículo endoplasmático rugoso (RER) com cisternas relativamente delgadas contendo em suas paredes elevada densidade de ribossomos. Relativamente ao núcleo, a heterocromatina apresentou-se dispersa, distribuída de forma homogênea (Figura 16A, 16D e 16G).

No **grupo adulto**, os condrócitos exibiram contorno arredondado com polaridade celular, e cisternas do RER relativamente mais dilatadas do que as do **grupo jovem**. Também, de maneira aparente, a densidade de ribossomos foi maior, estes, com maior eletrondensidade quando comparados ao **grupo jovem**. No núcleo notou-se um aumento da densidade de eucromatina em relação aos demais grupos (Figura 16B, 16E e 16H).

Os condrócitos do **grupo idoso** caracterizaram-se por exibir um aspecto ligeiramente irregular, com perda da polaridade e com alguns processos citoplasmáticos. No RER, foi nítida a desestruturação das suas cisternas, bem como a diminuição da densidade de ribossomos. O núcleo apresentou indentações, com a distribuição de heterocromatina menos homogênea e mais condensada próximo a membrana nuclear (Figura 16C, 16F e 16I)

5.3.2 *Matriz territorial*

Tomando-se o **grupo adulto** como referência, verificou-se que as fibrilas colágenas se apresentaram espessas e eletrondensas, dispostas de maneira a constituírem uma malha pantográfica (Figura 17B e 17E). Desta forma, ao se analisar o **grupo jovem**, além do predomínio de fibrilas colágenas mais delgadas, notou-se que as mesmas, em determinados locais, agrupavam-se para formar feixes de diferentes direções (Figura 17A e D). No **grupo idoso**, além da aparente diminuição na densidade das fibrilas colágenas, detectou-se poucas fibrilas espessas com relativa orientação (Figura 17C e 17F).

Figura 16 – Micrografia eletrônica de transmissão dos condrócitos da CAM

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Em A-C, nota-se os formatos dos condrócitos dos grupos jovem (A), adulto (B) e idoso (C). Em D-F, verifica-se os diferentes aspectos do retículo endoplasmático rugoso dos condrócitos de indivíduos jovens (D), adultos (E) e idosos (F), onde se observa a conformação e densidade das cisternas e de ribossomos, muito alteradas no grupo idoso. Em G-I, visualiza-se grande densidade de heterocromatina (elétrondensa) dispersa no grupo jovem (setas), uma distribuição homogênea da heterocromatina e da eucromatina (elétronlúcida) no grupo adulto (H), e a heterocromatina formando adensamentos, principalmente próximo à membrana nuclear (setas) no grupo idoso (I). Barra de escala: A-C - 5 μ m; D-G - 0,5 μ m; H, I - 1 μ m

Figura 17 – Micrografia eletrônica de transmissão da camada madura da CAM

Fonte: Bautz (2017)

Legenda: Em **A-C**, observa-se a matriz territorial da camada madura nos grupos jovem (A), adulto (B) e idoso (C). Em **D-F**, nota-se em maior aumento o agrupamento em feixes eletrondensos no grupo jovem (D) (setas), a maior densidade e a organização das fibrilas colágenas em diferentes direções no grupo adulto (E), e a menor densidade no grupo idoso (F). c - condrócito; m - matriz territorial. Barra de escala: A-C- 2 μ m; D-F- 1 μ m

6 DISCUSSÃO

Biologicamente, o envelhecimento resulta do acúmulo de ampla variedade de alterações moleculares e celulares ao longo do tempo, o que leva a uma diminuição gradual da capacidade física e mental e aumento da predisposição a doenças, inclusive a OA²⁹. Diante disso, é possível afirmar que o conhecimento do processo biológico natural do envelhecimento é de fundamental importância para que se atue no processo de prevenção e tratamento de enfermidades, e assim, garantir uma melhor qualidade de vida para a população.

A ATM é submetida a forças compressivas e friccionais ao longo de toda a vida. Porém, fatores como o envelhecimento podem diminuir sua capacidade adaptativa a essas forças, e consequentemente torná-la susceptível à degeneração e a OA¹⁷². A etiologia da OA está diretamente relacionada a um desequilíbrio entre os processos anabólicos e catabólicos controlados pelos condrocitos e, na ATM, fatores biomecânicos como a disfunção oclusal, a perda dos dentes e o bruxismo contribuem para o seu surgimento¹⁷³.

Devido a diversidade de ocorrência de aspectos degenerativos encontradas no **grupo idoso**, pode-se sugerir que as alterações relacionadas ao envelhecimento ocorrem na CAM, mas nem sempre a OA irá se manifestar. Estudos com camundongos de 18 meses revelaram animais com e sem lesões degenerativas da OA¹⁷⁴. Como esses aspectos foram encontrados na presente pesquisa, pode-se afirmar que o envelhecimento não necessariamente causa OA, mas que as alterações decorrentes dela proporcionam uma base sobre a qual a OA pode se instalar^{52,175}.

O envelhecimento é um fator dominante associado à degeneração da ATM, a qual parece ser um reflexo do acúmulo de lesões teciduais somadas à redução da capacidade de reparo¹⁷⁶. É também um fator determinante na fraqueza articular com senescência dos condrocitos e redução das respostas aos fatores de crescimento⁴⁷. Ainda, afeta amplamente a capacidade da CA em

responder aos estímulos mecânicos⁵³. A estrutura da CA frequentemente se deteriora com a idade por um desarranjo interno que pode levar à erosão e ao desgaste. Contudo, a principal causa direta da lesão articular ainda é a sobrecarga⁶⁵.

Embora vários estudos correlacionam o desenvolvimento da OA com o envelhecimento, o real mecanismo ainda não foi identificado. A correlação depende de algumas modificações que ocorrem na estrutura da CA e que afeta os condrócitos e a MEC, resultando na diminuição da capacidade de adaptação aos diferentes estímulos²¹, diferentemente do que se observa no jovem que é capaz de recuperar a morfologia da ATM 7 dias após a aplicação de forças compressivas que inicialmente (3 dias) promovem diminuição na espessura da CAM⁸.

Desta forma, em relação aos aspectos morfológicos da CAM nos diferentes estágios de desenvolvimento estudados (**jovem, adulto e idoso**), observou-se tanto alterações quantitativas relativas à densidade de células e ao número de camadas presentes, como qualitativas, evidenciadas no padrão histológico de cada uma dessas camadas ao longo do tempo.

A densidade total de células da CAM reduziu em 40,93% e 47,63% nos **grupos adulto e idoso** em relação ao **grupo jovem**, sendo, portanto, mais expressiva no primeiro ano de vida do animal, provavelmente, devido ao processo de crescimento ainda ativo na fase inicial. Quando comparados os **grupos adulto e idoso**, notou-se que a densidade de células continuou a diminuir, porém, em menor intensidade (11,35%), mas de maneira significativa. Resultados semelhantes foram observados em camundongos onde a redução em relação ao valor encontrado após o nascimento (7dias) foi de 56,43% aos 3 meses de idade e de 68,83% aos 12 meses⁴¹ e em humanos, qualitativamente^{43,55}.

A constituição da CAM do **grupo jovem** nas cinco camadas características^{34-37,177} e, ainda, o processo de ossificação ativo, demonstraram que as mandíbulas desses animais estavam no período de crescimento,

correspondente aos primeiros 20 e/ou 30 anos em humano^{39,40,42}. No **grupo adulto**, a CAM apresentou-se como qualquer outra CA do organismo, exceto pelo fato de ser fibrocartilágnea, caracterizada pelo desaparecimento das *camadas de transição e hipertrófica*, semelhante ao descrito em ratos com 8³⁴⁻³⁶ e 9 meses de idade¹⁷⁸. O **grupo idoso** exibiu as mesmas três camadas na CAM, porém, estas apresentaram alterações morfológicas e/ou degenerativas.

A presença de uma *camada fibrosa* composta por feixes colágenos cobrindo a CAM foi identificada integralmente nos animais dos **grupos jovem e adulto**. Entretanto, neste, ela passou a exibir apenas duas ou três faixas de fibroblastos paralelos à face articular frente às cinco ou seis observadas no **grupo jovem**, como previamente descrito na CAM de humanos⁴³ e de ratos jovens^{34-36,179}. Já no **grupo idoso**, essa camada exibiu áreas ora de tecido conjuntivo fibroso, ora fibrocartilágnea, com presença de células semelhantes a condrócitos e com poucos, ou até mesmo, ausência de fibroblastos, tal como o descrito na transformação da CAM de humanos. Esse processo, definido como “cartilaginificação”, onde, inicialmente, a MEC sofre um adensamento das fibras colágenas e, posteriormente, é substituída por fibrocartilagem, ocorre principalmente nos terços anterior e médio da CAM, onde a carga é maior durante a mastigação⁴².

A ausência parcial ou total da *camada fibrosa* foi detectada em 50% das CAMs de humanos com mais de 50 anos e, quando presente, em 55,5% o tecido foi considerado anormal¹⁸⁰. Moffett et al.¹⁸¹ descreveram áreas em que a fibrocartilagem estava presente em toda a espessura da CAM de humanos. Segundo esses autores, há uma contínua e lenta transformação do tecido fibroso articular em fibrocartilagem nas áreas submetidas à carga, enquanto que as áreas não funcionais da CAM não sofrem esse processo. Isso indica que o tecido conjuntivo é passível de se transformar em cartilagem, desde que, esteja submetido à ação da mecânica articular. Em decorrência dessa transformação da *camada fibrosa*, o uso do termo “zona superficial” foi sugerido para descrevê-la⁴².

As modificações observadas na *camada proliferativa*, como a redução da densidade celular, perda de continuidade, desarranjo celular e aumento das fibras colágenas do tipo I aqui observadas, foram descritas como uma característica normal do envelhecimento^{42,177,180}. Em humanos, verificou-se que essas alterações se iniciam na CAM a partir da segunda metade da adolescência, num ritmo lento, que se acelera a partir dos 55 anos⁴². Tem sido sugerido que as células mesenquimais indiferenciadas presentes nessa camada se diferenciam em condrócitos para manutenção da *camada madura* durante o período de crescimento do indivíduo⁴⁵. Porém, a persistência da perda celular, uma vez findado esse período, ainda é uma incógnita, podendo ser atribuída à manutenção de células das camadas vizinhas, à apoptose celular e à perda da capacidade proliferativa decorrente da senescência⁴². Essas células são importantes para a remodelação e reparo da CAM, sendo que, sua depleção com o envelhecimento, interfere nesses processos⁴³.

A *camada madura* constituiu-se de condrócitos com formato ovoide e polaridade celular incluídos numa MEC fibrocartilágnea em todos os grupos, o que corrobora outros trabalhos^{34,35,40,42,177}. Essa característica da MEC foi progressiva com a idade e referendada pelo aumento, também progressivo, nas imunomarcações para o colágeno tipo I, as quais foram mais evidentes no **grupo idoso**.

Apesar da ausência da *camada madura* já ter sido relatada em CAM de humanos, principalmente naqueles acima dos 50 anos¹⁸⁰ as amostras estudadas exibiram apenas extensas áreas de calcificação da cartilagem no **grupo idoso**, com avanço e multiplicação das linhas basofílicas (*tidemarks*), como também visualizado em CAMs de humanos¹⁸¹ e ratos¹⁸² idosos, que exibiram uma redução na espessura da cartilagem madura. Além disso, a presença da cartilagem calcificada detectada no **grupo idoso** reflete a tendência do platô ósseo subcondral avançar em direção à face articular com o envelhecimento. Como consequência, tem-se o aumento da dureza da CAM e, funcionalmente, a diminuição da capacidade de suportar cargas. Diante disso, tem-se a calcificação da CAM como um fenótipo da OA⁵⁴.

Em relação aos aspectos ultraestruturais da CAM, pode-se observar nos condrócitos do **grupo idoso** alterações como: indentações nucleares, menor densidade de RER e distribuição menos homogênea da cromatina, o que representa uma menor atividade de transcrição e tradução de proteínas. Ainda, a matriz territorial desse grupo exibiu menor densidade aparente de fibrilas colágenas, provavelmente como reflexo das alterações celulares encontradas. Essa redução na síntese de proteínas também já foi observada em joelhos de camundongos (C57) idosos, porém, a MEC desses animais passou a exibir alterações apenas quando a OA estava instalada¹⁸³. Em humanos idosos, a CA do joelho exibiu moderada dilatação do RER e presença de abundantes depósitos lipídicos que foram associadas ao processo normal de envelhecimento¹⁸⁴. Nos **grupos jovem e adulto**, a grande quantidade de fibrilas colágenas na matriz territorial está de acordo com o observado na literatura na CAM de coelhos¹⁸⁵ e ratos⁵⁹.

Ao se analisar a expressão do colágeno tipo I, pode-se notar um aumento progressivo na intensidade da marcação em paralelo à idade dos animais. No **grupo jovem**, a expressão foi observada apenas nas *camadas fibrosa e madura*, de forma semelhante ao descrito para CAM de ratos com 1 mês de vida^{59,67}. Nos grupos **adulto e idoso** notou-se a imunomarcação em toda a extensão da CAM, portanto, englobando as *camadas fibrosa, proliferativa e madura*, conforme o reportado em humanos⁵⁵ e ratos¹⁷⁸. Entretanto, uma fraca marcação para o colágeno tipo I foi relada em CAMs de humanos com mais de 70 anos de idade⁵⁵.

Estudos com a técnica da hibridização *in situ* revelaram que células da CAM foram positivas para colágeno tipo I em ratos com 4 e 8 semanas de idade, com exceção daquelas da *camada hipertrófica*. Enquanto que, nos animais com 16 e 32 semanas os sinais foram fracos na *camada fibrosa* e presentes nas *camadas proliferativa e madura*³⁴. Ao comparar-se esses achados com os aqui verificados pela imuno-histoquímica, pode-se sugerir que a redução na sinalização das células na *camada fibrosa* esteja relacionada à menor demanda de síntese, uma vez que, nos estágios iniciais do desenvolvimento da CAM, a *camada fibrosa* já exibe elevada densidade de fibras colágenas do tipo I e,

também, baseia o processo de transformação dessa camada em fibrocartilagem, a cartilaginificação. Em contrapartida, o aumento da intensidade dos sinais para hibridização *in situ* nas células das *camadas proliferativa e madura* na fase adulta são temporais ao aumento da intensidade na marcação imuno-histoquímica do colágeno tipo I na MEC, reforçando que, com a idade, as camadas mais profundas tornam-se cada vez mais fibrocartilagíneas.

Estruturalmente, a disposição dos feixes de fibras colágenas do tipo I na CAM formou um padrão em arcos, semelhante ao observado pela técnica do picro-sírius em CAM de coelhos³⁷.

Na *camada fibrosa*, notou-se que esses feixes eram paralelos à face articular tanto no **grupo jovem**, quanto no **grupo adulto**, sendo que, neste foram mais bem organizados do que naquele. Essa disposição também foi descrita em estudos com a microscopia eletrônica de varredura em humanos¹⁸⁶. Já no **grupo idoso**, embora tenha sido detectada uma maior intensidade de marcação para o colágeno do tipo I nessa camada, não foi possível visualizar uma disposição tridimensional, mas um adensamento característico daquela observada em fibrocartilagens.

Na *camada proliferativa*, a marcação para o colágeno do tipo I só foi observada nos **grupos adulto e idoso**, que apresentaram uma disposição dos feixes semelhante àquela descrita para a camada suprajacente. Na *camada madura*, foi detectada na MEC do **grupo jovem**, porém, com aspecto mais difuso e de difícil visualização dos feixes. Esses, porém, foram evidentes nos **grupos adulto e idoso**, onde partiam verticalmente do osso subcondral até alcançarem as camadas mais superficiais para constituírem a configuração em arcos. A disposição em arcos e a característica mais fibrosa da *camada madura* com o tempo tem sido encontrada em CAM de humanos⁴² e de ratos¹⁷⁸ idosos. Adicionalmente, foi possível observar que as marcações para o colágeno tipo I foram mais intensas nos animais do **grupo idoso**.

A perda de proteoglicanos é um dos primeiros eventos observados nos estágios iniciais de desenvolvimento da OA^{44,50} e está associada à menor

capacidade da CA suportar força compressivas e ao aumento do estresse sobre as fibras colágenas da CAM^{26,65}. O azul de toluidina e a safranina-O são corantes catiônicos com relativa especificidade de ligação a proteoglicanos e GAGs e, portanto, são amplamente utilizados para detectar áreas de perda dessas moléculas¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, mesmo que, a quantificação de proteoglicanos através da intensidade de coloração por esses métodos não seja recomendada^{188,190}.

Em relação a matriz territorial da CAM, a coloração catiônica apresentou-se intensa e circunscrita ao condrom^{187,191}. Já a matriz interterritorial exibiu padrões diferentes de coloração. Nos **grupos jovem e adulto**, áreas extensas de coloração catiônica foram observadas na matriz interterritorial em toda a CAM, sendo mais intensa nas *camadas madura e hipertrófica*, e fraca na *camada fibrosa* como o descrito em ATM de ratos de 6-9 semanas¹⁹². Um estudo com hibridização *in situ* para agrecana revelou a presença deste proteoglicano apenas nas duas camadas mais profundas da CAM de ratos com 4 e 8 semanas e na *camada madura* de ratos com 4 e 8 meses³⁶, corroborando os resultados aqui obtidos. Já no **grupo idoso**, as áreas de matriz interterritorial coradas pelo azul de toluidina e pela safranina-O foram escassas, estando ausentes na maior parte da CAM, indicando ampla redução no conteúdo de proteoglicanos da MEC. Essa redução na coloração pode estar associada à diminuição na sulfatação e no tamanho das moléculas de agrecana e ao menor número de agrecanas por agregado no idoso^{65,193} que podem ser consequência de sua degradação, de alterações no processo de síntese e/ou de ambos⁵⁰.

Quanto ao proteoglicano lubricina, considerado como de fundamental importância para a função e integridade articular devido ao seu papel condroprotetor e principalmente à sua característica de lubrificante limítrofe, o mesmo foi expresso na MEC das *camadas fibrosa, proliferativa e madura* (parte superficial) das CAMs dos **grupos jovem e adulto**, bem como na face articular da CAM, como uma densa faixa de marcação. Esses resultados mostram que a CAM é capaz de acumular a lubricina em sua face articular, como o descrito em CAM de novilhos,⁹¹ e também, em certa profundidade (*camadas fibrosa e proliferativa*) como encontrado em ratos de 7 e 9 semanas¹⁰² e 4 meses¹⁰³. Estudos com joelho de bovinos tem demonstrado que a lubricina se aprofunda

na CA do fêmur e da tíbia¹⁰⁶, e que o nível de expressão dessa molécula aumenta em profundidade nas regiões mais anteriores de ambos os côndilos femorais, as quais sofrem as mais altas pressões de contato¹⁰⁵.

A lubricina também tem sido encontrada com substancial profundidade no menisco articular de bovinos⁹⁰, CA de joelhos humanos¹⁰⁹ e nas *camadas* superficial e média da CA do fêmur de ratos¹¹⁶. No primeiro, essa proteoglicana estava localizada ao redor de fibras colágenas radiais e circunferências, sugerindo uma lubrificação necessária para a movimentação dos feixes de colágeno quando submetidos à tensão⁹⁰.

Nos animais do **grupo idoso**, a lubricina estava ausente na face articular e foi fracamente identificada na MEC da *camada fibrosa*. Nas *camadas proliferativa* e *madura* ela foi expressa, porém em uma menor proporção do que o observado nos demais grupos, estendendo-se principalmente entre a parte profunda da primeira e superficial da segunda. A diminuição e a ausência da expressão de lubricina também foi relatada nas CAs dos fêmures de ratos com 2 anos de idade, as quais também exibiram leves alterações estruturais como fragmentação e fissuras da CA¹¹⁹.

A aparente adesão do disco articular à CAM, a redução na densidade de células, a deposição de tecido fibroso e a presença de fibrilação da face articular da CAM estão entre as lesões encontradas nas amostras do **grupo idoso** cuja causa pode ser atribuída à diminuição da expressão da lubricina, uma vez que, além da lubrificação limítrofe essa molécula apresenta ações condroprotetoras como: inibição da adesão celular, da deposição de proteína⁸⁵ e prevenção da apoptose de condrócitos^{110,111}. Ainda, animais com o gene PGR4 silenciados (*“knockout”*) exibiram alterações tanto no joelho^{85,194} quanto na ATM^{6,11,195–197}, sendo que, as principais foram: hiperplasia sinovial decorrente de aumento da proliferação celular e fibrose; depósitos proteicos e/ou material fibrinóide nas superfícies articulares, as quais, apresentam-se irregulares; diminuição na quantidade de condrócitos na camada superficial; aderência do disco articular à CAM; formação de osteófitos e calcificações distróficas em tendões e ligamentos do joelho e disco articular da ATM; perda de proteoglicanos pericelulares;

espessamento do disco articular da ATM; aumento da apoptose na CAM¹⁹⁵ e redução da densidade celular¹⁹⁷.

A possível influência da lubricina na morfogênese articular também tem sido alvo de estudos, mas ainda não está esclarecida. Primeiramente, observou-se que a lubricina é expressa desde os estágios precoces do desenvolvimento da ATM¹⁹⁸ e da articulação glenoumeral de camundongos, inicialmente em níveis baixos que se elevam com o passar do tempo⁸⁵. Ainda, quando não há formação da cavidade articular na CAM, como ocorre em animais silenciados para *Indian hedgehog* (Ihh) (inglês), a lubricina não é expressa, levando a presumir que ela possa ser importante para criação dessa cavidade, afastando os tecidos vizinhos através de sua capacidade antiadesão¹⁹⁸. No entanto, animais com o gene PRG4 silenciados exibem articulações⁸⁵, inclusive a ATM^{11,195}, com aspectos histológicos normais ao nascimento, o que comprova que a lubricina não influencia na morfogênese da articulação.

Tem sido sugerido que a p-SMAD2L permanece no citoplasma até que ocorra sua ativação pela fosforilação C-terminal¹⁹⁹ tornando-a um evento de preparação para via canônica do TGF- β ^{158,200}, a qual ativa a translocação nuclear e a transcrição gênica¹⁶¹. No presente estudo, optou-se pela análise imuno-histoquímica da p-SMAD2 fosforilada na cadeia de ligação, uma vez que, sua presença no núcleo tem sido atribuída ao aumento da transcrição^{160,161} e expressão de moléculas da MEC, como colágeno e proteoglicanos^{160,164}. Ainda, a fosforilação da cadeia de ligação da SMAD2 mediada pela via ERK2 se mostrou fundamental para as sínteses de colágenos tipos I e III induzidas pela TGF- β , em fibroblastos¹⁶⁴.

Qualitativamente, notou-se que as CAMs dos **grupos jovem e adulto** exibiram, em todas as suas camadas, células p-SMAD2L com marcações nucleares, evidenciando que elas estavam respondendo ativamente aos efeitos anabólicos do TGF- β . Diferentemente, a CAM do **grupo idoso** exibiu apenas poucas células imunopositivas, localizadas principalmente na parte superior da *camada madura*, sugerindo uma menor capacidade da CAM idosa em responder a esses efeitos. A partir desses dados, pode-se conjecturar que o aumento

progressivo da marcação para o colágeno tipo I, nos **grupos jovem e adulto**, é temporal aos níveis elevados de p-SMAD2L.

Quantitativamente, o **grupo idoso** exibiu também uma profunda redução, tanto na densidade (redução de 81,41% em relação ao **grupo jovem**), quanto na porcentagem (redução de 64,69% em relação ao **grupo jovem**) de células p-SMAD2L confirmando que a diminuição na presença da p-SMAD2L da CAM não está apenas vinculada a redução no número de células presentes, mas também ao fato de que as células que permanecem diminuem sua capacidade de ativar essa via, provavelmente devido a menor expressão de receptores T β RI. Essa hipótese é suportada ao se comparar os dados aqui obtidos com aqueles observados por Blaney Davidson et al.²⁰¹ em joelhos de camundongos idosos (24 meses), onde as CAs exibiram proporções equivalentes de células SMAD2. Entretanto, houve uma redução de 90,56% na densidade de células p-SMAD2 (de 53% de células aos 5 meses para 5% de células aos 24 meses) no côndilo medial, e de 64,7% no côndilo lateral da tíbia (85% para 30%), concomitante à redução na expressão dos receptores T β RI, T β RII, e dos fatores, TGF- β 2 e TGF- β 3. Rostam et al.¹⁵⁹ e Burch et al.¹⁶⁰ acrescentam que a inibição dos receptores T β RI bloqueia a fosforilação da cadeia de ligação da SMAD2 pelo TGF- β mediado pelas proteínas cinases do citoplasma. Ainda, em culturas explantes de condrócitos da CA da articulação metacarpofalângica de bovinos idosos apresentaram menor expressão basal do receptor T β RI, menor expressão de p-SMAD2 em todas as camadas da CA e uma ampla redução na fosforilação da SMAD2 em resposta ao estímulo mecânico de compressão dinâmica^{53,144}. Esses resultados sugerem que o menor teor de receptores T β RI associado à baixa capacidade de deformação da CA idosa, devido sua maior dureza e menor conteúdo de proteoglicanos, como o observado no **grupo idoso** da presente pesquisa, reduz a transmissão do estímulo mecânico aos condrócitos, com consequente prejuízo da resposta.

A relação entre a expressão do TGF- β e a produção da lubricina tem sido documentada em diversos estudos e modelos experimentais, porém, de acordo com a literatura a que se teve acesso, essa é a primeira vez em que se pôde observar uma relação entre a p-SMAD2L e a presença da lubricina.

Ao se analisar as expressões da lubricina e da p-SMAD2L, detectou-se uma distribuição semelhante dessas moléculas na estrutura da CAM. Essa característica foi observada nos **grupos jovem e adulto**, e foi sobretudo notável na CAM do **grupo idoso**, onde ambas estavam expressas em uma faixa englobando áreas vizinhas das *camadas proliferativa e madura*. Diante disso, é possível sugerir uma relação positiva entre a produção e o acúmulo de lubricina e a presença de células expressando a p-SMAD2L em seus núcleos.

A p-SMAD2L aumentou a produção de proteoglicanos em células musculares lisas de vasos sanguíneos. Nessas células o TGF- β estimulou a fosforilação das vias p38, ERK, e SMAD2 em suas cadeias C-terminal e de ligação resultando em aumento da síntese de biglicano, sendo que, o bloqueio das vias p38 e ERK exibiu redução da p-SMAD2L e da síntese desse proteoglicano. Desta forma, tem-se que a fosforilação da região de ligação da SMAD2 pelas vias p38 e ERK ativadas pelo TGF- β medeiam a síntese de biglicano¹⁶³. Ainda, nesse tipo celular, observou-se que a fosforilação dos três sítios (Ser245/250/255) da SMAD2 pelo TGF- β mediado pelas vias PI3K e ERK induzem a expressão de RNAm e das enzimas ChSy-1 e C4ST-1 envolvidas na síntese de GAGs¹⁵⁹.

O TGF- β foi capaz de estimular a expressão do gene *agrecana (Agc)* em células condrogênicas (ATDC5) através da fosforilação da cadeia C-terminal da SMAD2. Sendo que, a inibição das vias ERK1/2 e p38/MAPK, nessas células resultou em repressão do efeito indutor do TGF- β , indicando que as ativações dessas vias são necessárias para a expressão do gene *Agc*²⁰². Apesar de não ter sido avaliada a participação da p-SMAD2L nesse processo, é possível extrapolar, com base em dados atuais, que a inibição das vias ERK1/2 e p38/MAPKs impedem a fosforilação da cadeia de ligação da SMAD2 resultando na perda do efeito indutor do TGF- β do gene *Agc*.

Portanto, uma vez que as vias ERK1/2 e p38/MAPK medeiam a expressão do gene *agrecana* em células condrogênicas²⁰², participam da síntese de biglicano em células musculares lisas de vasos¹⁶³ e que as vias PI3K e ERK induzem a expressão de enzimas envolvidas na síntese de GAGs¹⁵⁹, podemos

sugerir que a redução da densidade de células p-SMAD2L observadas no **grupo idoso** contribui para perda de conteúdo proteoglicano e menor expressão da lubricina na CAM. Indicando que as vias ERK1/2, p38/MAPK, através da fosforilação da cadeia de ligação da SMAD2, agem sinergicamente a fosforilação C-terminal pelo complexo T β RI/TGF- β , estimulando a síntese de proteoglicanos, inclusive da lubricina.

Na ATM, os fibroblastos da CAM, em culturas de células e explantes⁹¹, e sinoviócitos em cultura de células¹¹³ aumentaram a produção e o acúmulo de lubricina quando tratados com TGF- β . Ainda, como efeito desse fator, a expressão da lubricina se aprofundou mais a partir da face articular⁹¹.

O TGF- β foi capaz de mediar a transdução de sinais mecânicos em expressão de lubricina na CA e na ATM. A aplicação de forças de cisalhamento em culturas explantes da CA¹⁰⁵ e da pressão hidrostática intermitente em sinoviócitos da ATM^{113,203} elevaram a expressão de lubricina e de p-SMAD 2/3. Porém, quando essas amostras foram tratadas com o inibidor do receptor T β RI, esse efeito indutor foi perdido^{105,203}.

Em células mesenquimais fenotipicamente normais o TGF- β foi capaz de fosforilar a cadeia C-terminal da SMAD2 pela interação com seus receptores (via canônica) e também a cadeia de ligação através da ativação da via ERK. Sendo que, este foi determinante tanto para o aumento do tempo de transcrição gênica, quanto o de permanência de fosforilação das SMADs 2/3 em fibroblastos. Ainda, a ativação da via ERK se mostrou necessária para que o TGF- β induzisse o processo de replicação¹⁶¹.

Assim, os resultados aqui obtidos, quando comparados àqueles disponíveis na literatura, permitem inferir que as células da CAM de ratos idosos (24 meses) apresentam uma redução da capacidade de fosforilar a SMAD2 no sítio Ser255 da cadeia de ligação e, como consequência, tem-se a diminuição de proteoglicanos na MEC, inclusive da lubricina. Entretanto, diante das controvérsias existentes sobre a função da fosforilação dos sítios da cadeia de ligação da SMAD2, novos estudos serão necessários para determinar o real

mecanismo do seu envolvimento com a produção da lubricina e outros proteoglicanos pelas células da CAM. Ainda, as menores expressões de p-SMAD2L e lubricina na CAM idosa é temporal ao surgimento de alterações morfológicas e de lesões degenerativas presentes nos estágios iniciais de desenvolvimento da OA. Além disso, a perda da lubricina proporciona menor proteção à face articular, a qual se torna susceptível ao desgaste, à adesão e à fibrilação. A perda dos proteoglicanos e o surgimento de áreas de cartilagem calcificada, aumentam a dureza da CAM, diminuindo sua capacidade de suportar cargas e de transmitir os estímulos mecânicos às células presentes. Em contrapartida, o aumento na expressão do colágeno tipo I sugere uma maior resistência a tração e ao cisalhamento que podem ser essenciais para a proteção da CAM idosa.

7 CONCLUSÕES

- I. No **jovem**, a CAM está composta por cinco camadas: *fibrosa, proliferativa, de transição, madura e hipertrófica*;
- II. No **adulto**, finalizado o período de crescimento, há o desaparecimento das *camadas de transição e hipertrófica*;
- III. No **idoso** há redução e perda da continuidade, com diminuição da população celular da *camada proliferativa*; transformação da CAM, inclusive da *camada fibrosa*, em uma estrutura fibrocartilágnea e aparecimento de lesões degenerativas;
- IV. A expressão do colágeno tipo I aumenta com o envelhecimento
- V. A expressão de lubricina está reduzida na CAM dos animais do **grupo idoso**, sobretudo na camada fibrosa onde praticamente está ausente na face articular;
- VI. O envelhecimento resulta em redução na densidade e porcentagem de células p-SMAD2L
- VII. No **grupo idoso**, a redução na expressão da lubricina, o menor conteúdo proteoglicano na MEC e a redução da densidade total de células da CAM podem ser uma consequência da menor ativação da via p-SMAD2L.

8 REFERÊNCIASⁱ

1. Testut L, Latarjet A. *Tratado de anatomia humana*. Vol 1. Barcelona [etc.]: Salvat; 1932.
2. Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH. *Gray Anatomia*. Vol 1. 37th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995.
3. Herring SW. TMJ anatomy and animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2003;3(4):391.
4. Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica texto, atlas*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2008.
5. Wang L, Detamore MS. Tissue Engineering the Mandibular Condyle. *Tissue Eng*. 2007;13(8):1955-1971. doi:10.1089/ten.2006.0152.
6. Bechtold TE, Saunders C, Decker RS, Um H-B, Cottingham N, Salhab I, Kurio N, Billings PC, Pacifici M, Nah H-D, Koyama E. Osteophyte formation and matrix mineralization in a TMJ osteoarthritis mouse model are associated with ectopic hedgehog signaling. *Matrix Biol*. 2016;52–54:339-354. doi:10.1016/j.matbio.2016.03.001.
7. Cheng J, Wang Y, Wang Z, Yang M, Wu Y. Differential regulation of proteoglycan-4 expression by IL-1 α and TGF- β 1 in rat condylar chondrocytes. *Tohoku J Exp Med*. 2010;222(3):211-218.
8. Teramoto M, Kaneko S, Shibata S, Yanagishita M, Soma K. Effect of compressive forces on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage. *J Bone Miner Metab*. 2003;21(5):276-286. doi:10.1007/s00774-003-0421-y.
9. Elsaid KA, Jay GD, Chichester CO. Reduced expression and proteolytic susceptibility of lubricin/superficial zone protein may explain early elevation in the coefficient of friction in the joints of rats with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(1):108-116. doi:10.1002/art.22321.

ⁱ De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
 Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por Anneliese
 Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão,
 Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e
 Documentação; 2011.
 Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

10. Flannery CR, Zollner R, Corcoran C, Jones AR, Root A, Rivera-Bermúdez MA, Blanchet T, Gleghorn JP, Bonassar LJ, Bendele AM, Morris EA, Glasson SS. Prevention of cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by intraarticular treatment with recombinant lubricin. *Arthritis Rheum.* 2009;60(3):840-847. doi:10.1002/art.24304.
11. Hill A, Duran J, Purcell P. Lubricin Protects the Temporomandibular Joint Surfaces from Degeneration. *PLoS ONE.* 2014;9(9). doi:10.1371/journal.pone.0106497.
12. Musumeci G, Trovato FM, Loreto C, Leonardi R, Szychlińska MA, Castorina S, Mobasher A. Lubricin expression in human osteoarthritic knee meniscus and synovial fluid: A morphological, immunohistochemical and biochemical study. *Acta Histochem.* 2014;116(5):965-972. doi:10.1016/j.acthis.2014.03.011.
13. Shen J, Li S, Chen D. TGF- β signaling and the development of osteoarthritis. *Bone Res.* 2014;2:14002. doi:10.1038/boneres.2014.2.
14. Flannery CR, Hughes CE, Schumacher BL, Tudor D, Aydelotte MB, Kuettner KE, Caterson B. Articular Cartilage Superficial Zone Protein (SZP) Is Homologous to Megakaryocyte Stimulating Factor Precursor and Is a Multifunctional Proteoglycan with Potential Growth-Promoting, Cytoprotective, and Lubricating Properties in Cartilage Metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254(3):535-541. doi:10.1006/bbrc.1998.0104.
15. Jones ARC, Flannery CR. Bioregulation of lubricin expression by growth factors and cytokines. *Eur Cell Mater.* 2007;13:40-45; discussion 45.
16. Khalafi A, Schmid TM, Neu C, Reddi AH. Increased accumulation of superficial zone protein (SZP) in articular cartilage in response to bone morphogenetic protein-7 and growth factors. *J Orthop Res.* 2007;25(3):293-303. doi:10.1002/jor.20329.
17. Niikura T, Reddi AH. Differential regulation of lubricin/superficial zone protein by transforming growth factor β /bone morphogenetic protein superfamily members in articular chondrocytes and synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 2007;56(7):2312-2321. doi:10.1002/art.22659.
18. Cuellar A, Reddi AH. Stimulation of Superficial Zone Protein/Lubricin/PRG4 by Transforming Growth Factor- β in Superficial Zone Articular Chondrocytes and Modulation by Glycosaminoglycans. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(13-14):1973-1981. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0381.
19. Lee SY, Nakagawa T, Reddi AH. Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein (SZP)/lubricin by mesenchymal progenitors in the infrapatellar fat pad of the knee joint treated with TGF- β 1

- and BMP-7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(1):148-153. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.138.
20. Lee SY, Niikura T, Reddi AH. Superficial Zone Protein (Lubricin) in the Different Tissue Compartments of the Knee Joint: Modulation by Transforming Growth Factor Beta 1 and Interleukin-1 Beta. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(11):1799-1808. doi:10.1089/ten.tea.2007.0367.
 21. Musumeci G, Aiello F, Szychlinska M, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst Century: Risk Factors and Behaviours that Influence Disease Onset and Progression. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):6093-6112. doi:10.3390/ijms16036093.
 22. Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(2):150-167. doi:10.1016/j.addr.2006.01.006.
 23. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, van den Berg WB. A role for age-related changes in TGF β signaling in aberrant chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):201. doi:10.1186/ar2896.
 24. Bao J, Chen W, Wu L. Lubricin: a novel potential biotherapeutic approaches for the treatment of osteoarthritis. *Mol Biol Rep.* 2011;38(5):2879-2885. doi:10.1007/s11033-010-9949-9.
 25. Loeser RF. Aging cartilage and osteoarthritis--what's the link? *Sci Aging Knowl Environ SAGE KE.* 2004;2004(29):pe31. doi:10.1126/sageke.2004.29.pe31.
 26. Moon PM, Beier F. Novel Insights into Osteoarthritis Joint Pathology from Studies in Mice. *Curr Rheumatol Rep.* 2015;17(8):1-11. doi:10.1007/s11926-015-0524-1.
 27. World Health Organization. Chronic rheumatic conditions. WHO. <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/>. Published 2015. Accessed June 22, 2016.
 28. United Nations D of E and SA Population Division. World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. 2015. https://esa.un.org/unpd/wpp/Publications/Files/Key_Findings_WPP_2015.pdf. Accessed June 21, 2016.
 29. World Health Organization. Ageing and health. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs404/en/>. Published September 2015. Accessed June 21, 2016.
 30. Nanci A. *Ten Cate Histologia Oral.* Elsevier Health Sciences Brazil; 2013. <https://books.google.com.br/books?id=fAcoaeZUJmUC>.

31. Klinge RF. The structure of the mandibular condyle in the monkey (*Macaca mulatta*). *Micron Oxf Engl* 1993. 1996;27(5):381-387.
32. Figún ME, Garino RR, Grossmann E. *Anatomia odontológica funcional e aplicada*. São Paulo: Artmed; 2003.
33. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ, Grossmann E, Souza MAL de, Fajardo AP, Dobrinski F, Souza FL de, Langeloh G, Brew MC. *Anatomia, embriologia e histologia bucal*. Porto Alegre: Artmed; 2004.
34. Bae J-W, Takahashi I, Sasano Y, Onodera K, Mitani H, Kagayama M, Mitani H. Age-related changes in gene expression patterns of matrix metalloproteinases and their collagenous substrates in mandibular condylar cartilage in rats. *J Anat*. 2003;203(2):235-241. doi:10.1046/j.1469-7580.2003.00196.x.
35. Takahashi I, Onodera K, Bae J-W, Mitani H, Sasano Y, Mitani H. Age-related changes in the expression of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in mandibular condylar, growth plate, and articular cartilage in rats. *J Mol Histol*. 2005;36(5):355-366. doi:10.1007/s10735-005-9007-4.
36. Mitani H, Takahashi I, Onodera K, Bae J-W, Sato T, Takahashi N, Sasano Y, Igarashi K, Mitani H. Comparison of age-dependent expression of aggrecan and ADAMTSs in mandibular condylar cartilage, tibial growth plate, and articular cartilage in rats. *Histochem Cell Biol*. 2006;126(3):371-380. doi:10.1007/s00418-006-0171-8.
37. Galhardo MS, Caldini EG, Battlehner CN, Toledo OMS. Age-dependent physiological changes in the histoarchitecture of the articular cartilage of the rabbit mandibular condyle: a morphological and morphometric study. *Cells Tissues Organs*. 2012;195(4):340-352. doi:10.1159/000327722.
38. Jiao K, Dai J, Wang M-Q, Niu L-N, Yu S, Liu X-D. Age- and sex-related changes of mandibular condylar cartilage and subchondral bone: A histomorphometric and micro-CT study in rats. *Arch Oral Biol*. 2010;55(2):155-163. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.11.012.
39. Lubsen CC, Hansson TL, Nordström BB, Solberg WK. Histomorphometry of age and sex changes in mandibular condyles of young human adults. *Arch Oral Biol*. 1987;32(10):729-733.
40. Luder HU. Frequency and distribution of articular tissue features in adult human mandibular condyles: a semiquantitative light microscopic study. *Anat Rec*. 1997;248(1):18-28.
41. Livne E. Matrix synthesis in mandibular condylar cartilage of aging mice. *Osteoarthritis Cartilage*. 1994;2(3):187-197. doi:10.1016/S1063-4584(05)80068-8.

42. Luder HU. Age changes in the articular tissue of human mandibular condyles from adolescence to old age: a semiquantitative light microscopic study. *Anat Rec.* 1998;251(4):439-447.
43. Ishibashi H, Takenoshita Y, Ishibashi K, Oka M. Age-related changes in the human mandibular condyle. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(9):1016-1023. doi:10.1016/0278-2391(95)90117-5.
44. Yan J-Y, Tian F-M, Wang W-Y, Cheng Y, Xu H-F, Song H-P, Zhang Y-Z, Zhang L. Age Dependent Changes in Cartilage Matrix, Subchondral Bone Mass, and Estradiol Levels in Blood Serum, in Naturally Occurring Osteoarthritis in Guinea Pigs. *Int J Mol Sci.* 2014;15(8):13578-13595. doi:10.3390/ijms150813578.
45. Lubsen CC, Hansson TL, Nordström BB, Solberg WK. Histomorphometric analysis of cartilage and subchondral bone in mandibular condyles of young human adults at autopsy. *Arch Oral Biol.* 1985;30(2):129-136.
46. Martin JA, Buckwalter JA. Human chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biorheology.* 2002;39(1-2):145-152.
47. Leong DJ, Sun HB. Events in Articular Chondrocytes with Aging. *Curr Osteoporos Rep.* 2011;9(4):196-201. doi:10.1007/s11914-011-0070-3.
48. van der Kraan PM, van den Berg WB. Osteoarthritis in the context of ageing and evolution. *Ageing Res Rev.* 2008;7(2):106-113. doi:10.1016/j.arr.2007.10.001.
49. Shane Anderson A, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24(1):15-26. doi:10.1016/j.berh.2009.08.006.
50. Martin JA, Buckwalter JA. Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis. *Biogerontology.* 2002;3(5):257-264.
51. Touré G, Duboucher C, Vacher C. Anatomical modifications of the temporomandibular joint during ageing. *Surg Radiol Anat.* 2004;27(1):51-55. doi:10.1007/s00276-004-0289-0.
52. Lotz M, Loeser RF. Effects of aging on articular cartilage homeostasis. *Bone.* 2012;51(2):241-248. doi:10.1016/j.bone.2012.03.023.
53. Madej W, van Caam A, Blaney Davidson EN, Hannink G, Buma P, van der Kraan PM. Ageing is associated with reduction of mechanically-induced activation of Smad2/3P signaling in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;24(1):146-157. doi:10.1016/j.joca.2015.07.018.
54. Moriyama H, Kanemura N, Brouns I, Pintelon I, Adriaensen D, Timmermans J-P, Ozawa J, Kito N, Gomi T, Deie M. Effects of aging and

- exercise training on the histological and mechanical properties of articular structures in knee joints of male rat. *Biogerontology*. 2012;13(4):369-381. doi:10.1007/s10522-012-9381-8.
55. Ishibashi H, Takenoshita Y, Ishibashi K, Oka M. Expression of extracellular matrix in human mandibular condyle. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 1996;81(4):402-414. doi:10.1016/S1079-2104(96)80015-1.
 56. Mizoguchi I, Takahashi I, Sasano Y, Kagayama M, Mitani H. Localization of types I, II and III collagen and glycosaminoglycans in the mandibular condyle of growing monkeys: an immunohistochemical study. *Anat Embryol (Berl)*. 1997;195(2):127-135.
 57. Pirttiniemi P, Kantomaa T, Salo L, Tuominen M. Effect of reduced articular function on deposition of type I and type II collagens in the mandibular condylar cartilage of the rat. *Arch Oral Biol*. 1996;41(1):127-131. doi:10.1016/0003-9969(95)00102-6.
 58. Orajärvi M, Thesleff I, Hartikainen H, Raustia A, Pirttiniemi P. Effect of Estrogen and Food Hardness on Metabolism and Turnover of Condylar Cartilage. *J Oral Facial Pain Headache*. 2015;29(3):297-307.
 59. Uekita H, Takahashi S, Domon T, Yamaguchi T. Changes in collagens and chondrocytes in the temporomandibular joint cartilage in growing rats fed a liquid diet. *Ann Anat - Anat Anz*. 2015;202:78-87. doi:10.1016/j.aanat.2015.08.006.
 60. Farias-Neto A, Martins APVB, Sánchez-Ayala A, Rabie ABM, Novaes PD, Rizzatti-Barbosa CM. The effect of posterior tooth loss on the expression of type II collagen, IL-1 β and VEGF in the condylar cartilage of growing rats. *Arch Oral Biol*. 2012;57(11):1551-1557. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.05.002.
 61. Wattanachai T, Yonemitsu I, Kaneko S, Soma K. Functional Lateral Shift of the Mandible Effects on the Expression of ECM in Rat Temporomandibular Cartilage. *Angle Orthod*. 2009;79(4):652-659. doi:10.2319/080808-417.1.
 62. Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, Liem RS. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 1995;53(8):924-929.
 63. Ross MH, Pawlina W. *Histologia: texto e atlas: em correlação com a biologia celular e molecular*. 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
 64. Eyre D. Articular cartilage and changes in Arthritis: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*. 2002;4(1):30-35. doi:10.1186/ar380.

65. Kuroda S, Tanimoto K, Izawa T, Fujihara S, Koolstra JH, Tanaka E. Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(11):1408-1415. doi:10.1016/j.joca.2009.04.025.
66. Tanimoto K, Kamiya T, Tanne Y, Kunimatsu R, Mitsuyoshi T, Tanaka E, Tanne K. Superficial zone protein affects boundary lubrication on the surface of mandibular condylar cartilage. *Cell Tissue Res*. 2011;344(2):333-340. doi:10.1007/s00441-011-1156-z.
67. Mizoguchi I, Nakamura M, Takahashi I, Kagayama M, Mitani H. An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. *Histochemistry*. 1990;93(6):593-599.
68. Mizoguchi I, Takahashi I, Nakamura M, Sasano Y, Sato S, Kagayama M, Mitani H. An immunohistochemical study of regional differences in the distribution of type I and type II collagens in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol*. 1996;41(8):863-869. doi:10.1016/S0003-9969(96)00021-0.
69. Ruggiero L, Zimmerman BK, Park M, Han L, Wang L, Burris DL, Lu XL. Roles of the Fibrous Superficial Zone in the Mechanical Behavior of TMJ Condylar Cartilage. *Ann Biomed Eng*. 2015;43(11):2652-2662. doi:10.1007/s10439-015-1320-9.
70. Delatte M, Von den Hoff JW, van Rheden REM, Kuijpers-Jagtman AM. Primary and secondary cartilages of the neonatal rat: the femoral head and the mandibular condyle. *Eur J Oral Sci*. 2004;112(2):156-162. doi:10.1111/j.0909-8836.2004.00108.x.
71. Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2859-2869.
72. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978. doi:10.1101/cshperspect.a004978.
73. Shen G, Hägg U, Rabie A, Kaluarachchi K. Identification of temporal pattern of mandibular condylar growth: a molecular and biochemical experiment. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8(2):114-122. doi:10.1111/j.1601-6343.2005.00316.x.
74. Alberts B. *Biologia molecular da celula*. Porto Alegre: Artes Medicas; 2010.
75. Del Santo M, Marches F, Ng M, Hinton RJ. Age-associated changes in decorin in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol*. 2000;45(6):485-493.

76. Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MB, Kuettner KE. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys*. 1994;311(1):144-152. doi:10.1006/abbi.1994.1219.
77. Radin EL, Swann DA, Weisser PA. Separation of a hyaluronate-free lubricating fraction from synovial fluid. *Nature*. 1970;228(5269):377-378.
78. Swann DA, Radin EL. The Molecular Basis of Articular Lubrication I. PURIFICATION AND PROPERTIES OF A LUBRICATING FRACTION FROM BOVINE SYNOVIAL FLUID. *J Biol Chem*. 1972;247(24):8069-8073.
79. Swann DA, Sotman S, Dixon M, Brooks C. The isolation and partial characterization of the major glycoprotein (LGP-I) from the articular lubricating fraction from bovine synovial fluid. *Biochem J*. 1977;161(3):473-485.
80. Swann DA, Slayter HS, Silver FH. The molecular structure of lubricating glycoprotein-I, the boundary lubricant for articular cartilage. *J Biol Chem*. 1981;256(11):5921-5925.
81. Swann DA, Silver FH, Slayter HS, Stafford W, Shore E. The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. *Biochem J*. 1985;225(1):195-201.
82. Jay GD, Harris DA, Cha CJ. Boundary lubrication by lubricin is mediated by O-linked beta(1-3)Gal-GalNAc oligosaccharides. *Glycoconj J*. 2001;18(10):807-815.
83. Ikegawa S, Sano M, Koshizuka Y, Nakamura Y. Isolation, characterization and mapping of the mouse and human PRG4 (proteoglycan 4) genes. *Cytogenet Genome Res*. 2000;90(3-4):291-297. doi:10.1159/000056791.
84. Jay GD, Tantravahi U, Britt DE, Barrach HJ, Cha C-J. Homology of lubricin and superficial zone protein (SZP): Products of megakaryocyte stimulating factor (MSF) gene expression by human synovial fibroblasts and articular chondrocytes localized to chromosome 1q25. *J Orthop Res*. 2001;19(4):677-687. doi:10.1016/S0736-0266(00)00040-1.
85. Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, Jay GD, Stewart M, Wang H, Warman ML, Carpten JD. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest*. 2005;115(3):622-631. doi:10.1172/JCI200522263.
86. Marcelino J, Carpten JD, Suwairi WM, Gutierrez OM, Schwartz S, Robbins C, Sood R, Makalowska I, Baxevanis A, Johnstone B, Laxer RM, Zemel L, Kim CA, Herd JK, Ihle J, Williams C, Johnson M, Raman V, Alonso LG, Brunoni D, Gerstein A, Papadopoulos N, Bahabri SA, Trent JM, Warman ML. CACP, encoding a secreted proteoglycan, is mutated in

- camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome. *Nat Genet.* 1999;23(3):319-322. doi:10.1038/15496.
87. Nandagopalan RS, Phadke SR, Dalal AB, Ranganath P. Novel mutations in PRG4 gene in two Indian families with camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis (CACP) syndrome. *Indian J Med Res.* 2014;140(2):221-226.
 88. Jay GD, Britt DE, Cha CJ. Lubricin is a product of megakaryocyte stimulating factor gene expression by human synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 2000;27(3):594-600.
 89. Lord MS, Estrella RP, Chuang CY, Youssef P, Karlsson NG, Flannery CR, Whitelock JM. Not All Lubricin Isoforms Are Substituted with a Glycosaminoglycan Chain. *Connect Tissue Res.* 2012;53(2):132-141. doi:10.3109/03008207.2011.614364.
 90. Schumacher BL, Schmidt TA, Voegtline MS, Chen AC, Sah RL. Proteoglycan 4 (PRG4) synthesis and immunolocalization in bovine meniscus. *J Orthop Res.* 2005;23(3):562-568. doi:10.1016/j.orthres.2004.11.011.
 91. Ohno S, Schmid T, Tanne Y, Kamiya T, Honda K, Ohno-Nakahara M, Swentko N, Desai TA, Tanne K, Knudson CB, Knudson W. Expression of superficial zone protein in mandibular condyle cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(8):807-813. doi:10.1016/j.joca.2006.02.002.
 92. Leonardi R, Almeida LE, Loreto C. Lubricin immunohistochemical expression in human temporomandibular joint disc with internal derangement: Human TMJ disc with internal derangement. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(7):587-592. doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01012.x.
 93. Leonardi R, Musumeci G, Sicurezza E, Loreto C. Lubricin in human temporomandibular joint disc: An immunohistochemical study. *Arch Oral Biol.* 2012;57(6):614-619. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.12.004.
 94. Leonardi R, Rusu MC, Loreto F, Loreto C, Musumeci G. Immunolocalization and expression of lubricin in the bilaminar zone of the human temporomandibular joint disc. *Acta Histochem.* 2012;114(1):1-5. doi:10.1016/j.acthis.2010.11.011.
 95. Thornton GM, Lemmex DB, Ono Y, Beach CJ, Reno CR, Hart DA, Lo IKY. Aging affects mechanical properties and lubricin/PRG4 gene expression in normal ligaments. *J Biomech.* 2015;48(12):3306-3311. doi:10.1016/j.jbiomech.2015.06.005.
 96. Lemmex DB, Ono Y, Reno CR, Hart DA, Lo IKY, Thornton GM. Increased lubricin/proteoglycan 4 gene expression and decreased modulus in medial collateral ligaments following ovariectomy in the adult rabbit:

- Evidence consistent with aging. *J Biomech.* 2016;49(3):382-387. doi:10.1016/j.jbiomech.2015.12.026.
97. Leonardi R, Loreto C, Talic N, Caltabiano R, Musumeci G. Immunolocalization of lubricin in the rat periodontal ligament during experimental tooth movement. *Acta Histochem.* 2012;114(7):700-704. doi:10.1016/j.acthis.2011.12.005.
 98. Sakata R, McNary SM, Miyatake K, Lee CA, Bogaerde JMV den, Marder RA, Reddi AH. Stimulation of the Superficial Zone Protein and Lubrication in the Articular Cartilage by Human Platelet-Rich Plasma. *Am J Sports Med.* 2015;43(6):1467-1473. doi:10.1177/0363546515575023.
 99. Nakagawa Y, Muneta T, Otabe K, Ozeki N, Mizuno M, Udo M, Saito R, Yanagisawa K, Ichinose S, Koga H, Tsuji K, Sekiya I. Cartilage Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expresses Lubricin In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE.* 2016;11(2). doi:10.1371/journal.pone.0148777.
 100. Thorpe CT, Karunaseelan KJ, Ng Chieng Hin J, Riley GP, Birch HL, Clegg PD, Screen HRC. Distribution of proteins within different compartments of tendon varies according to tendon type. *J Anat.* April 2016:n/a-n/a. doi:10.1111/joa.12485.
 101. Solka KA, Schmid TM, Miller IJ. Abundant lubricin expression suggests a link between synoviocytes, synovial tumors, and myxomas. *Histol Histopathol.* February 2016:11743. doi:10.14670/HH-11-743.
 102. Kure-Hattori I, Watari I, Takei M, Ishida Y, Yonemitsu I, Ono T. Effect of functional shift of the mandible on lubrication of the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2012;57(7):987-994. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.01.006.
 103. Zhou S, Xie Y, Li W, Huang J, Wang Z, Tang J, Xu W, Sun X, Tan Q, Huang S, Luo F, Xu M, Wang J, Wu T, chen L, Chen H, Su N, Du X, Shen Y, Chen L. Conditional Deletion of Fgfr3 in Chondrocytes leads to Osteoarthritis-like Defects in Temporomandibular Joint of Adult Mice. *Sci Rep.* 2016;6:24039. doi:10.1038/srep24039.
 104. Wei L, Xiong H, Li B, Cheng Y, Long X. Boundary-Lubricating Ability and Lubricin in Synovial Fluid of Patients With Temporomandibular Joint Disorders. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(10):2478-2483. doi:10.1016/j.joms.2010.01.018.
 105. Neu CP, Khalafi A, Komvopoulos K, Schmid TM, Reddi AH. Mechanotransduction of bovine articular cartilage superficial zone protein by transforming growth factor β signaling. *Arthritis Rheum.* 2007;56(11):3706-3714. doi:10.1002/art.23024.

106. Peng G, McNary SM, Athanasiou KA, Reddi AH. The distribution of superficial zone protein (SZP)/lubricin/PRG4 and boundary mode frictional properties of the bovine diarthrodial joint. *J Biomech.* 2015;48(12):3406-3412. doi:10.1016/j.jbiomech.2015.05.032.
107. Klein TJ, Schumacher BL, Schmidt TA, Li KW, Voegtline MS, Masuda K, Thonar EJ-MA, Sah RL. Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003;11(8):595-602. doi:10.1016/S1063-4584(03)00090-6.
108. Schmidt TA, Schumacher BL, Klein TJ, Voegtline MS, Sah RL. Synthesis of proteoglycan 4 by chondrocyte subpopulations in cartilage explants, monolayer cultures, and resurfaced cartilage cultures. *Arthritis Rheum.* 2004;50(9):2849-2857. doi:10.1002/art.20480.
109. Zhang D, Johnson LJ, Hsu H-P, Spector M. Cartilaginous deposits in subchondral bone in regions of exposed bone in osteoarthritis of the human knee: Histomorphometric study of PRG4 distribution in osteoarthritic cartilage. *J Orthop Res.* 2007;25(7):873-883. doi:10.1002/jor.20344.
110. Musumeci G, Loreto C, Leonardi R, Castorina S, Giunta S, Carnazza ML, Trovato FM, Pichler K, Weinberg AM. The effects of physical activity on apoptosis and lubricin expression in articular cartilage in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2013;31(3):274-284. doi:10.1007/s00774-012-0414-9.
111. Szychlińska MA, Leonardi R, Al-Qahtani M, Mobasheri A, Musumeci G. Altered joint tribology in osteoarthritis: Reduced lubricin synthesis due to the inflammatory process. New horizons for therapeutic approaches. *Ann Phys Rehabil Med.* 2016;59(3):149-156. doi:10.1016/j.rehab.2016.03.005.
112. Elsaid KA, Fleming BC, Oksendahl HL, Machan JT, Fadale PD, Hulstyn MJ, Shalvoy R, Jay GD. Decreased lubricin concentrations and markers of joint inflammation in the synovial fluid of patients with anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum.* 2008;58(6):1707-1715. doi:10.1002/art.23495.
113. Xu T, Wu M, Feng J, Lin X, Gu Z. Combination of intermittent hydrostatic pressure linking TGF- β 1, TNF- α on modulation of proteoglycan 4 metabolism in rat temporomandibular synovial fibroblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(2):183-192. doi:10.1016/j.tripleo.2011.07.001.
114. Elsaid KA, Zhang L, Waller K, Tofte J, Teeple E, Fleming BC, Jay GD. The impact of forced joint exercise on lubricin biosynthesis from articular cartilage following ACL transection and intra-articular lubricin's effect in exercised joints following ACL transection. *Osteoarthritis Cartilage.* 2012;20(8):940-948. doi:10.1016/j.joca.2012.04.021.

115. Jay GD, Elsaid KA, Kelly KA, Anderson SC, Zhang L, Teeple E, Waller K, Fleming BC. Prevention of cartilage degeneration and gait asymmetry by lubricin tribosupplementation in the rat following anterior cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum.* 2012;64(4):1162-1171. doi:10.1002/art.33461.
116. Szychlińska MA, Trovato FM, Di Rosa M, Malaguarnera L, Puzzo L, Leonardi R, Castrogiovanni P, Musumeci G. Co-Expression and Co-Localization of Cartilage Glycoproteins CHI3L1 and Lubricin in Osteoarthritic Cartilage: Morphological, Immunohistochemical and Gene Expression Profiles. *Int J Mol Sci.* 2016;17(3). doi:10.3390/ijms17030359.
117. Grad S, Lee CR, Gorna K, Gogolewski S, Wimmer MA, Alini M. Surface Motion Upregulates Superficial Zone Protein and Hyaluronan Production in Chondrocyte-Seeded Three-Dimensional Scaffolds. *Tissue Eng.* 2005;11(1-2):249-256. doi:10.1089/ten.2005.11.249.
118. Ni G-X, Lei L, Zhou Y-Z. Intensity-dependent effect of treadmill running on lubricin metabolism of rat articular cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(6):R256. doi:10.1186/ar4101.
119. Musumeci G, Castrogiovanni P, Trovato FM, Imbesi R, Giunta S, Szychlińska MA, Loreto C, Castorina S, Mobasher A. Physical activity ameliorates cartilage degeneration in a rat model of aging: A study on lubricin expression: Cartilage degeneration in aging rat model. *Scand J Med Sci Sports.* 2015;25(2):e222-e230. doi:10.1111/sms.12290.
120. Roberts HM, Moore JP, Griffith-McGeever CL, Fortes MB, Thom JM. The effect of vigorous running and cycling on serum COMP, lubricin, and femoral cartilage thickness: a pilot study. *Eur J Appl Physiol.* 2016;116(8):1467-1477. doi:10.1007/s00421-016-3404-0.
121. Ruan MZC, Erez A, Guse K, Dawson B, Bertin T, Chen Y, Jiang M-M, Yustein J, Gannon F, Lee BHL. Proteoglycan 4 Expression Protects Against the Development of Osteoarthritis. *Sci Transl Med.* 2013;5(176):176ra34-176ra34. doi:10.1126/scitranslmed.3005409.
122. Waller KA, Chin KE, Jay GD, Zhang LX, Teeple E, McAllister S, Badger GJ, Schmidt TA, Fleming BC. Intra-articular Recombinant Human Proteoglycan 4 Mitigates Cartilage Damage After Destabilization of the Medial Meniscus in the Yucatan Minipig. *Am J Sports Med.* January 2017:0363546516686965. doi:10.1177/0363546516686965.
123. Alquraini A, Garguilo S, D'Souza G, Zhang LX, Schmidt TA, Jay GD, Elsaid KA. The interaction of lubricin/proteoglycan 4 (PRG4) with toll-like receptors 2 and 4: an anti-inflammatory role of PRG4 in synovial fluid. *Arthritis Res Ther.* 2015;17. doi:10.1186/s13075-015-0877-x.

124. Iqbal SM, Leonard C, C. Regmi S, De Rantere D, Tailor P, Ren G, Ishida H, Hsu C, Abubacker S, Pang DS, T. Salo P, Vogel HJ, Hart DA, Waterhouse CC, Jay G., Schmidt TA, Krawetz RJ. Lubricin/Proteoglycan 4 binds to and regulates the activity of Toll-Like Receptors In Vitro. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep18910.
125. Al-Sharif A, Jamal M, Zhang L, Larson K, Schmidt T, Jay G, Elsaid K. Lubricin/Proteoglycan 4 Binding to CD44 Receptor: A Mechanism of Lubricin's suppression of Pro-inflammatory Cytokine Induced Synovocyte Proliferation. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2015;67(6):1503-1513. doi:10.1002/art.39087.
126. Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- β signaling through SMADS. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21(1):659-693. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018.
127. Song B, Estrada KD, Lyons KM. Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5–6):379-388. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.10.010.
128. Zhai G, Doré J, Rahman P. TGF- β signal transduction pathways and osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2015;35(8):1283-1292. doi:10.1007/s00296-015-3251-z.
129. Abdollah S, Macías-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL. T β RI Phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 Is Required for Smad2-Smad4 Complex Formation and Signaling. *J Biol Chem*. 1997;272(44):27678-27685. doi:10.1074/jbc.272.44.27678.
130. Hinck AP. Structural studies of the TGF- β s and their receptors – insights into evolution of the TGF- β superfamily. *FEBS Lett*. 2012;586(14):1860-1870. doi:10.1016/j.febslet.2012.05.028.
131. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007;15(6):597-604. doi:10.1016/j.joca.2007.02.005.
132. van der Kraan PM, Blaney Davidson EN, Blom A, van den Berg WB. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: Modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(12):1539-1545. doi:10.1016/j.joca.2009.06.008.
133. Wang W, Rigueur D, Lyons KM. TGF β Signaling in Cartilage Development and Maintenance. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*. 2014;102(1):37-51. doi:10.1002/bdrc.21058.

134. Finnson KW, Chi Y, Bou-Gharios G, Leask A, Philip A. TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Front Biosci Sch Ed*. 2012;4:251-268. doi:10.2741/266.
135. van der Kraan PM. Age-related alterations in TGF β signaling as a causal factor of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Biomed Mater Eng*. 2014;24(1 Suppl):75-80. doi:10.3233/BME-140976.
136. Serra R, Johnson M, Filvaroff EH, LaBorde J, Sheehan DM, Derynck R, Moses HL. Expression of a Truncated, Kinase-Defective TGF- β Type II Receptor in Mouse Skeletal Tissue Promotes Terminal Chondrocyte Differentiation and Osteoarthritis. *J Cell Biol*. 1997;139(2):541-552. doi:10.1083/jcb.139.2.541.
137. Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng C-X. TGF- β /Smad3 Signals Repress Chondrocyte Hypertrophic Differentiation and Are Required for Maintaining Articular Cartilage. *J Cell Biol*. 2001;153(1):35-46. doi:10.1083/jcb.153.1.35.
138. Scharstuhl A, Glansbeek HL, Beuningen HM van, Vitters EL, Kraan PM van der, Berg WB van den. Inhibition of Endogenous TGF- β During Experimental Osteoarthritis Prevents Osteophyte Formation and Impairs Cartilage Repair. *J Immunol*. 2002;169(1):507-514. doi:10.4049/jimmunol.169.1.507.
139. Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(6):R1338-1347. doi:10.1186/ar1833.
140. Chen CG, Thuillier D, Chin EN, Alliston T. Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses Runx2-inducible matrix metalloproteinase 13 expression to maintain articular cartilage and prevent osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64(10):3278-3289. doi:10.1002/art.34566.
141. Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO J*. 2002;21(7):1743-1753. doi:10.1093/emboj/21.7.1743.
142. van Caam A, Madej W, Thijssen E, Garcia de Vinuesa A, van den Berg W, Goumans M-J, Ten Dijke P, Blaney Davidson E, van der Kraan PM. Expression of TGF β -family signalling components in ageing cartilage: age-related loss of TGF β and BMP receptors. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc*. 2016;24(7):1235-1245. doi:10.1016/j.joca.2016.02.008.

143. Madej W, Buma P, van der Kraan P. Inflammatory conditions partly impair the mechanically mediated activation of Smad2/3 signaling in articular cartilage. *Arthritis Res Ther*. 2016;18. doi:10.1186/s13075-016-1038-6.
144. Madej W, van Caam A, Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, Buma P. Physiological and excessive mechanical compression of articular cartilage activates Smad2/3P signaling. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(7):1018-1025. doi:10.1016/j.joca.2014.04.024.
145. Madej W, van Caam A, Blaney Davidson E, Buma P, van der Kraan PM. Unloading results in rapid loss of TGF β signaling in articular cartilage: role of loading-induced TGF β signaling in maintenance of articular chondrocyte phenotype? *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(10):1807-1815. doi:10.1016/j.joca.2016.05.018.
146. Miyazaki M, Yonemitsu I, Takei M, Kure-Hattori I, Ono T. The imbalance of masticatory muscle activity affects the asymmetric growth of condylar cartilage and subchondral bone in rats. *Arch Oral Biol*. 2016;63:22-31. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.11.020.
147. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Expression of transforming growth factor- (TGF) and the TGF signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(11):1414-1421. doi:10.1136/ard.2005.045971.
148. Zhao W, Wang T, Luo Q, Chen Y, Leung VYL, Wen C, Shah MF, Pan H, Chiu K, Cao X, Lu WW. Cartilage degeneration and excessive subchondral bone formation in spontaneous osteoarthritis involves altered TGF- β signaling: TGF- β IN DH GUINEA PIGS. *J Orthop Res*. November 2015:n/a-n/a. doi:10.1002/jor.23079.
149. van den Bosch MH, Blom AB, van Lent PL, van Beuningen HM, Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. Canonical Wnt signaling skews TGF- β signaling in chondrocytes towards signaling via ALK1 and Smad 1/5/8. *Cell Signal*. 2014;26(5):951-958. doi:10.1016/j.cellsig.2014.01.021.
150. Moroco JR, Hinton R, Buschang P, Milam SB, Iacopino AM. Type II collagen and TGF-betas in developing and aging porcine mandibular condylar cartilage: immunohistochemical studies. *Cell Tissue Res*. 1997;289(1):119-124.
151. Lim WH, Toothman J, Miller JH, Tallents RH, Brouxhon SM, Olschowka ME, Kyrkanides S. IL-1 Inhibits TGF in the Temporomandibular Joint. *J Dent Res*. 2009;88(6):557-562. doi:10.1177/0022034509336823.
152. Sandell LJ. Anabolic factors in degenerative joint disease. *Curr Drug Targets*. 2007;8(2):359-365.

153. Zhen G, Wen C, Jia X, Li Y, Crane JL, Mears SC, Askin FB, Frassica FJ, Chang W, Yao J, Carrino JA, Cosgarea A, Artemov D, Chen Q, Zhao Z, Zhou X, Riley L, Sponseller P, Wan M, Lu WW, Cao X. Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nat Med.* 2013;19(6):704-712. doi:10.1038/nm.3143.
154. Cui Z, Crane J, Xie H, Jin X, Zhen G, Li C, Xie L, Wang L, Bian Q, Qiu T, Wan M, Xie M, Ding S, Yu B, Cao X. Halofuginone attenuates osteoarthritis by inhibition of TGF- β activity and H-type vessel formation in subchondral bone. *Ann Rheum Dis.* October 2015;annrheumdis-2015-207923. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207923.
155. Long E, Motwani R, Reece D, Pettit N, Hepworth J, Wong P, Reynolds P, Seegmiller R. The role of TGF- β 1 in osteoarthritis of the temporomandibular joint in two genetic mouse models. *Arch Oral Biol.* 2016;67:68-73. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.03.004.
156. Wang W, Li W, Song M, Wei S, Liu C, Yang Y, Wu H. Effects of electromagnetic fields on the metabolism of lubricin of rat chondrocytes. *Connect Tissue Res.* 2016;57(2):152-160. doi:10.3109/03008207.2015.1121249.
157. Wrighton KH, Lin X, Feng X-H. Phospho-control of TGF- β superfamily signaling. *Cell Res.* 2009;19(1):8-20. doi:10.1038/cr.2008.327.
158. Matsuzaki K. Smad phospho-isoforms direct context-dependent TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24(4):385-399. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.06.002.
159. Rostam MA, Kamato D, Piva TJ, Zheng W, Little PJ, Osman N. The role of specific Smad linker region phosphorylation in TGF- β mediated expression of glycosaminoglycan synthesizing enzymes in vascular smooth muscle. *Cell Signal.* 2016;28(8):956-966. doi:10.1016/j.cellsig.2016.05.002.
160. Burch ML, Zheng W, Little PJ. Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(1):97-107. doi:10.1007/s00018-010-0514-4.
161. Hough C, Radu M, Doré JJE. TGF-Beta Induced Erk Phosphorylation of Smad Linker Region Regulates Smad Signaling. *PLOS ONE.* 2012;7(8):e42513. doi:10.1371/journal.pone.0042513.
162. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J. A mechanism of repression of TGF β / Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 1999;13(7):804-816.
163. Burch ML, Yang SNY, Ballinger ML, Getachew R, Osman N, Little PJ. TGF- β stimulates biglycan synthesis via p38 and ERK phosphorylation of the

- linker region of Smad2. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(12):2077-2090. doi:10.1007/s00018-010-0315-9.
164. Li F, Zeng B, Chai Y, Cai P, Fan C, Cheng T. The linker region of Smad2 mediates TGF- β -dependent ERK2-induced collagen synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(2):289-293. doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.084.
 165. Funaba M, Zimmerman CM, Mathews LS. Modulation of Smad2-mediated Signaling by Extracellular Signal-regulated Kinase. *J Biol Chem.* 2002;277(44):41361-41368. doi:10.1074/jbc.M204597200.
 166. Andreollo NA, Santos EF dos, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *ABCD Arq Bras Cir Dig São Paulo.* 2012;25(1):49-51. doi:10.1590/S0102-67202012000100011.
 167. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013;4(6):624-630.
 168. Schmitz N, Lavery S, Kraus VB, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18, Supplement 3:S113-S116. doi:10.1016/j.joca.2010.05.026.
 169. Mino-Oka A, Izawa T, Shinohara T, Mori H, Yasue A, Tomita S, Tanaka E. Roles of hypoxia inducible factor-1 α in the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2017;73:274-281. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.10.028.
 170. Ruifrok AC, Katz RL, Johnston DA. Comparison of quantification of histochemical staining by hue-saturation-intensity (HSI) transformation and color-deconvolution. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM.* 2003;11(1):85-91.
 171. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol.* 1963;17:208-212.
 172. Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative Disorders of the Temporomandibular Joint: Etiology, Diagnosis, and Treatment. *J Dent Res.* 2008;87(4):296-307. doi:10.1177/154405910808700406.
 173. Huang Q, Opstelten D, Samman N, Tideman H. Experimentally induced unilateral tooth loss: histochemical studies of the temporomandibular joint. *J Dent Res.* 2002;81(3):209-213.
 174. Gepstein A, Arbel G, Blumenfeld I, Peled M, Livne E. Association of metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, and proteoglycans with development, aging, and osteoarthritis processes in mouse temporomandibular joint. *Histochem Cell Biol.* 2003;120(1):23-32. doi:10.1007/s00418-003-0544-1.

175. Bauer WH. Osteo-arthritis deformans of the temporomandibular joint. *Am J Pathol.* 1941;17(1):129-140.7.
176. Luder H-U. Factors affecting degeneration in human temporomandibular joints as assessed histologically. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(2):106-113. doi:10.1034/j.1600-0722.2002.11212.x.
177. Nishijima K, Kuwahara S, Ohno T, Kitajima S, Sumi Y, Tanaka S. Aging change of mandibular condyle in female F344/N rat. *Arch Gerontol Geriatr.* 2010;51(1):e11-e15. doi:10.1016/j.archger.2009.07.005.
178. Ohashi N, Ejiri S, Hanada K, Ozawa H. Changes in type I, II, and X collagen immunoreactivity of the mandibular condylar cartilage in a naturally aging rat model. *J Bone Miner Metab.* 1997;15(2):77-83. doi:10.1007/BF02490077.
179. Furstman LL. Normal age changes in the rat mandibular joint. *J Dent Res.* 1966;45(2):291-296.
180. Richards LC, Lau E, Wilson DF. Histopathology of the mandibular condyle. *J Oral Pathol Med.* 1985;14(8):624-630. doi:10.1111/j.1600-0714.1985.tb00539.x.
181. Moffett BC, Johnson LC, McCabe JB, Askew HC. Articular remodeling in the adult human temporomandibular joint. *Am J Anat.* 1964;115(1):119-141. doi:10.1002/aja.1001150108.
182. Koike H, Ejiri S, Hanada K, Ozawa H. Age-related histological changes in rat mandibular condyle. *J Bone Miner Metab.* 1995;13(1):10-16. doi:10.1007/BF01771799.
183. Yamamoto K, Shishido T, Masaoka T, Imakiire A. Morphological studies on the ageing and osteoarthritis of the articular cartilage in C57 black mice. *J Orthop Surg Hong Kong.* 2005;13(1):8-18.
184. Goya N, Gupta M, Joshi K. Ultrastructure of Chondrocytes in Osteoarthritic Femoral Articular Cartilage. *Kathmandu Univ Med J.* 2015;11(3):221-225.
185. Sharawy M, Ali AM, Choi W-S, Larke V. Ultrastructural Characterization of the Rabbit Mandibular Condyle following Experimental Induction of Anterior Disk Displacement. *Cells Tissues Organs.* 2000;167(1):38-48. doi:10.1159/000016765.
186. de Bont LG, Boering G, Havinga P, Liem RS. Spatial arrangement of collagen fibrils in the articular cartilage of the mandibular condyle: a light microscopic and scanning electron microscopic study. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 1984;42(5):306-313. doi:10.1016/0278-2391(84)90110-1.

187. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier J-P, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc.* 2006;14(1):13-29. doi:10.1016/j.joca.2005.07.014.
188. Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18:S24-S34. doi:10.1016/j.joca.2010.05.030.
189. Rafayelyan S, Radlanski RJ, Minden K, Pischon N, Jost-Brinkmann P-G, Präger TM. Histomorphometry in antigen-induced arthritis of the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol.* 2015;44(1):67-74. doi:10.1111/jop.12201.
190. Camplejohn KL, Allard SA. Limitations of safranin “O” staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry.* 1988;89(2):185-188. doi:10.1007/BF00489922.
191. Pritzker KPH, Aigner T. Terminology of osteoarthritis cartilage and bone histopathology – a proposal for a consensus. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18, Supplement 3:S7-S9. doi:10.1016/j.joca.2010.05.028.
192. Mao JJ, Rahemtulla F, Scott PG. Proteoglycan Expression in the Rat Temporomandibular Joint in Response to Unilateral Bite Raise. *J Dent Res.* 1998;77(7):1520-1528. doi:10.1177/00220345980770070701.
193. Verbruggen G, Cornelissen M, Almqvist KF, Wang L, Elewaut D, Broddelez C, de Ridder L, Veys EM. Influence of aging on the synthesis and morphology of the aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartil OARS Osteoarthr Res Soc.* 2000;8(3):170-179. doi:10.1053/joca.1999.0287.
194. Karamchedu NP, Tofte JN, Waller KA, Zhang LX, Patel TK, Jay GD. Superficial zone cellularity is deficient in mice lacking lubricin: a stereoscopic analysis. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:64. doi:10.1186/s13075-016-0967-4.
195. Koyama E, Saunders C, Salhab I, Decker RS, Chen I, Um H, Pacifici M, Nah HD. Lubricin is Required for the Structural Integrity and Post-natal Maintenance of TMJ. *J Dent Res.* 2014;93(7):663-670. doi:10.1177/0022034514535807.
196. Bechtold TE, Saunders C, Mundy C, Um H, Decker RS, Salhab I, Kurio N, Billings PC, Pacifici M, Nah HD, Koyama E. Excess BMP Signaling in Heterotopic Cartilage Forming in Prg4-null TMJ Discs. *J Dent Res.* 2016;95(3):292-301. doi:10.1177/0022034515613508.

197. He Y, Zhang M, Huang AY, Cui Y, Bai D, Warman ML. Confocal imaging of mouse mandibular condyle cartilage. *Sci Rep.* 2017;7. doi:10.1038/srep43848.
198. Shibukawa Y, Young B, Wu C, Yamada S, Long F, Pacifici M, Koyama E. Temporomandibular joint formation and condyle growth require Indian hedgehog signaling. *Dev Dyn.* 2007;236(2):426-434. doi:10.1002/dvdy.21036.
199. Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, Furukawa F, Tahashi Y, Yamagata H, Sekimoto G, Seki T, Matsui H, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K. TGF- β and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene.* 2004;23(44):7416-7429. doi:10.1038/sj.onc.1207981.
200. Matsuzaki K. Smad phosphoisoform signaling specificity: the right place at the right time. *Carcinogenesis.* 2011;32(11):1578-1588. doi:10.1093/carcin/bgr172.
201. Blaney Davidson EN, Scharstuhl A, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Reduced transforming growth factor-beta signaling in cartilage of old mice: role in impaired repair capacity. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(6):R1338-1347. doi:10.1186/ar1833.
202. Watanabe H, Caestecker MP de, Yamada Y. Transcriptional Cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathways Regulates Transforming Growth Factor- β -induced Aggrecan Gene Expression in Chondrogenic ATDC5 Cells. *J Biol Chem.* 2001;276(17):14466-14473. doi:10.1074/jbc.M005724200.
203. Xu T, Wu H, Feng J, Gu Z. [Involvement of Smad pathway in proteoglycan 4 expression induced by hydrostatic pressure in temporomandibular synovial fibroblasts]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi Chin J Stomatol.* 2014;49(2):101-105. doi:10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2014.02.008.