



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO BIOMÉDICO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Clarice Nishio

**Avaliação do metabolismo celular decorrente da aplicação de força nos condrócitos do  
côndilo mandibular e do joelho de suínos.**

Rio de Janeiro

2008

Clarice Nishio

**Avaliação do metabolismo celular decorrente da aplicação de força nos condrócitos do  
côndilo mandibular e do joelho de suínos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.  
Área de concentração: Ortodontia

Orientadores: Prof. Dr. Alvaro de Moraes Mendes

Prof. Dr. Kazuo Tanne

Rio de Janeiro

2008

Clarice Nishio

**Avaliação do metabolismo celular decorrente da aplicação de força nos condrócitos do  
côndilo mandibular e do joelho de suínos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia, da Universidade  
do Estado do Rio de Janeiro, como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor.  
Área de concentração: Ortodontia

Aprovado em \_\_\_\_\_ □ \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cátia Cardoso Abdo Quintão  
Faculdade de Odontologia da UERJ

---

Prof. Dr. José Nelson Mucha  
Faculdade de Odontologia da UFF

---

Prof. Dr. Marco Antonio de Oliveira Almeida  
Faculdade de Odontologia da UERJ

---

Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP

---

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior  
Faculdade de Ciências Médicas da UERJ

Rio de Janeiro

2008

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho aos meus pais e à toda a minha família por estarem sempre ao meu lado e apoiarem as minhas decisões.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar saúde e força para realizar um sonho antigo e alcançar mais uma conquista profissional.

Aos animais utilizados nesse estudo que sacrificaram suas vidas em prol da ciência e da pesquisa.

Ao professor Alvaro de Moraes Mendes pela paciência e orientação detalhista que tornaram possível a realização deste trabalho.

À professora Cátia Cardoso Abdo Quintão pela amizade, carinho e dedicação à coordenação do curso de doutorado em ortodontia da FO-UERJ. Atribuo a realização do meu sonho graças à sua ajuda e incentivo profissional. Muito obrigada por tudo!

Aos professores Kazuo Tanne, Nobu Tanaka, Masashi Ueki, Eiji Tanaka (Universidade de Hiroshima, Japão) pela excelente orientação, paciência, dedicação e ensinamentos transmitidos. A realização dessa pesquisa só foi possível graças à competência e ao trabalho árduo de vocês.

Aos professores dos cursos de graduação e pós-graduação em ortodontia da FO-UERJ, Álvaro Francisco Carriello Fernandes, Antônio Carlos Peixoto da Silva, Flávia Artese, Jonas Capelli Júnior, José Augusto Mendes Miguel, Marco Antonio de Oliveira Almeida, Maria Teresa de Andrade Goldner, pelos ensinamentos transmitidos e dedicação ao magistério.

Às minhas colegas de turma do doutorado em odontologia (ortodontia), Mariana de Pinho Noronha e Andrea Stuaní pelo carinho e amizade cultivada. Apesar de não termos convivido muito durante os anos de curso, agradeço a compreensão da minha ausência. Mariana, obrigada por ter ficado responsável pelos meus assuntos acadêmicos.

Aos meus amigos Daniel Koo e Ione Portella Brunharo, que pela presença, mesmo à distância, tornaram a minha estada no Japão menos solitária.

Aos colegas das turmas de mestrado e de doutorado em odontologia (ortodontia) da FO-UERJ, pela amizade e contribuição ao nosso curso.

Aos colegas do primeiro e segundo ano do curso de especialização em ortodontia da FO-UERJ, pelo incentivo e contribuição ao nosso curso.

Às amigas Laura Guimarães Primo, Maristela Barbosa Portela e Sheila de Oliveira Pinto que tiveram que se adaptar à minha ausência no consultório e tornaram possível o meu retorno à atividade clínica.

Ao amigo Rodrigo Sant'anna Quintanilha por ter ficado responsável pelos meus afazeres no consultório durante a minha ausência.

Ao professor José Nelson Mucha pelos valiosos ensinamentos profissionais transmitidos. É um grande prazer e uma honra poder trabalhar com o senhor novamente.

À Mônica Christina de Souza Marques pelo carinho, amizade e assistência prestada.

Aos funcionários técnicos administrativos da pós-graduação da FO-UERJ, Antonio Dias da Silva, Denise P. Muniz da Cruz e José Carlos Barbosa de Medeiros pela assistência prestada.

À todos os funcionários da disciplina de ortodontia da FO-UERJ pelos serviços prestados.

Ao suporte financeiro do Japan International Cooperation Agency (JICA) que custeou e possibilitou a minha estada e os meus estudos no Japão.

À toda a equipe do Kaigai Nikkeijin Kyoukai e do Japan International Cooperation Agency (JICA) pela excelente orientação e suporte para a minha adaptação e moradia no Japão. Agradecimento especial ao Jun Yoshimura, Harumi Hijikata e Masayo Matsumoto.

À todos os alunos do curso de pós-graduação em ortodontia da Universidade de Hiroshima, Japão, que tornaram a minha estada no Japão menos solitária e mais agradável.

Às professoras do curso da língua japonesa da Agência de Cooperação Internacional do Japão (JICA), pela dedicação e paciência em ensinar o idioma japonês, fundamental para a minha adaptação ao Japão.

E à todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

*"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se a ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que sentir-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver."*

*Martin Luther King*

## **RESUMO**

NISHIO, Clarice. *Avaliação do metabolismo celular decorrente da aplicação de força nos condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos*. 2008. 88 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Funcionalmente, a cartilagem da articulação têmporo-mandibular assemelha-se à cartilagem da articulação do joelho por possuírem lubrificação para resistir à fricção e fornecerem proteção às forças mecânicas externas. Entretanto, o efeito das forças de tensão sobre as cartilagens dessas duas articulações ainda permanece obscura. O objetivo desse

estudo foi avaliar, *in vitro*, as alterações metabólicas nos condrócitos extraídos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular e do joelho de suínos, decorrentes da aplicação de forças mecânicas, em relação à síntese de DNA e de proteoglicanos (PTG). Além disso, foi verificada a expressão de colágeno tipo II e de agrecanos no RNAm dos condrócitos dessas duas articulações, tempo-dependente do cultivo celular, utilizando-se a análise quantitativa de PCR em tempo real. Os condrócitos foram submetidos às forças mecânicas de tração de 2 kPa (3% de alongamento), 5 kPa (7% de alongamento) e 10 kPa (12% de alongamento), em uma frequência de 30 ciclos/min. durante 12 e 24 horas. Os resultados demonstraram que os condrócitos do côndilo mandibular quando submetidos às forças de 2 kPa e de 5 kPa, apresentaram um aumento estatisticamente significativo da síntese de DNA e de PTG, em 12 h. ( $p < 0,01$ ) e em 24 h. ( $p < 0,05$ ). Exceto o aumento da síntese de DNA do grupo submetido à força de 5 kPa que durante 24h. não foi estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ). A força de 10 kPa causou uma diminuição estatisticamente significativa na síntese de DNA e de PTG nos condrócitos do côndilo mandibular, em ambos os tempos de ensaio mecânico ( $p < 0,01$ ). Por outro lado, os condrócitos do joelho apresentaram um aumento na síntese de DNA e de PTG quando submetidos à todas as magnitudes de força de tração. A força de 5 kPa estimulou um aumento estatisticamente significativo das sínteses de DNA e PTG, em 12 h. e 24 h. ( $p < 0,01$ ). Em 10 kPa, foi observado um incremento estatisticamente significativo de DNA em 12 h. ( $p < 0,01$ ) e em 24 h. ( $p < 0,05$ ) e de PTG em 24h. ( $p < 0,01$ ). Foi verificado que os condrócitos do joelho apresentaram uma maior expressão de colágeno tipo II e de agrecanos do que os condrócitos do côndilo mandibular estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). A expressão de colágeno tipo II e de agrecanos nos condrócitos do côndilo mandibular foram altamente evidenciados na fase proliferativa e diminuíram progressivamente com a formação de matriz extracelular. Contrariamente, os condrócitos do joelho apresentaram um aumento da expressão de agrecanos no RNAm conforme o amadurecimento do cultivo celular e um aumento expressivo de colágeno tipo II na fase proliferativa, seguida de discreta queda durante a fase da matriz celular. Os condrócitos dos tecidos cartilagosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos demonstraram diferentes mecanismos de resposta às forças mecânicas e de metabolismo celular.

**Palavras-chaves:** Condrócitos, tecido cartilaginoso, côndilo mandibular, joelho, força mecânica de tração, proteoglicano.

## ABSTRACT

Functionally, the mandibular condylar cartilage is similar to the ankle articular cartilage, both provides lubrication to resist friction and offers protection against external mechanical loading. However, the effect of tension loadings on these two articular cartilages remains unclear. The purpose of this study was to evaluate *in vitro*, the metabolism of the chondrocytes isolated from the cartilage tissues of porcine mandibular condyle and ankle, in response to the tension mechanical forces, related to the syntheses of DNA and proteoglycan (PTG). It was also verified the expression of mRNA type II collagen and aggrecan on the chondrocytes of these two joints on culture time-dependent, using a quantitative real-time PCR



analysis. The chondrocytes were submitted to tensile mechanical strains of 2 kPa (3% elongation), 5 kPa (7% elongation) and 10 kPa (12% elongation), with a frequency of 30 cycles/min for 12 and 24 hours. The results showed that the chondrocytes from mandibular condyle, when submitted to tension forces of 2 kPa and 5 kPa, demonstrated a statistically significant enhancement of DNA and PTG, in 12 h. ( $p < 0.01$ ) and in 24 h. ( $p < 0.05$ ). Except the increase of DNA synthesis of the group submitted to the force of 5 kPa during 24 h. that was not statistically significant ( $p > 0.05$ ). The force of 10 kPa caused a statistically significant decrease of DNA and PTG syntheses on the chondrocytes of mandibular condyle, in both periods of mechanical stimulation ( $p < 0.01$ ). On the other side, the chondrocytes of ankle showed an increase of DNA and PTG syntheses when subjected to all the magnitudes of tension forces. The force of 5 kPa stimulated statistically significant the syntheses of DNA and PTG, in 12 h. and 24 h. ( $p < 0.01$ ). In 10 kPa, it was observed a statistically significant increment of DNA in 12 h. ( $p < 0.01$ ) and in 24 h. ( $p < 0.05$ ) and PTG synthesis in 24 h. ( $p < 0.01$ ). The chondrocytes of ankle showed a statistically significant higher ( $p < 0.05$ ) expression of collagen type II and aggrecan than the chondrocytes of mandibular condyle. The type II collagen and aggrecan mRNA in mandibular condyle were highly expressed in proliferating chondrocytes and decreased progressively in matrix-forming chondrocytes. Conversely, the chondrocytes from ankle showed an increase of aggrecan expression on mRNAs with the cell culture maturation, and an increase of type II collagen during the proliferating phase, followed by a slight decrease of this protein during the matrix-forming phase. The chondrocytes from the cartilage tissues of mandibular condyle and ankle showed different mechanisms of response to the mechanical loadings and distinct chondrocyte's metabolism.

**Key-words:** Chondrocytes, cartilage tissue, mandibular condyle, ankle, tension mechanical force, proteoglycan.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação esquemática de um complexo agregado de proteoglicano, composto pelo ácido hialurônico (HA), proteoglicano e proteína de ligação. JUNQUEIRA e CARNEIRO. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1995. 102p. il. .... 25

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 2</b>  | Tecidos cartilagosos das articulações do porco: a) côndilo mandibular; b) joelho.....   | 32 |
| <b>Figura 3</b>  | Camadas de tecido do côndilo mandibular suíno.....  | 33 |
| <b>Figura 4</b>  | Contagem do número de células.....  | 35 |
| <b>Figura 5</b>  | Placas estéreis com 6 nichos para cultivo celular: a) grupo controle; b) grupo experimento.....   | 35 |
| <b>Figura 6</b>  | Condrócitos nos estágios de proliferação (a,b) e de formação de matriz extracelular (c,d). Tecido cartilaginoso do côndilo mandibular (a,c) e do joelho de suínos (b,d). Aumento de 200 x. .... | 36 |
| <b>Figura 7</b>  | Sistema de aplicação de forças de tração às células.....  | 37 |
| <b>Figura 8</b>  | Máquina para leitura dos marcadores radioativos [ <sup>3</sup> H] timidina e [ <sup>35</sup> S] sulfato.....  | 38 |
| <b>Figura 9</b>  | Filtro de acrílico para preparo da leitura do marcador radioativo [ <sup>35</sup> S] sulfato.....   | 39 |
| <b>Figura 10</b> | Termociclador para retrotranscrição para síntese de DNAc.....   | 43 |
| <b>Figura 11</b> | Equipamento Light Cycler® ST300 para leitura de expressão de colágeno tipo II e agrecanos.....  | 45 |

## LISTA LISTA DE GRÁFICOS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Gráfico 1</b> | Comparação da síntese de DNA e proteoglicanos (PTG) entre os condrocitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, sob força cíclica de tração de 2 kPa (3% de alongamento)..... | 68 |
|------------------|---|----|

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Gráfico 2</b> | Comparação da síntese de DNA e proteoglicanos (PTG) entre os condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, sob força cíclica de tração de 5 kPa (7% de alongamento).....   | 69 |
| <b>Gráfico 3</b> | Comparação da síntese de DNA e proteoglicanos (PTG) entre os condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, sob força cíclica de tração de 10 kPa (12% de alongamento)..... | 70 |
| <b>Gráfico 4</b> | Comparação da expressão de colágeno tipo II no RNAm dos condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos.....  | 72 |
| <b>Gráfico 5</b> | Comparação da expressão de agreganos no RNAm dos condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos.....   | 73 |

## LISTA DE QUADROS

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Quadro 1</b> | Resumo dos tipos de core-proteínas, glicosaminoglicanos e função das moléculas de agreganos. POLLARD e EARNSHAW. Cell Biology. Philadelphia: Saunders, 2004. 496p.....           | 26 |
| <b>Quadro 2</b> | Descrição dos nomes e concentrações das substâncias enzimáticas e o tempo utilizado para o processo de digestão das cartilagens do côndilo mandibular e do joelho de suínos..... | 34 |
| <b>Quadro 3</b> | Descrição dos reagentes e as respectivas quantidades utilizadas para a realização do RT-PCR.....   | 43 |
| <b>Quadro 4</b> | Relação dos reagentes e os volumes utilizados para a realização do PCR em tempo real.....  | 44 |
| <b>Quadro 5</b> | Descrição das seqüências dos nucleotídeos dos <i>primers</i> utilizados para cada gene no PCR em tempo real.....   | 44 |

## LISTA DE TABELAS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Tabela 1</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 2 kPa.....                    | 49 |
| <b>Tabela 2</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 2 kPa..... | 50 |
| <b>Tabela 3</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 2 kPa.....                                | 51 |
| <b>Tabela 4</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 2 kPa.....             | 52 |
| <b>Tabela 5</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 5 kPa.....                    | 53 |
| <b>Tabela 6</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 5 kPa..... | 54 |
| <b>Tabela 7</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 5 kPa.....                                | 55 |
| <b>Tabela 8</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 5 kPa.....             | 56 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Tabela 9</b>  | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ <sup>3</sup> H] timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 10 kPa.....                  | 57 |
| <b>Tabela 10</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ <sup>35</sup> S] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 10 kPa..... | 58 |
| <b>Tabela 11</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ <sup>3</sup> H] timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 10 kPa.....                              | 59 |
| <b>Tabela 12</b> | Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ <sup>35</sup> S] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 10 kPa.....             | 60 |
| <b>Tabela 13</b> | Quantificação e qualificação da densidade óptica dos ácidos nucléicos em duas diferentes coletas de cultura celular.....  | 61 |
| <b>Tabela 14</b> | Quantificação da expressão de colágeno tipo II no RNAm dos condrócitos dos tecidos cartilagosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos e tempo-dependente do cultivo celular.....  | 61 |
| <b>Tabela 15</b> | Quantificação da expressão de agrecanos no RNAm dos condrócitos dos tecidos cartilagosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos e tempo-dependente do cultivo celular.....   | 63 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                        |  |
|------------------------|--|
| ATM                    | Articulação têmporo-mandibular   |
| $^{\circ}\text{C}$     | grau Celsius   |
| $\text{CaCl}_2$        | Cloreto de cálcio  |
| $\text{CO}_2$          | Dióxido de carbono   |
| CPC                    | Cetilpiridínio (cloreto de hexadecilpiridínio)                                   |
| DEPC                   | Água destilada livre de enzima RNase, contém 0,1% de dietil pirocarbonato        |
| DO                     | Densidade óptica   |
| EDTA                   | Ácido etileno diamino tetra acético  |
| G3PDH                  | Glicerol 3-fosfato desidrogenase   |
| HA                     | Ácido hilaurônico  |
| HCl                    | Ácido clorídrico   |
| $\text{H}_2\text{O}$   | Água   |
| kPa                    | Kilo Pascal  |
| MEC                    | Matriz extracelular  |
| MPa                    | Mega Pascal  |
| N                      | Newton   |
| NaCl                   | Cloreto de sódio   |
| $\text{NaHCO}_3$       | Bicarbonato de sódio   |
| NaOH                   | Hidróxido de sódio   |
| OA                     | Osteoartrite   |
| PBS                    | Solução salina tampão (cloreto de sódio, fosfato de sódio e fosfato de potássio) |
| PCR em tempo real      | Reação em cadeia da polimerase em tempo real                                     |
| PTG                    | Proteoglicanos   |
| RT-PCR                 | Reação em cadeia da polimerase com transcrição Reversa                           |
| rpm                    | rotações por minuto  |
| SFB                    | Soro fetal bovino  |
| $\text{SO}_4\text{Mg}$ | Sulfato de magnésio  |
| TCA                    | Tris / ácido clorídrico  |
| $\alpha$ -MEM          | $\alpha$ -minimum essential medium   |

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
|          | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>1</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>   | <b>17</b> |
| 1.1      | <b>Tecido cartilagenoso.....</b>  | <b>17</b> |
| 1.2      | <b>Condrócitos.....</b>   | <b>19</b> |
| 1.3      | <b>Proteoglicanos.....</b>  | <b>21</b> |
| 1.4      | <b>Colágenos.....</b>   | <b>23</b> |
| 1.5      | <b>Agreicanos.....</b>  | <b>24</b> |
| 1.6      | <b>Estímulo mecânico.....</b>   | <b>26</b> |
| <b>2</b> | <b>PROPOSIÇÃO .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>   | <b>32</b> |
| 3.1      | <b>Extração e cultura celular.....</b>  | <b>32</b> |
| 3.2      | <b>Força Mecânica de Tração.....</b>  | <b>36</b> |
| 3.3      | <b>Determinação da síntese de DNA e Proteoglicanos.....</b>   | <b>37</b> |
| 3.4      | <b>Reação em cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) e PCR em tempo real, para determinação da expressão de colágeno do tipo II e agreicanos.....</b> | <b>40</b> |
| 3.5      | <b>Análise estatística.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>4</b> | <b>RESULTADO.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>  | <b>65</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>   | <b>76</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>78</b> |
|          | <b>APÊNDICE A - Solução padrão de <math>\alpha</math>-MEM (<math>\alpha</math>-minimum essential medium).....</b>   | <b>88</b> |

## INTRODUÇÃO

A cartilagem articular recobre as extremidades do ossos nas articulações sinoviais e fornece uma resistência às forças mecânicas e uma superfície resiliente essencial para um funcionamento normal da articulação (LITTLE E GHOSH, 1997; SICZKOWSKI E WATT, 1990).

O tecido cartilaginoso da articulação está constantemente sujeito às várias magnitudes e ciclos de forças mecânicas. A habilidade de suportar altas cargas de forças depende da matriz extracelular (MEC), a qual consiste principalmente de proteoglicanos (PTG) e colágenos (BACHRACH *et al.*, 1995; FUJISAWA *et al.*, 1999; HONDA *et al.*, 2000; TERAMOTO *et al.*, 2003). Essas moléculas contribuem para a flexibilidade da cartilagem e proteção da articulação de vários estímulos mecânicos, tais como tração, compressão, cisalhamento e forças de torção (HONDA *et al.*, 2000; TERAMOTO *et al.*, 2003). Colágenos são as estruturas que fornecem resistência às forças de tração das cartilagens, enquanto que as forças de compressão estão relacionadas com a presença dos PTG (KUBOKI *et al.*, 1997; MAO, RAHEMTULLA e SCOTT, 1998; STEGENGA *et al.*, 1991; YANAGISHITA, 1993).

O tipo de magnitude de força parece estar intimamente relacionada com o metabolismo da MEC da cartilagem (HONDA *et al.*, 2000). Sob condições normais fisiológicas, níveis adequados de forças mecânicas são um regulador importante para o metabolismo dos condrócitos (BACHRACH *et al.*, 1995; HOLMVALL *et al.*, 1995; LARSSON, ASPDEN e HEINEGARD, 1991), sendo um pré-requisito para manter as propriedades da MEC de uma cartilagem saudável (URBAN, 1994), além de estimular a síntese de DNA e de PG e auxiliar na diferenciação dos condrócitos (DE WITT *et al.*, 1984; ELDER *et al.*, 2000; INOUE *et al.*, 1990; TAKAHASHI *et al.*, 1998). Entretanto, forças mecânicas excessivas têm sido reconhecidas como um dos fatores de degradação da MEC da cartilagem e uma das principais causas da osteoartrite (OA) (FUJISAWA *et al.*, 1999; OSTENDORF *et al.*, 1995; VINGARD, 1994, VINGARD, ALFREDSSON e MALCHAU, 1997a; 1998b).

A OA é uma doença degenerativa multifatorial progressiva (DAHLBERG *et al.*, 2000; FUJISAWA *et al.*, 1999) que pode afetar qualquer articulação que seja constantemente submetida às forças mecânicas, tal como a articulação têmporo-mandibular (ATM) e o joelho. Ela pode provocar dor articular, progressiva limitação de movimentação (JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997; FUJISAWA *et al.*, 1999), perda gradual do tecido



cartilaginoso articular, esclerose, mudanças císticas ósseas e formação de osteófito (FUJISAWA *et al.*, 1999). Na OA, a perda de componentes da MEC parece ser o responsável pela incapacidade de reparo funcional e pela sintomatologia da dor (OSTENDORF *et al.*, 1995).

Dentre os diversos tipos de forças mecânicas, a força cíclica parece ser a mais relevante para a etiologia da OA (OSTENDORF *et al.*, 1995). Vários estudos têm demonstrado que a exposição do tecido cartilaginoso às forças mecânicas pode levar a uma diminuição (LARSSON, ASPDEN e HEINEGARD, 1991; PALMOSKI e BRANDT, 1984; STEINMEYER *et al.*, 1993; TORZILLI *et al.*, 1997), aumento (FARQUHAR *et al.*, 1996; KORVER *et al.*, 92; LARSSON, ASPDEN e HEINEGARD, 1991; OSTENDORF *et al.*, 1995; PALMOSKI e BRANDT, 1984; PARKKINENE *et al.*, 1992) ou nenhuma alteração (FARQUHAR *et al.*, 1996) da síntese de MEC pelos condrócitos.

O metabolismo da MEC está associado com a intensidade, duração e tipo de força aplicada (DE WITT *et al.*, 1984; INOUE *et al.*, 1990; PALMOSKI, COLYER e BRANDT, 1980; PALMOSKI, PERRICONE e BRANDT, 1979). Apesar da degradação da cartilagem parecer ser causada por uma força contínua e excessiva, o mecanismo de degeneração da MEC em relação as forças mecânicas ainda permanece obscura (HONDA *et al.*, 2000), principalmente entre os condrócitos de diferentes cartilagens articulares.

Portanto, considera-se importante entender o comportamento e o metabolismo da MEC do tecido cartilaginoso em relação as forças mecânicas, para uma melhor compreensão da patologia fisiológica das desordens têmporo-mandibulares (TERAMOTO *et al.*, 2003).

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Tecido cartilaginoso

A cartilagem é um tipo de tecido conjuntivo de consistência rígida, composta por uma extensa matriz extracelular (MEC) heterogênea, com uma população de células especializadas e denominadas condrócitos (BACHRACH *et al.*, 1995; HARDINGHAM e BAYLISS, 1990; HOLMVALL *et al.*, 1995; SICZKOWSKI E WATT, 1990). A matriz consiste basicamente de uma rede densa de fibras de colágenos (95% do tipo II) (HOLMVALL *et al.*, 1995) embebidos em uma solução concentrada de proteoglicanos (PTG) agregados, chamados de agrecanos (BACHRACH *et al.*, 1995; HOLMVALL *et al.*, 1995; SICZKOWSKI e WATT, 1990). A interação desses componentes da matriz com a porção aquosa (água e sais) fornece as propriedades vitais únicas para a função do tecido. A cartilagem articular exibe um comportamento mecânico viscoelástico, que resulta na resistência da MEC ao fluxo do fluido intersticial (BACHRACH *et al.*, 1995).

Histologicamente, o tecido cartilaginoso apresenta várias camadas distintas de cartilagem. A zona mais superficial, ou seja a que se encontra mais afastada do osso, é uma camada fina de cartilagem que contém condrócitos mais alongados. A zona intermediária ou de transição consiste de células redondas ou ovais. Na camada mais profunda, as células são mais largas do que as de outras áreas mais superficiais, são redondas e podem ser encontradas em colunas verticais. Finalmente, entre a camada mais profunda e o osso, há a camada de cartilagem hipertrófica. Além da variedade de morfologia e densidade celular em relação a distância da superfície articular, existe também a variedade de composição bioquímica e propriedades físicas da MEC (SICZKOWSKI e WATT, 1990). A quantidade de PTG, a composição dos glicosaminoglicanos e as propriedades dos agrecanos também podem variar de acordo com a profundidade do tecido cartilaginoso (SICZKOWSKI e WATT, 1990).

O tecido cartilaginoso é sintetizado e mantido pelos condrócitos que encontram-se dispersos na matriz. No humano adulto, essas células representam menos do que 10% do volume total do tecido cartilaginoso (BACHRACH *et al.*, 1995). Algumas proteínas da cartilagem, tais como os colágenos tipo II e VI, fibronectina e condroaderina parecem participar da adesão de condrócitos isolados e auxiliam na interação entre os condrócitos e a MEC (LOESER, 1993).

O processo de crescimento do tecido cartilaginoso é complexo e consiste de vários estágios (CASTAGNOLA *et al.*, 1988; CHEN e JOHNSON, 1995). No primeiro estágio, os condrócitos em repouso são ativados e entram no processo de divisão celular. Nessa fase, o aumento do número de células resulta em crescimento da cartilagem. Os condrócitos em proliferação sintetizam colágeno tipo II, agrecanos e proteínas de ligação. No segundo estágio, os condrócitos cessam a proliferação, iniciam o processo de maturação e aumentam a produção de matriz. Esse incremento da deposição de matriz também conduz ao crescimento do tecido cartilaginoso (WU e CHEN, 2000). Na terceira fase, os condrócitos se tornam hipertróficos e sintetizam colágeno tipo X (SCHMID e LINSSENMAYER, 1983). O aumento do tamanho da célula também contribui para o crescimento da cartilagem em volume. Os condrócitos em processo final de diferenciação hipertrófica, sofrem apoptose (morte celular programada) e a cartilagem é substituída por formação óssea. Portanto, o crescimento da cartilagem pode ser atribuído não apenas à proliferação dos condrócitos, mas também ao seu processo de diferenciação, isto é, maturação e hipertrofia. De maneira contrária, apoptose e degradação da matriz da cartilagem podem inibir o processo de crescimento. Não está claro ainda em qual dos estágios de desenvolvimento celular, as forças mecânicas regulam o crescimento da cartilagem; se é durante a proliferação, a maturação, a hipertrofia, a apoptose, ou se em todas essas fases (WU e CHEN, 2000).

O tecido cartilaginoso desempenha diversas funções, tais como, sustentar os tecidos moles, revestir superfícies articulares onde absorve choques, diminuir a fricção e contribuir para os deslizamentos funcionais (HARDINGHAM e BAYLISS, 1990; JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997). Além disso, a cartilagem é essencial para a formação e crescimento dos ossos longos (HARDINGHAM e BAYLISS, 1990; LEIPZIG e ATHANASIOU, 2007). Como o tecido cartilaginoso é desprovido de vasos linfáticos e de nervos, a MEC é utilizada como trajeto para a difusão de substâncias entre os vasos sanguíneos do tecido conjuntivo circundante e os condrócitos (HARDINGHAM e BAYLISS, 1990). As propriedades mecânicas da cartilagem são definidas pela sua composição e estrutura. Fibras colágenas, as quais são resistentes às tensões, fornecem o reforço para os PTG que são altamente hidratados, porém pobres mecanicamente e formam um material composto fibroso. Nesse material, as fibras possuem um determinado comprimento para suportar e transferir as forças entre os componentes da matriz (JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997).

## 1.2 Condrócitos

Os condrócitos são os únicos tipos de células que compõem a cartilagem. Essas células estão envolvidas na regulação da homeostase da cartilagem, no controle da quantidade normal de moléculas da matriz, integração das moléculas à funcionalidade da matriz e remodelamento de acordo com a variabilidade das forças mecânicas e funcionais (HOLMVALL *et al.*, 1995). Os condrócitos encontram-se dispersos na matriz e são os responsáveis pela síntese e manutenção dos componentes da matriz extracelular (MEC) (BACHRACH *et al.*, 1995; HARDINGHAM e BAYLISS, 1990).

As células respondem ao meio em que se encontram regulando a MEC. Esses estímulos podem variar desde fatores de crescimento e citoquinas, concentração dos componentes da MEC até forças mecânicas, abrangendo deformação, pressão hidrostática e fluxo de fluidos e íons (BACHRACH *et al.*, 1995). Nas doenças degenerativas, tal como a osteoartrite, os processos de anabolismo e catabolismo dos componentes da matriz encontram-se em desequilíbrio, o que pode causar uma degeneração da rede dos componentes e conseqüentemente, uma alteração das propriedades biomecânicas da MEC (DAHLBERG *et al.*, 2000; OSTENDORF *et al.*, 1995).

Little e Ghosh (1997) acreditam que a cartilagem articular de diferentes articulações contém populações de condrócitos de fenótipos distintos e que fatores ambientais podem influenciar na determinação do fenótipo dos condrócitos pós-nascimento (LITTLE e GHOSH, 1997). Foi verificado que a densidade celular da cartilagem articular demonstrou um leve declínio durante o período pós-natal até a maturidade esquelética, após a qual se manteve relativamente estável (STOCKWELL, 1971; VIGNON *et al.*, 1976). Essa redução pós-natal do número de condrócitos pode estar relacionada com a perda seletiva das células da zona superficial e/ou com a dificuldade de distinção das zonas populacionais dos condrócitos que não é visível até a maturidade esquelética (HOWARD e ANASTASSIADES, 1993). Portanto, acredita-se que forças mecânicas pós-natal aplicadas sobre as diferentes regiões da articulação podem influenciar no processo de seleção das células dessas regiões (LITTLE e GHOSH, 1997). Kantomaa, Tuominen e Pirttiniemi (1994) observaram ainda que forças mecânicas tiveram a capacidade de modular a maturação e a diferenciação dos condroblastos nas cartilagens articulares do côndilo mandibular do rato durante a maturação. Foi verificado que forças mecânicas excessivas podem atrasar a maturação e a diferenciação das células mesenquimais em condrócitos (BASDRA *et al.*, 1994).

A variedade dos tipos de população de condrócitos parece estar relacionada também com as diferentes camadas de profundidade do tecido cartilaginoso (LITTLE e GHOSH, 1997; SICZKOWSKI e WATT, 1990) e essa diversidade parece estar associada com a magnitude e os tipos de força a qual a cartilagem articular é submetida (BULLOUGH *et al.*, 85; EGGLI, HUNZIKEER e SCHENK, 1988). Siczkowski e Watt (1990) observaram que as células das camadas mais profundas da cartilagem depositaram maior quantidade de MEC do que as células das zonas mais superficiais. Porém, esses autores também notaram que a taxa de crescimento para ambas as populações de condrócitos foram similares, apesar de que as culturas das zonas mais superficiais apresentaram uma menor densidade celular final. Além disso, Salter, Godolphin e Gurlay (1995) concluíram que os condrócitos de diferentes fontes e de diferentes estágios de desenvolvimento, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, também mostraram uma heterogeneidade na expressão de moléculas de adesão, como por exemplo, de integrinas.

Em placas de cartilagem em crescimento, foi verificado que os condrócitos modificam a produção dos componentes da MEC, tal como o colágeno tipo II, conforme passam pela sequência de estágios de proliferação, hipertrofismo e degeneração celular (HORTON e MACHADO, 1988). Essas diferenças refletem em parte a heterogeneidade das atividades dos condrócitos (AYDELOTTE e KUETNER, 1988; AYDELOTTE, GREENHILL e KUETTNER, 1988). Interações entre células e o meio circundante de MEC e via de receptores específicos de superfície, são importantes para o controle de diferenciação e regulação da função tecidual (HYNES, 1992).

Ainda permanece obscuro a maneira como os condrócitos traduzem os sinais mecânicos extracelulares para o núcleo, onde os genes são expressos. Células mecânico-sensitivas podem traduzir as forças externas em sinais bioquímicos através de receptores membranosos (DAVIES e TRIPATHI, 1993; SACHS, 1991; WANG, BUTLER e INGBER, 1993) ou transmitir diretamente as forças da MEC às estruturas intracelulares (DAVIES e TRIPATHI, 1993). Em ambos os casos, parece ser mais evidente que os condrócitos respondem aos estímulos mecânicos que ocorrem no nível local ao redor da célula, do que aos que acontecem na totalidade do tecido articular (MOW *et al.*, 1994).

Estudos sobre as populações distintas de condrócitos em diferentes articulações, a variabilidade de resposta ao estímulo de catabolismo e anabolismo e a expressão de regulação e atividade das moléculas em associação com proteínas de ligação específicas da MEC são fatores fundamentais para a compreensão dos processos de desenvolvimento e formação da cartilagem quando em casos de doença degenerativa, como a osteoartrite (LITTLE e GHOSH, 1997).

### 1.3 Proteoglicanos

Os proteoglicanos (PTG) são macromoléculas que compõem a matriz extracelular (MEC) e representam uma classe especial de glicoproteínas. Os PTG são formados por uma proteína central com uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos ligadas covalentemente. Essas estruturas possuem um dos açúcares aminado e sulfatado, são cadeias longas, lineares e compostas por unidades dissacáridicas repetidas (geralmente um ácido hexurônico e uma hexosamina), carregadas negativamente em condições fisiológicas devido à presença de grupos sulfato e ácido úrico (POLLARD e EARNSHAW, 2004). As cadeias de glicosaminoglicanos são ligadas covalentemente com a proteína central dos PTG através de estruturas oligossacarídicas específicas. Os PTG são classificados em categorias de acordo com a natureza dessa cadeia glicídica, que podem ser de sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, heparina, sulfato de heparano, sulfato de queratano ou hialuronato (POLLARD e EARNSHAW, 2004). A produção de PTG rico em sulfato de condroitina, por exemplo, parece estar associada à resposta dos condrócitos à degradação da matriz, que geralmente ocorre em casos de doença como a osteoartrite (SANDY, BROWN e LOWTHER, 1980). Além disso, já foi verificado que tanto em suínos como em humanos, as cartilagens mais imaturas apresentaram maiores concentrações dessa atividade bio-sintética do que os tecidos mais maduros (SANDY, BROWN e LOWTHER, 1980).

Muitas células, incluindo as células dos vertebrados, sintetizam PTG. A maioria é secretada na MEC onde são o maior constituinte da cartilagem, tecido conectivo e membrana celular (LEHNINGER, NELSON E COX, 2004; POLLARD e EARNSHAW, 2004). Os componentes protéicos dos PTG são sintetizados nos ribossomos e transferidos para o retículo endoplasmático rugoso. A ligação com glicídios é feita no complexo de Golgi em várias etapas que envolvem atividade enzimática, onde cada açúcar é ligado individualmente. Os PTG uma vez completados, são transportados por vesículas e secretados para a MEC. Na MEC, os PTG estão envolvidos na ligações de cátions como sódio, potássio, cálcio e de água, participam da regulação do movimento molecular através da matriz e formam ainda proteínas fibrosas (como colágenos) (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995). De acordo com Sandy, Brown e Lowther (1980), essa taxa de síntese de PTG produzida pelos condrócitos parece ser controlada pela concentração extracelular de macromoléculas na cartilagem. A ativação da síntese de PTG poderia ser estimulada por exemplo, como uma resposta à perda de PTG na MEC. Apesar do conhecimento de que os condrócitos respondem às alterações de

concentração de PTG modificando a sua taxa de síntese, o mecanismo pelo qual as células alcançam esse estado metabólico modificado ainda permanece obscuro (SANDY, BROWN e LOWTHER, 1980).

A capacidade dos glicosaminoglicanos de atrair cátions e água, confere aos PTG a função de dar a MEC uma característica hidratada e estão associado com a produção de pressão hidrostática no fluido intersticial. A resistência a compressão está basicamente relacionada com a densidade dos PTG e, mais especificamente, com a quantidade de sulfato de condroitina presente (YANAGISHITA, 1993).

Slowman and Brandt (1986) analisaram todas as camadas do tecido cartilagosos de diferentes regiões da articulação e verificaram que as regiões da cartilagem que foram submetidas às forças mais intensas apresentaram maior quantidade de PTG do que as áreas que receberam menos carga (SLOWMAN e BRANDT, 1986; MURATA e YOKOYAMA, 1987). Siczkowski e Watt (1990) observaram também que as camadas mais superficiais da cartilagem articular contém menor concentração de PTG do que as áreas mais profundas. No entanto, Little e Gosh (1997) acreditam que a diversidade do tipo de população dos condrócitos não influencia no metabolismo de PTG.

Segundo Aydelotte, Greenhill e Kuettner (1988), a relação entre a profundidade da cartilagem e o metabolismo de PTG parece estar associada com os fenótipos distintos dos condrócitos. A diferenciação dos condrócitos que ocorre de acordo com a profundidade da cartilagem parece estar mais relacionada com a maturação celular do que ser considerada um fenômeno inerente. A variação de metabolismo de PTG de acordo com as populações de condrócitos das camadas mais profundas da cartilagem têm sido atribuída a diferença de matriz e, mais especificamente, com a densidade ou a quantidade de PTG ao redor dos condrócitos (GRUSHKO, SCHNEIDERMAN e MAROUDAS, 1989; SCHNEIDERMAN, KERET e MAROUDAS, 1986). Uma vez que a distribuição de PTG parece variar de acordo com a área da cartilagem, é esperado que haja diferenças regionais de resistência à força de compressão (DEL SANTO *et al.*, 2000; SHIBATA *et al.*, 2001; HU *et al.*, 2001).

Uma das técnicas básicas utilizadas para avaliar o metabolismo dos glicosaminoglicanos e PTG é através da análise *in vitro* da incorporação de precursores radioativos no tecido cartilaginoso. Os estudos que usam isótopos radioativos geralmente utilizam o [<sup>35</sup>S] sulfato para avaliar o metabolismo de PTG tanto em tecidos considerados saudáveis como naqueles com processos patológicos em desenvolvimento (JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997; SANDY, BROWN e LOWTHER, 1980).

## 1.4 Colágenos

Os colágenos são uma das proteínas que constituem a matriz extracelular (MEC) do tecido cartilaginoso e são responsáveis por grande parte das suas propriedades físicas. No ser humano, existem pelo menos 28 tipos de colágenos e cada um com uma função específica.

Um dos grandes desafios na área de bioquímica tem sido desvendar os diversos tipos de moléculas geneticamente distintas de colágenos nos tecidos conjuntivos dos vertebrados. Essas moléculas especializadas devem se adaptar às diversidades estruturais das matrizes dos tecidos vertebrados e são específicas para cada tipo de tecido (EYRE e MUIR, 1975).

Os colágenos tipo II são produzidos pelos condrócitos e estão presentes na cartilagem hialina e na cartilagem elástica (EYRE e MUIR, 1975; DAHLBERG *et al.*, 2000; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995). Esse tipo de colágeno não produz feixes de fibras e são encontrados nos discos intervertebrais, olhos e cartilagens articulares (EYRE e MUIR, 1975). A morfologia das fibras de colágeno tipo II é semelhante em todos esses tecidos, apenas apresentam um diâmetro mais estreito quando comparado às fibrilas do colágeno tipo I. Como exemplos de outros tipos de colágenos, existem o tipo I, o mais comum, presente na cartilagem fibrosa, tecido conjuntivo frouxo e denso, forma fibras e feixes e constitui os ossos, tendões e peles; o tipo III, que forma as fibras reticulares e se encontram na pele, aorta e pulmões; o tipo IV, que aparece na lâmina basal e é um dos componentes da membrana basal dos epitélios, está presente nas lentes da cápsula ocular e glomérulos; o tipo V, presente nos ossos, tendões e sangue; o tipo VI, existente no sangue e na placenta; o tipo VII, presente nas membranas corioamnióticas; o tipo VIII, presente no endotélio; o tipo IX, encontrado na cartilagem e córnea retina e, os tipos X, XI e XII, presentes na cartilagem (EYRE e MUIR, 1975; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

A cartilagem articular é composta por um tecido que contém uma rede de fibras de colágeno tipo II ligada aos proteoglicanos. O colágeno tipo II consiste de três cadeias- $\alpha$  idênticas, que formam um monômero tríplice helicoidal e dão origem à fibrilas, as quais contém também colágenos tipo IX e XI. Dentro dessa rede fibrilar, existe ainda uma grande quantidade de proteoglicanos agregados, denominados agrecanos. A capacidade de suportar forças de compressão depende do grau de tumefação provocado pela hidratação dos agrecanos, a qual normalmente é suportada pelos colágenos tipo II (DAHLBERG *et al.*, 2000).



A clivagem do colágeno tipo II parece ser mediada primariamente pelas enzimas collagenases que pertencem à família das metaloproteinases (MMP). Três tipos de collagenases humanas, collagenase 1 (MMP-1), collagenase 2 (MMP-8) e collagenase 3 (MMP-13), são capazes de clivar a tríplice helicoidal do colágeno tipo II entre os resíduos de glicina (775) e da leucina (776).

O tipo de colágeno produzido pelas células da cartilagem pode ser alterado como resposta à alguma doença ou lesão articular. Tem sido sugerido que nos casos de osteoartrite, a cartilagem articular passa a formar mais colágeno tipo I e que os condrócitos em cultura tendem a substituir a síntese de colágeno do tipo II para o tipo I (EYRE e MUIR, 1975). Já Dahlberg *et al.* (2000) verificaram em seu estudo que nos casos de osteoartrite, há um aumento da degradação de colágeno tipo II pela enzima collagenase que cliva a sua tríplice hélice. Na osteoartrite, ocorre uma perda progressiva da capacidade da cartilagem de resistir às forças de tração, há um aumento da quantidade aquosa na composição da matriz e uma perda de PTG decorina, biglicanos e agrecanos (DAHLBERG *et al.*, 2000).

### 1.5 Agrecanos

Os glicosaminoglicanos sulfatados ligam-se covalente à uma cadeia protéica (core-proteína) e formam uma das mais complexas macromoléculas biológicas, os proteoglicanos (PTG) agregados, ou agrecanos. Estes PTG agregados são encontrados na matriz do tecido conjuntivo de todos os seres humanos. Devido às suas propriedades elásticas, uma das suas principais funções na cartilagem é a de torná-la capaz de sofrer múltiplas deformidades reversíveis. Os agrecanos ligam-se quimicamente ao colágeno e esta associação é responsável pela resistência da cartilagem às pressões, que depende principalmente de dois fatores: 1) interação do colágeno com as PTG através das ligações entre os grupos sulfato dos glicosaminoglicanos e grupos básicos do colágeno; e 2) turgescência da substância da matriz cartilaginosa, devido à intensa hidrofília dos glicosaminoglicanos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).

Os agrecanos logo que são secretados pelos condrócitos fixam-se nas moléculas de ácido hialurônico, formando o "complexo agregado de PTG" (Fig. 1). A região de ligação é formada pelo ácido hialurônico, pelos PTG e por uma proteína de ligação. Essa tríplice junção forma uma estrutura fortemente estável e muito resistente à digestão proteolítica

(KUETTNER e THONAR, 1998). Os glicosaminoglicanos, como os sulfatos de queratina e sulfatos de condroitina ligam-se ao segmento de PTG, que por sua vez, através de uma proteína de ligação, liga-se ao ácido hialurônico (PERIN *et al.*, 1987). As moléculas dos sulfatos de condroitina que através de ligações eletroestáticas com as fibras colágenas, contribuem para a rigidez da matriz (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995). Alguns oligossacarídeos, tais como, N-oligosacarídeos e C-oligosacarídeos ligam-se também à cadeia protéica central (MÖRGELIN *et al.*, 1988).

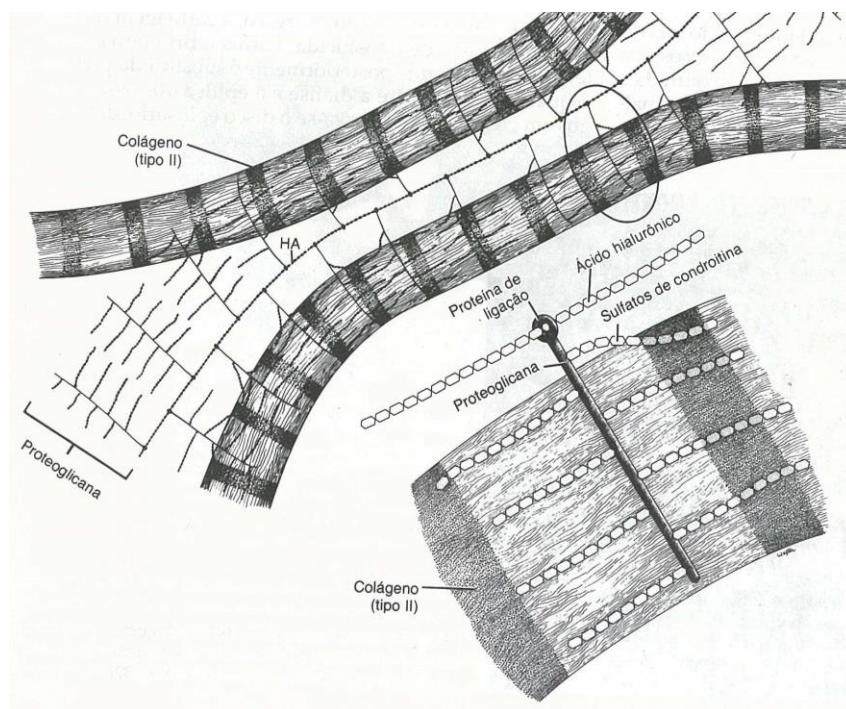


Figura 1: Representação esquemática de um complexo agregado de proteoglicano, composto pelo ácido hialurônico (HA), proteoglicano e proteína de ligação. JUNQUEIRA e CARNEIRO. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1995. 102p. il.

O maior PTG agregado, agrecano, contém até 100 cadeias de moléculas de glicosaminoglicanos com muitos grupos de sulfato e carboxilato. O número de glicosaminoglicanos ligados à core-proteína pode variar de uma (decorina) a mais de 200 moléculas. Uma core-proteína específica pode ter idênticas (fibroglicanos, glipicano, versicano), ou diferentes (agrecanos, serglicina, sindecano) glicosaminoglicanos (POLLARD

e EARNSHAW, 2004). O quadro 1 resume os tipos de core-proteínas, os glicosaminoglicanos e a função dos agrecanos no tecido cartilaginoso. Os agrecanos são retidos em altas concentrações dentro da rede de colágeno, o que cria uma alta pressão osmótica e libera água para o tecido. Essa tumefação é equilibrada pela tensão nas fibras colágenas. (HARDINGHAM e BAYLISS, 1990).

A quantidade de agrecanos e a proporção de sulfato de queratina ligada às subunidades de agrecanos parece aumentar de acordo com a profundidade das camadas de cartilagem (FRANZEN *et al.*, 1981; ZANETTI, RATCHLIFFE e WATT, 1985), na zona superficial a quantidade de PTG não-agregados é majoritária (KORVER *et al.*, 1990; KORVER *et al.*, 1992; POOLE *et al.*, 1986).

| <b>Tipo PTG</b> | <b>Core-proteína</b>   | <b>Glicosaminoglicanos</b>   | <b>Expressão</b> | <b>Função</b>   |
|-----------------|--|--|------------------|---|
| Agrecanos       | Um-gene, proteína 250-kD com proteína de ligação, lectina e domínios regulatórios complementares | 100-150 cadeias de sulfato de queratina<br>> 150 cadeias de sulfato de condroitina | Cartilagem       | Ligar o ácido hialurônico à proteína de ligação, hidratar e preencher a matriz extracelular |

Quadro 1: Resumo dos tipos de core-proteínas, glicosaminoglicanos e função das moléculas de agrecanos. POLLARD e EARNSHAW. Cell Biology. Philadelphia: Saunders, 2004. p. 496.

## 1.6 Estímulo mecânico

A força mecânica tem um papel importante na morfogênese tecidual (WU e CHEN, 2000) e no metabolismo extracelular (BACHRACH *et al.*, 1995; WU e CHEN, 2000). A homeostase da cartilagem é regulada pela força mecânica não apenas durante a formação óssea endocondral, mas também para o reparo de uma fratura e o remodelamento esquelético

em um adulto (JONES, KLAMFELDT e SANDSTROM, 1982; KIM *et al.*, 1994; SCHNEIDERMAN, KERET e MAROUDAS, 1986). No entanto, ainda não está bem esclarecido como essa formação óssea é ativada pelo estímulo mecânico e como ocorre o processo de tradução de recebimento e conversão dos sinais mecânicos em crescimento tecidual e regeneração óssea (HOLMVALL *et al.*, 1995; WU e CHEN, 2000).

Sachs (1991) acredita que forças mecânicas alteram a forma e o tamanho celular. Essa modificação celular estimularia a produção de mensageiros secundários intra-celulares, através de canais de íons ativados e não ativados presentes na membrana do plasma (SACHS, 1991) ou através de mudanças de conformação do citoesqueleto (BEN-ZE'EV, 1991). Sabe-se que a força mecânica estimula a deformação da matriz, a qual regula a proliferação e diferenciação dos condrócitos por duas vias de transmissão mecânica. Uma através de canais de íons que quando ativados aumentam os sinais mecânicos e a outra através dos canais de cálcio que estão envolvidos na transmissão desses sinais para o interior da célula (SACHS, 1991; WU e CHEN, 2000). No entanto, ainda não se tem conhecimento de como esses canais de íons transmitem os sinais mecânicos para regulação, a proliferação e a diferenciação celular. O estudo de Wu e Chen (2000) sugere que a deformação da matriz colágeno pode afetar mecanicamente a abertura e o fechamento desses canais de íons. Porém necessita-se determinar ainda se esse mecanismo é o responsável pelo envolvimento dos canais de íons na tradução mecânica pelos condrócitos.

Três resultados sobre a influência do estímulo mecânico na diferenciação dos condrócitos já foram sugeridos. O primeiro é que a força mecânica aceleraria o processo de diferenciação celular e alguns marcadores específicos, como o matrilin-1, e colágenos seriam expressos precocemente. O segundo é que se a carga de força potencializasse a diferenciação celular, marcadores específicos seriam expressos em grande extensão. O terceiro resultado é a combinação das duas primeiras possibilidades, ou seja, o estímulo mecânico aceleraria e potencializaria o processo de diferenciação celular (WU e CHEN, 2000).

A força mecânica influencia na formação e adaptação óssea (TURNER, 1998). Cargas mecânicas não equilibradas podem ter um efeito supressivo na ossificação endocondral alterando o metabolismo dos condrócitos ou provocando danos aos sítios de crescimento (OHASHI *et al.*, 2002). Porém, quando forças mecânicas adequadas são aplicadas sobre as células, a tensão mecânica pode contribuir para o crescimento cartilaginoso em qualquer estágio de desenvolvimento dos condrócitos (WU e CHEN, 2000).

O tecido ósseo possui a capacidade de adaptar a sua massa e a sua estrutura às forças mecânicas do meio circundante. As cargas mecânicas usadas pelo esqueleto durante a função

normal (por ex. locomoção e mastigação) são dinâmicas, apresentam constantemente mudanças nas magnitudes e nas direções. Uma vez que as forças típicas da função normal é de natureza dinâmica, considera-se teoricamente que a adaptação óssea deva ocorrer através de sinais provenientes mais das forças dinâmicas do que das estáticas (ROBLING *et al.*, 2001).

Numerosos experimentos *in vivo* mostraram que o osso é sensível e responde anabolicamente às forças dinâmicas (CHURCHES e HOWLETT, 1982; RAA-CULLEN *et al.*, 1994; RUBIN e LANYON, 1984; TURNER, OWAN e TAKANO, 1995). Tem sido demonstrado que as forças cíclicas de tração causam menos desgaste na cartilagem (JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997) e estimulam mais a síntese de MEC do que as forças estáticas (HOLMVALL *et al.*, 1995; LARSSON, ASPDEN e HEINEGARD, 1992; WANG e MAO, 2002 a, b; WU e CHEN, 2000). Wu e Chen (2000) aplicaram nos condrócitos extraídos do tecido cartilaginoso do osso esterno de aves embrionárias, forças cíclicas de 5% de alongamento, durante 15 min. / h., por 48 h. Eles verificaram que forças mecânicas cíclicas foram capazes de aumentar a proliferação dos condrócitos em mais de 30%, além de estimular a maturação e a hipertrofia da matriz. Holmvalld *et al.* (1995) submeteram forças cíclicas de 24% de alongamento durante 3 h. em condrócitos de origem bovina e observaram também que forças cíclicas aumentaram a expressão de colágeno tipo II e agrecanos no RNAm celular.

Bachrach *et al.* (1985) avaliaram a síntese de [<sup>35</sup>S] sulfato quando forças estáticas de compressão com magnitude de 0,1 MPa, foram aplicadas durante 10 min. e 20 h. em condrócitos de tecido articular. Os resultados indicaram que a resposta das células às forças estáticas foi bimodal, isto é, a força estática quando aplicada por 10 min. demonstrou um efeito de estímulo para a incorporação de [<sup>35</sup>S] sulfato, no entanto quando aplicadas por 20 h., causaram uma inibição da síntese de PTG. Estudos sobre os efeitos das forças estáticas sobre a adaptação óssea têm-se demonstrado inconsistentes, incluindo supressão da formação óssea (HERT, LISKOVÁ e LANDRGOT, 1969), sem resposta (HERT, LISKOVÁ e LANDRGOT, 1969; LANYON e RUBIN, 1984) e perda óssea (LANYON e RUBIN, 1984).

Wang e Mao (2002a) aplicaram forças de tração cíclicas e estáticas de 2 N na maxila de coelhos durante 20 min. / dia por 12 dias. Esses autores observaram nos sítios de crescimento da base do crânio dos coelhos que as forças cíclicas estimularam mais a condrogênese ( $870 \pm 130 \mu\text{m}$ ) do que as forças estáticas ( $654 \pm 29 \mu\text{m}$ ) e do que os grupos controles não submetidos a nenhum tipo de força ( $566 \pm 47 \mu\text{m}$ ). Estímulos mecânicos oscilatórios estão associados com forças de infinitas combinações de frequências e dosagens.

A observação de que as forças mecânicas oscilatórias aceleram a condrogênese nos sítios de crescimento da base craniana, sugerem que as forças ortopédicas craniofacial devem ser dinâmicas para se obter os efeitos terapêuticos desejados (WANG e MAO, 2002a). Cabe ressaltar entretanto, que alguns autores encontraram efeitos osteogênicos positivos associados às forças estáticas (HASSLER *et al.*, 1980; MCDONALD, YETTRAM e MACLEOD, 1994; MEADE *et al.*, 1984).

Bachrach *et al.* (1995) observaram através de análise matemática que durante a tração tecidual, pressões intra-celulares são geradas. Essas forças atuam de forma diferente no interior das células e na MEC (BACHRACH *et al.*, 1995; GUILAK e MOW, 1992). As áreas mecânicas intra-celulares não são uniformes e variam com o tempo, principalmente quando a permeabilidade da célula é menor do que a da matriz. Evidentemente, as propriedades mecânicas das células têm um efeito considerável no meio intra-celular (BACHRACH *et al.*, 1995).

Estudos de Robling *et al.* (2001) e Ohashi *et al.* (2002) observaram em ratos que forças de compressão de 17 N provocaram alterações traumáticas, como fissuras na placa de crescimento da ulna. Robling *et al.* (2001) aplicaram na ulna de ratos forças de compressão estáticas e dinâmicas de 17 N e força estática de 8,5 N diariamente, durante 10 min. por 2 semanas. Esses autores observaram que as forças 17 N, tanto estática quanto dinâmica causaram uma redução de 4% do tamanho da ulna, enquanto que a força estática de 8,5 N causou um menor efeito supressivo no crescimento ósseo aposicional de aproximadamente 2%. Esses autores concluíram que a supressão do crescimento foi proporcional às magnitudes das forças, independente de ser do tipo estática ou dinâmica. Ohashi *et al.* (2002) aplicaram forças de compressão com magnitudes de 17 N, 8,5 N e 4 N na ulna de ratos durante 10 min./ dia, por 8 dias e verificaram que as forças de 17 N causaram um efeito supressivo de aposição óssea e os sítios de crescimento não apresentaram recuperação óssea. No entanto, apesar de os grupos submetidos às forças de 8,5 N e de 4 N também terem apresentado uma diminuição nos níveis de mineralização longitudinal, os sítios de crescimento demonstraram recuperação em 1 semana.

Wang e Mao (2002a) constataram que forças de tração de 2N não causaram rachaduras e nem angiogênese quando aplicados na base do crânio de coelhos. Ao contrário, esses autores verificaram que a magnitude de 2N atuou como um acelerador do crescimento condral. Concluíram que o limite de força mecânica para potencializar o crescimento condral deve ser de até 2N.

Apesar de ambas as forças fisiológicas de tração e compressão serem consideradas importantes para o desenvolvimento condral (BACHRACH *et al.*, 1995; FROST, 1979; FROST, 1990), alguns autores afirmaram que a força de compressão parece estimular mais o crescimento (FROST, 1979; FROST, 1990). Entretanto, os efeitos das forças de tração na cartilagem de crescimento têm recebido muita pouca atenção e geralmente os estudos sobre força de tração estão relacionados com pesquisas de perspectiva clínica de distração óssea (WANG AND MAO, 2002 a,b). Apesar de já ter sido observado em alguns estudos, um aumento na altura das placas epifisais como resposta às forças de tração, o tipo de força aplicado foi estático e contínuo e em algumas vezes, não foi possível determinar sua magnitude (WILSON-MCDONALD e HOUGHTON, 90; PORTER, 1978). Poucos estudos têm utilizado forças cíclicas de tração, ou seja, forças que oscilem rapidamente de magnitude para avaliar a condrogênese nas placas de crescimento (WANG AND MAO, 2002 a,b).

Segundo Wu e Chen (2000), os estudos que avaliaram os efeitos das cargas mecânicas sobre os condrócitos são de difícil realização devido à complexidade da transferência de tensões mecânicas à cartilagem. Segundo esses autores, as forças mecânicas aplicadas na cartilagem resulta em deformação da matriz, a qual gera um meio biofísico complexo dentro do tecido, incluindo deformação mecânica direta sobre os condrócitos, efeitos eletrocinéticos, pressão hidrostática e fluxo do fluido (BUSCHMANN *et al.*, 1995; SMITH *et al.* 1997). Além disso, no tecido cartilaginoso, os condrócitos estão completamente circundados por uma rede de matriz extracelular que também recebem sinais mecânicos de um ambiente tridimensional. Todos esses fatores parecem ser importantes para o processo de transferência das forças mecânicas às células (WU e CHEN, 2000).

Para que as forças mecânicas tenham algum efeito de estimulação extrínseca de diferenciação dos condrócitos, essas células devem apresentar, primeiramente, um potencial intrínseco de diferenciação celular (WU e CHEN, 2000). O esclarecimento dos eventos mecânicos no nível celular é necessário para compreender as respostas biológicas dos condrócitos às cargas mecânicas aplicadas sobre o tecido (BACHRACH *et al.*, 1995).

## 2 PROPOSIÇÃO

1. Avaliar a expressão de DNA (incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina) sintetizada pelos condrócitos dos tecidos cartilagosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, como resposta à aplicação de tração de magnitudes de 2 kPa, 5 kPa e 10 kPa, durante o período de estímulo mecânico de 12 h. e 24 h.
2. Analisar a síntese de proteoglicanos (incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato) produzida pelos condrócitos dos tecidos cartilagosos das articulações do côndilo mandibular e do joelho de suínos, como resposta à aplicação de tração de magnitudes de 2 kPa, 5 kPa e 10 kPa, durante o período de estímulo mecânico de 12 h. e 24 h.
3. Avaliar a diferença de expressão de colágeno do tipo II e agrecanos no RNAm dos condrócitos dos tecidos cartilagosos das articulações do côndilo mandibular e do joelho de suínos, de acordo com os tempos (dias) de cultivo celular.



### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Extração e cultura celular

O protocolo desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Proteção ao Animal da Universidade de Hiroshima, Japão. O material utilizado, côndilo mandibular e articulação do joelho de suínos, foram obtidos em um abatedouro de animais, localizado na cidade de Hiroshima, Japão. Os espécimes foram mantidos sob refrigeração até a sua manipulação.

Todos os instrumentos e materiais utilizados nesse estudo foram previamente autoclavados (High-Pressure Steam Sterilizer BS-325, Tomy, Tóquio, Japão) e a extração e cultivo celular foram realizadas dentro de uma câmara estéril (Bio Clean Bench, Sanyo U2 34-260, Hiroshima, Japão).

Os condrócitos foram extraídos dos tecidos cartilagosos das articulações de 27 côndilos mandibulares e 36 joelhos de porcos, com idades entre 6 e 9 meses, sexo não especificado (Fig. 2).

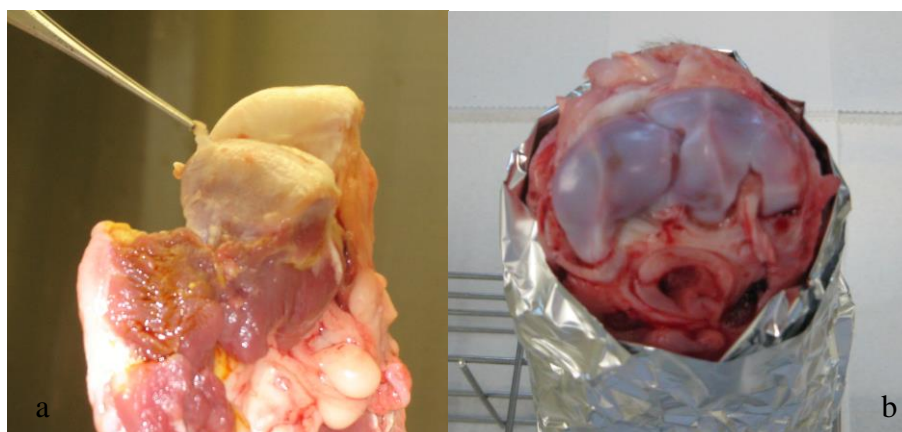


Figura 2: Tecidos cartilagosos das articulações do porco: a) côndilo mandibular; b) joelho.

Para cada extração celular, foram utilizados 3 côndilos mandibulares e 4 joelhos de porcos. As superfícies das cartilagens articulares foram limpas com iodo e líquido asséptico de gluconato de clorexidina à 5% (Farmácia de manipulação, Universidade de Hiroshima, Hiroshima, Japão), utilizando-se pinça e gaze hidrófila. As articulações foram dissecadas cuidadosamente logo após o sacrifício do animal, removendo-se o tecido cartilaginoso com

lâmina de bisturi número 10 e pinça. Os condrócitos do côndilo mandibular suíno utilizados nesse estudo eram provenientes da camada intermediária de proliferação e maturação celular, a qual se encontrava sob o tecido fibrocartilagenoso previamente removido (Fig. 3). Como a articulação do joelho suíno não apresenta revestimentos diferenciados, finas camadas de tecido cartilagenoso foram diretamente extraídas da peça anatômica, descartando-se apenas a camada mais superficial para evitar contaminação.

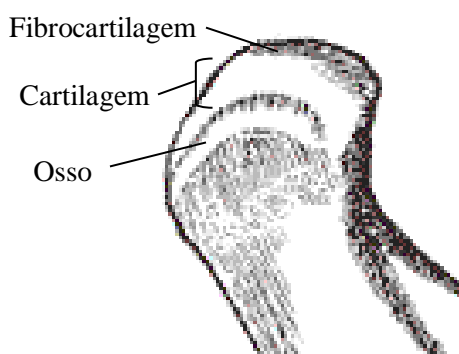


Figura 3: Camadas de tecido do côndilo mandibular suíno.

Os fragmentos de cartilagem foram depositados em um recipiente de polistireno com tampa, contendo uma solução salina tampão de cloreto de sódio, fosfato de sódio e fosfato de potássio (PBS). Os pedaços maiores de cartilagem foram cortados em fragmentos menores com auxílio de uma lâmina de bisturi número 11 e pinça, para facilitar o processo de digestão tecidual. Para prevenir a contaminação, os fragmentos de cartilagem foram lavados 3 vezes em PBS, e a cada lavagem, os recipientes de polistireno foram substituídos por um novo. Após a lavagem, os pedaços de cartilagem foram inoculados em potes estéreis de polistireno, em solução de  $\alpha$ -MEM contendo 3 vezes a concentração de antibióticos (penicilina, kanamicin e anfotericin B) da solução padrão de  $\alpha$ -MEM (vide Apêndice A, pág. 88).

As cartilagens dessas duas articulações foram submetidas a um processo de digestão utilizando-se substâncias enzimáticas, tais como, tripsin, ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), actinase e collagenase (Worthington Biochemical Co., Lakewood, USA), como descritas no quadro 2, pág. 34, a seguir:

| Tecido cartilaginoso | Substâncias Enzimáticas |          |            |
|----------------------|-------------------------|----------|------------|
|                      | Trypsin + EDTA          | Actinase | Colagenase |
| Côndilo mandibular   | 0,1%                    | 0,2%     | 0,02%      |
|                      | Tempo: 1 hora           |          | 12 horas   |
| Joelho               | 0,15%                   | 0,2%     | 0,02%      |
|                      | Tempo: 1 1/2 horas      |          | 15 horas   |

Quadro 2: Descrição dos nomes e concentrações das substâncias enzimáticas e o tempo utilizado para o processo de digestão das cartilagens do côndilo mandibular e do joelho de suínos.

Com objetivo de aumentar o efeito das substâncias enzimáticas e auxiliar no processo de digestão do tecido cartilaginoso, os fragmentos cartilagosos foram mantidos, durante à noite, em potes fechados de polistireno contendo uma cápsula imantada que ficava em constante movimentação rotatória. Os condrócitos eram mantidos em uma incubadora umidificada com condições constantes de temperatura de 37 grau Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ) e atmosfera de 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ).

Após o período de 12 a 15 horas sob o efeito da enzima colagenase, o tecido cartilaginoso foi filtrado em uma rede de nylon com tramas de fio de 62  $\mu\text{m}$  e inoculados em solução padrão de  $\alpha$ -MEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Mitsubishikasei, Tóquio, Japão) para interromper o processo enzimático. Então, o conteúdo contido em um tubo hermético e estéril, foi submetido a centrifugação numa velocidade entre 1.200 e 1.500 rotações por minuto (rpm) durante aproximadamente 8 minutos, para obter o precipitado celular. A solução de  $\alpha$ -MEM com 10% de SFB foi trocada, o processo de centrifugação repetido e o líquido aspirado novamente, deixando-se apenas o conteúdo de 20 ml no tubo. O precipitado celular foi dissolvido mexendo-se manualmente o tubo.

A contagem do número de condrócitos foi realizada através do contador Burkert-Turk deep 1/10 mm (Erma, Tokyo, Japão). Sete microlitros do conteúdo celular foi aplicado com pipeta em cada lado do contador (Fig. 4, pág. 35) e a contagem foi realizada com auxílio de um microscópio óptico (lente de aumento de 200 x, Nikon, Tóquio, Japão).

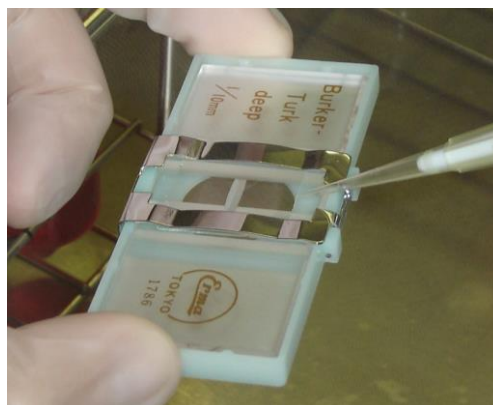


Figura 4: Contagem do número de células.

As células foram distribuídas em placas estéreis contendo 6 nichos de cultivo, com diâmetro de 35 mm cada, para a cultura primária celular. Cada nicho de cultura recebeu em média uma concentração de  $2 \times 10^5/\text{cm}^2$  de condrócitos e a amostra foi separada em grupos controle (-12 horas e -24 horas) e experimentais (12 horas e 24 horas). As células do grupo controle foram colocadas em placas de acrílico com base rígida (Corning Inc., New York, USA) e as dos grupos experimentais em placas de policarbonato com base de silicone-elastômero (Flexcell Co., McKeesport, USA) (Fig. 5).

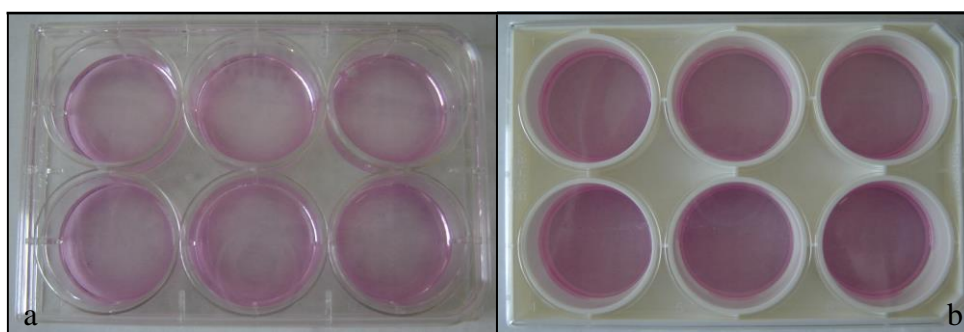


Figura 5: Placas estéreis com 6 nichos para cultivo celular: a) grupo controle; b) grupo experimento.

Para promover a aderência celular aos nichos de cultura, as placas de controle e as de experimento foram previamente tratadas com 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de colágeno do tipo II bovino e 10 mM de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) em PBS. As células foram cultivadas em 2 ml de solução  $\alpha$ -MEM com 10% de SFB, a qual foi trocada a cada 2 dias. Para auxiliar na formação de colágeno, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ácido ascórbico foi adicionada à solução de  $\alpha$ -MEM com SFB. Os condrócitos foram submetidos ao ensaio mecânico de força de tração após atingirem o estágio de confluência celular. A síntese de DNA foi avaliada quando a cultura celular encontrava-se

no estágio de proliferação, que ocorria aproximadamente no 4<sup>o</sup> dia de cultivo. A síntese de proteoglicanos (PTG) foi analisada no 12<sup>o</sup> dia da cultura celular, quando ocorria a produção de matriz extra-celular produzida pelos condrócitos. (Fig. 6)

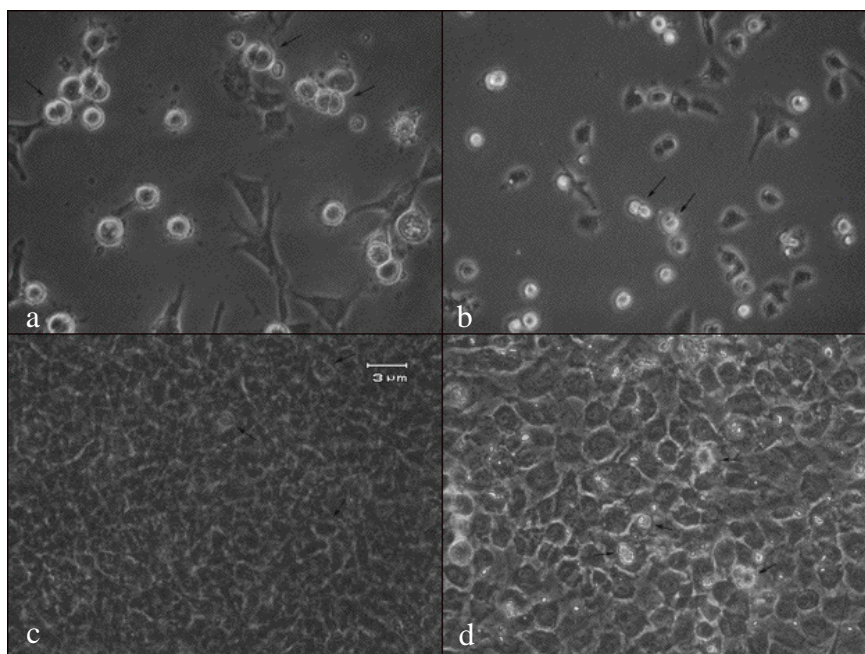


Figura 6: Condrócitos nos estágios de proliferação (a,b) e de formação de matriz extracelular (c,d). Tecido cartilaginoso do côndilo mandibular (a,c) e do joelho de suínos (b,d). Aumento de 200 x.

### 3.2 Força Mecânica de Tração

As forças mecânicas de tração foram aplicadas aos condrôcitos através de uma unidade operacional computadorizada de força à vácuo (Flexercell® Strain Unit, Flexcell International Corporation, McKeesport, PA, USA), que puxavam as bases de silicone-elastômero dos nichos de cultura (Fig. 7, pág. 37).

As condições das forças utilizadas foram a de 30 ciclos / min., com os tempos de duração e de intervalo de 1 segundo cada. As magnitudes das forças foram estipuladas em 2 kPa (0,02 kgf/ cm<sup>2</sup>)<sup>1</sup>, com 3% de alongamento; 5 kPa (0,05 kgf/cm<sup>2</sup>)<sup>1</sup>, com 7% de alongamento e 10 kPa (0,10 kgf/cm<sup>2</sup>)<sup>1</sup>, com 12% de alongamento das bases de silicone-

---

<sup>1</sup> Kg/cm<sup>2</sup> = 97,98 kPa

elastômero. As forças de tração foram aplicadas aos condrócitos durante os períodos de tempo de 12 e 24 horas. A concentração de 10% de SFB contida na solução de  $\alpha$ -MEM, foi substituída por uma concentração de SFB de 1%, 12 horas previamente ao estímulo mecânico e 0,5% imediatamente antes da aplicação das forças de tração. As amostras do grupo controle não foram submetidas ao ensaio mecânico. Para cada magnitude de forças de tração, o ensaio mecânico foi repetido 3 vezes em amostras de cultivo celular de cada tecido cartilaginoso.

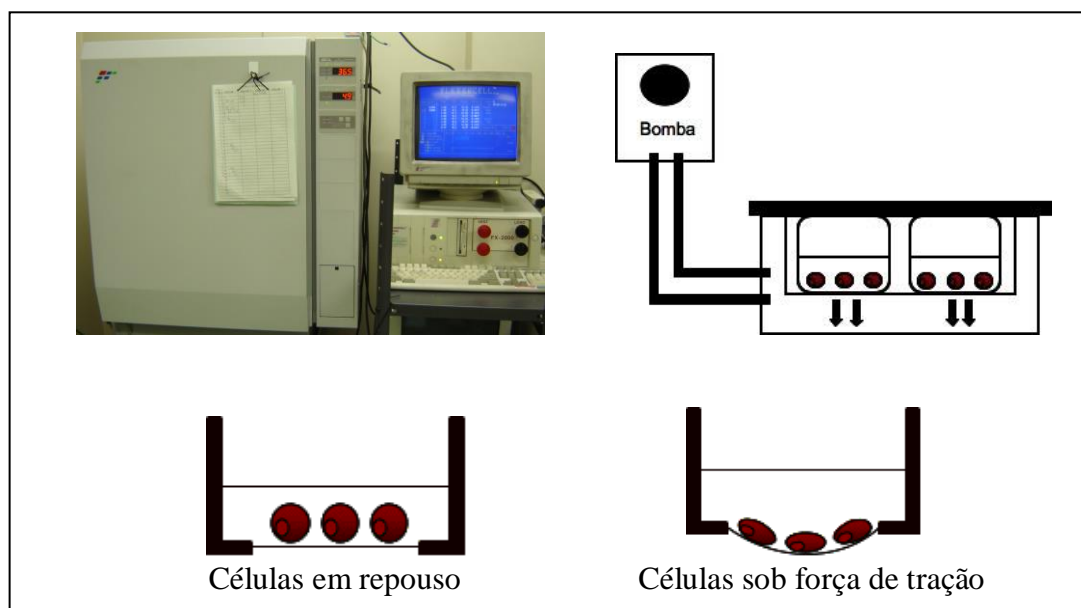


Figura 7: Sistema de aplicação de forças de tração às células.

### 3.3 Determinação da síntese de DNA e Proteoglicanos

A síntese de DNA em resposta ao estímulo mecânico de tração foi mensurada através da incorporação de um marcador radioativo [ $^3\text{H}$ ] timidina. Os condrócitos, no estágio proliferativo (4<sup>o</sup> dia), foram expostos à 5  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^3\text{H}$ ] timidina em 2 ml de  $\alpha$ -MEM contendo 0,5% de SFB, 4 horas antes do término do estímulo mecânico.

Para a análise da síntese de proteoglicanos, os condrócitos, no estágio de matriz extracelular (12<sup>o</sup> dia), foram expostos à 2,5  $\mu\text{Ci/ml}$  de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato em 2 ml de  $\alpha$ -MEM contendo 0,5% de SFB, 4 horas antes da finalização do período de estimulação mecânica.

Após o término do estímulo mecânico, a solução de  $\alpha$ -MEM com os marcadores radioativos foi aspirada, a camada celular foi lavada 3 vezes com PBS e as amostras foram preparadas para a leitura através do contador de cintilação líquida (Liquid Scintillation Counter LSC-5100, Aloka, Tóquio, Japão) (Fig. 8).



Figura 8: Máquina para leitura dos marcadores radioativos [ $^3\text{H}$ ] timidina e [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato.

### 3.3.1 Preparo para a determinação da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina

Após a lavagem da camada celular com PBS, os condrócitos foram fixados com 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 10% por 10 minutos. A solução de TCA foi aspirada, a camada celular foi removida dos nichos de cultivo com auxílio de uma pinça e inoculadas em tubos herméticos e estéreis, contendo 1 ml de 1 N de hidróxido de sódio (NaOH). A amostra com o NaOH foi mantida em movimento em uma banheira de água com temperatura constante de 37<sup>0</sup> C, durante aproximadamente 12 horas. No dia seguinte, os condrócitos foram neutralizados adicionando-se nos tubos 400  $\mu\text{l}$  de 6 N de ácido clorídrico (HCl). Trezentos micro litros de cada amostra foram separados em mini-frascos herméticos e estéreis, contendo 400  $\mu\text{l}$  de líquido de cintilação ACS II (Amersham, Tóquio, Japão) e a mensuração da radioatividade do marcador [ $^3\text{H}$ ] timidina foi realizada pelo contador de líquido cintilante (Fig. 8).



### 3.3.2 Preparo para a determinação da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato

Após o término do ensaio mecânico, os condrócitos foram lavados 3 vezes com PBS para remoção do marcador radioativo. A camada celular foi retirada dos nichos de cultivo e inseridas em tubos fechados e estéreis, em uma solução de 950  $\mu\text{l}$  contendo 0,2 M de tris/ácido clorídrico (tris/HCl), 5 mM de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e 2 mg/ml de actinase E. A amostra foi mantida em movimento em uma banheira com água numa temperatura constante de 65<sup>0</sup> C, durante à noite. Após aproximadamente 12 horas, 100  $\mu\text{l}$  de cada amostra foi transferida para os mini-frascos herméticos e assépticos, contendo as seguintes soluções:

- 500  $\mu\text{l}$  de 2 mM de sulfato de magnésio ( $\text{SO}_4\text{Mg}$ ) em 0,2 M de tris/HCl;
- 500  $\mu\text{l}$  de 20 mM de cloreto de sódio (NaCl) em 1% de cloreto de cetilpiridínio (cloreto de hexadecilpiridinio - CPC); e
- 50  $\mu\text{l}$  de 0,1 mg/ml de sulfato de condroitina em 0,2 M de tris/HCl.

As amostras foram incubadas novamente, durante 1 a 2 horas, na banheira com água na temperatura constante de 37<sup>0</sup> C.

Para a leitura do marcador radioativo [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato, foi utilizado um filtro de acrílico (XICOM FM-30) conectado a uma bomba de sucção (Handy Aspirator WP-15, Yamato Scientific Co. Ltda., Tóquio, Japão), previamente lavado com etanol 70% (Fig. 9).



Figura 9: Filtro de acrílico para preparo da leitura do marcador radioativo [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato.

Filtros de papéis com fibras de vidro com diâmetro de 25 mm cada (Advantec GC-50, Tokyo Roshi Kaisha, Ltda., Tokyo, Japão) foram colocados em cada orifício de saída do filtro de acrílico, com auxílio de pinça e umedecidos com 700  $\mu\text{l}$  de CPC. Um volume de 1400  $\mu\text{l}$  de cada amostra foi inserida sobre cada filtro de papel e aplicados mais 700  $\mu\text{l}$  de CPC. Após 5 minutos, os filtros de papéis foram removidos da caixa de acrílico e inoculados em micro-



tubos contendo 1 ml de líquido cintilante Scintisol EX-H (Dojindo, Kumamoto, Japão). Os micro-tubos foram levados para o contador do líquido de cintilação, para a realização da leitura da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato (Fig. 8, pág. 38).

### **3.4 Reação em cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) e PCR em tempo real, para determinação da expressão de colágeno do tipo II e agreganos**

Após a extração celular e o cultivo dos condrócitos dos tecidos cartilagosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, a determinação de expressão do colágeno do tipo II e de agreganos foi avaliada utilizando-se os métodos de transcrição reversa, associada à reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e PCR em tempo real. O RNA total foi coletado de uma amostra não submetida ao ensaio mecânico de tração e obtida nos tempos de 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo celular. O procedimento de quantificação da expressão de colágeno do tipo II e agreganos foi realizado 2 vezes em cada amostra de tecido cartilaginoso. Todo o material necessário para a transcrição reversa associada à reação em cadeia da polimerase e o PCR em tempo real foi manipulado com luvas, óculos de proteção e as amostras foram mantidas refrigeradas constantemente em gelo.

#### **3.4.1 Extração do RNAm (Método Trizol)**

Quando deseja-se manipular o RNA celular, a degradação ou a desnaturação do RNA pela enzima RNase é um fator que deve ser controlado. A enzima RNase está presente nas células, no tecido, fluido da saliva, suor, pele, etc. e é resistente às altas temperaturas, até mesmo à temperatura de 120<sup>0</sup> C da autoclave. Além disso, devido a toxicidade do reagente Trizol (TRIzol<sup>®</sup> Reagent, Invitrogen, Tóquio, Japão) toda a manipulação foi realizada dentro de uma câmara de aspiração. Como o sucesso do experimento depende do manejo da enzima RNase, fez-se necessário a utilização de máscara e luvas de proteção.

- Homogeneização - A solução de  $\alpha$ -MEM com 10% de SFB foi aspirada dos nichos de cultura celular e 500  $\mu$ l do reagente Trizol foi adicionado. Toda a camada celular com o reagente Trizol foi transferido com pipeta para mini-frascos de 1,5 ml herméticos e estéreis. Para que os complexos protéicos nucleares fossem dissolvidos pelo Trizol, a solução foi agitada em intervalos de 5 min. durante 30 min., com auxílio de um vibrador.
- Emulsão - Cem micro litros de clorofórmio (proporção de 5 Trizol : 1 clorofórmio) foram adicionados à amostra e o procedimento de agitação foi repetido por mais 30 min. O objetivo dessa fase foi fazer com que o fenol do Trizol formasse uma emulsão juntamente com o clorofórmio e facilitasse a passagem das proteínas para a fase hidrofóbica e dos ácidos nucleicos para a fase hidrofílica. Como a extração com Trizol ocorre em condições ácidas, apenas o RNA se encontra na forma solúvel.
- Separação de fase - Os micro-frascos foram centrifugados numa velocidade de 13.000 rpm, durante 15 min, numa temperatura constante de 4<sup>o</sup> C. A centrifugação permitiu a separação das fases hidrofílica e hidrofóbica. A porção sobrenadante e transparente (fase hidrofílica) da amostra foi transferida para um novo mini-frasco de 1,5 ml com auxílio de uma pipeta.
- Precipitação – Quinhentos micro litros de 2-propanol foram adicionados à porção sobrenadante e o mini-frasco foi submetido a agitação com intervalos de 5 min., por mais 30 min. Após esse procedimento, a amostra foi centrifugada novamente na velocidade de 13.000 rpm, a 4<sup>o</sup> C durante 10 minutos. Como o RNA é solúvel em água, mas não em álcool, ele precipita com o isopropanol e forma um sedimento (*pellet*) no fundo do mini-frasco.
- Lavagem – Com auxílio de uma pipeta, o sobrenadante de isopropanol e água (H<sub>2</sub>O) foram removidos cuidadosamente e sem danificar o sedimento de RNA. Hum mililitro de etanol à 75% (preparado com água destilada livre de enzima RNase\*) foi adicionado ao mini-frasco para lavagem hidratante do sedimento. A amostra foi novamente centrifugada na velocidade de 13.000 rpm, a 4<sup>o</sup> C por 10 min.

\* Água destilada livre de enzima RNase: Contém 0,1% de dietil pirocarbonato (DEPC) em água destilada. A solução foi bem misturada e deixada em descanso por aproximadamente 12 horas, em um frasco de vidro com tampa semi-cerrada e autoclavado 3 vezes.

- Secagem – O Etanol a 75% foi aspirado com auxílio de uma seringa e com o cuidado de remover todas as gotas que se depositavam na parede dos micro-frascos. O tubo foi invertido para secar ao ar livre durante aproximadamente 10 min. Nesse fase, evitou-se a desidratação total do sedimento de RNA, pois apesar de o excesso de etanol inibir futuras reações como o PCR, o sedimento extra seco dificulta a re-suspensão do RNA em água.
- Re-suspensão – Cinco micro litros de água DEPC foram adicionados ao tubo e o sedimento de RNA foi dissolvido completamente. Diluído em água DEPC, o RNA total foi conservado em congelador na temperatura de - 70<sup>0</sup> C.
- Quali-quantificação do RNA total - A quantificação de concentração de RNA suspenso em água DEPC foi verificada através de um espectrofotômetro, determinando-se o valor da densidade óptica (DO) dos ácidos nucleicos, onde 1 (uma) unidade de DO corresponde a 40 ng de RNA (ou 50 ng de DNA). Os ácidos nucleicos têm pico de absorção a 260 nm e um outro pico a 280 nm. O valor ideal de DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> (taxa) da suspensão de RNA varia na faixa entre 1,65 e 1,8, no entanto ocasionalmente pode-se encontrar o valor de 1,5. Para a quali-quantificação do RNA total, 1 µl da suspensão de RNA de cada amostra foi submetida a leitura da DO pelo espectrofotômetro.

### 3.4.2 Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

Após a qualificação e quantificação de RNA total de cada amostra, a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa foi realizada utilizando-se os *kits* do primer Oligo (dT)<sub>20</sub> e enzima ReverTra Ace- $\alpha$  first strand DNAc synthesis (Toyobo, Osaka, Japan). A

suspensão foi preparada previamente, adicionando-se em cada micro-tubo um volume total de 20 µl de cada amostra (Quadro 3, pág. 43):

| Reagentes                       | Volume |
|---------------------------------|--------|
| Tampão Transcriptase Reversa 5x | 4 µl   |
| Nucleotídeos dNTP               | 2 µl   |
| Inibidor de RNase               | 1 µl   |
| Oligo (dT)20                    | 1 µl   |
| Enzima ReverTra Ace-α           | 1 µl   |
| RNA total 1µg                   | X µl   |
| Água DEPC                       | X µl   |
| Volume total                    | 20 µl  |

Quadro 3: Descrição dos reagentes e as respectivas quantidades utilizadas para a realização do RT-PCR.

As reações de RT-PCR foram conduzidas em termociclador (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Fig. 10). A desnaturação do RNA e a retrotranscrição para síntese de DNAc foram realizadas submetendo-se as amostras às temperaturas e tempos de 42<sup>0</sup> C por 20 min., 99<sup>0</sup> C por 5 min. e 4<sup>0</sup> C por 5 min.



Figura 10: Termociclador para retrotranscrição para síntese de DNAc.

### 3.4.3 PCR em tempo real

O material utilizado para quantificar as reações de PCR em tempo real foi o *kit* SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e os volumes de cada substância usada, estão relacionados no quadro 4 a seguir:

| Reagentes             | Volume   |
|-----------------------|----------|
| <i>SYBR Green</i>     | 5 µl     |
| <i>Primer Líder</i>   | 0.5 µM/L |
| <i>Primer Reverso</i> | 0.5 µM/L |
| DNAc modelo           | 1 µl     |
| Água DEPC             | X µl     |
| Volume total          | 10 µl    |

Quadro 4: Relação dos reagentes e os volumes utilizados para a realização do PCR em tempo real.

A sequência dos nucleotídeos dos *primers* utilizados para o PCR dos genes para glicerol 3-fosfato desidrogenase (G3PDH), agrecanos e colágeno tipo II estão descritos no quadro 5.

| Gene             | Primers            | Sequência do Prime 5'→ 3'                    |
|------------------|--------------------|--|
| G3PDH            | Líder:<br>Reverso: | TCATCCCTGCTTCTACCG<br>CAGATCCACAACCGACAC     |
| Agrecanos        | Líder:<br>Reverso: | CAGGTGAAGACTTTGTGGAC<br>CAAATGTAAAGGGCTCCTCA |
| Colágeno Tipo II | Líder:<br>Reverso: | GGCAAAGATGGCGAGACA<br>GCCCTGATCACCTGGTTTC    |

Quadro 5: Descrição das sequências dos nucleotídeos dos *primers* utilizados para cada gene no PCR em tempo real.

Os reagentes e o ácido nucléico (DNAC modelo) foram inoculados em capilares de vidros de borossilicato, com capacidade de 20  $\mu$ l, comprimento de 45 mm e diâmetro externo de 1,55 mm, moldados a um reservatório de polipropileno e tampa de vedação (Capilar LightCycler®, (Roche Diagnostics, Basel, Suíça). Para garantir a introdução de todo o material experimental, os capilares de vidros foram submetidos a uma microcentrifuga de bancada para uma rápida centrifugação (5 seg.) com velocidade de 2.000 rpm. Os capilares foram posicionados no Carrossel de Amostras Light Cycler® e levados para o Equipamento Light Cycler® ST300 (Roche Diagnostics, Basel, Suíça) para a leitura de expressão de colágeno tipo II e agrecanos. (Fig. 11)



Figura 11: Equipamento Light Cycler® ST300 para leitura de expressão de colágeno tipo II e agrecanos.

A leitura da quantificação dos genes foi realizada com o auxílio do programa de computador Light Cycler® Software 4.0 (Roche Diagnostics, Basel, Suíça), previamente estabelecido nas seguintes condições de temperatura e tempo para cada ciclo: desnaturação a 94<sup>0</sup> C por 30 seg., anelamento a 58<sup>0</sup> C por 30 seg. e extensão a 72<sup>0</sup> C por 10 seg.

Os sinais de quantificação relativa de colágeno tipo II e agrecanos foram normalizados pelos sinais de glicerol 3-fosfato desidrogenase (G3PDH).

### 3.5 Análise estatística

Para a avaliação dos efeitos das magnitudes das forças de tração sobre a síntese de DNA e proteoglicanos, foi utilizado a análise estatística de variância ANOVA. O teste  $t$  de Student foi aplicado para comparar os níveis de expressão de colágeno tipo II e agrecanos no RNAm em diferentes estágios de maturação do cultivo celular.

## 4 RESULTADO

Os valores obtidos com a leitura dos marcadores radioativos [ $^3\text{H}$ ] timidina e [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato pelo contador do líquido de cintilação nos condrócitos dos tecidos cartilaginosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, estão descritos nas tabelas 1 à 12 (pág. 49 à 60). Esses valores expressos foram submetidos às fórmulas de  $[1800/300]$  para a avaliação da síntese de DNA e a de  $[2000/100]$  para a análise da produção de proteoglicanos (PTG). A análise estatística foi aplicada sobre esses valores convertidos pelas fórmulas.

As tabelas 1 (pág. 49), 3 (pág. 51), 5 (pág. 53), 7 (pág. 55), 9 (pág. 57) e 11 (pág. 59) demonstram os valores, médias e desvios padrão da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina para avaliação da síntese de DNA, produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular e do joelho de suínos, durante a aplicação das forças de tração de 2 kPa, 5 kPa e 10 kPa, nos períodos de tempo de 12 e 24 horas.

Os valores, médias e desvios padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato nos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular e do joelho de suínos estão descritas nas tabelas 2 (pág. 50), 4 (pág. 52), 6 (pág. 54), 8 (pág. 56), 10 (pág. 58), 12 (pág. 60), de acordo com as magnitudes de força de tração de 2 kPa, 5 kPa e 10 kPa, durante o tempo de estímulo mecânico de 12 e 24 horas.

De acordo com os resultados, foi observado que os condrócitos dos tecidos cartilaginosos das articulações do côndilo mandibular e do joelho de suínos, quando submetidos às forças mecânicas de tração com magnitudes de 2 kPa e 5 kPa, apresentaram um aumento de incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina e de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para ambos os períodos de estímulo mecânico de 12 e 24 horas (Tabelas 1 à 8, pág. 49 à 56).

Para a magnitude de força de 2kPa, os grupos experimentos dos condrócitos do côndilo mandibular suíno demonstraram um aumento de [ $^3\text{H}$ ] timidina e de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato estatisticamente significativo para os tempos de 12 h. ( $p < 0,01$ ) e de 24 h. ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos grupos controles (Tabelas 1 e 2, pág. 49 e 50). Os condrócitos do joelho suíno também apresentaram um aumento da síntese de [ $^3\text{H}$ ] timidina e de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato quando submetidos à essa mesma magnitude de força, porém sem diferença estatisticamente significativa nos tempos de 12 h. e 24 h. (Tabelas 3 e 4, pág. 51 e 52).



As tabelas 5 à 8, pág. 53 à 56, demonstram os resultados em relação ao estímulo mecânico de magnitude de 5 kPa. Todos os grupos experimentais do joelho suíno exibiram um aumento da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina e de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato estatisticamente significativos em 12 h. ( $p < 0,01$ ) e 24 h. ( $p < 0,01$ ) (Tabelas 7 e 8, pág. 55 e 56). Os condrócitos do côndilo mandibular suíno apresentaram um aumento da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina e de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato estatisticamente significativos em 12 h. ( $p < 0,01$ ). Apesar de os grupos dos condrócitos do côndilo mandibular suíno em 24 h. também terem apresentado um aumento de expressão dos marcadores radioativos, a incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina não foi considerada estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 5, pág. 53), enquanto que a incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato foi estatisticamente diferente apenas ao nível de significância de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6, pág. 54).

Em relação à magnitude de força de tração de 10 kPa, pôde-se observar que os condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, quando submetidos à essa magnitude de estímulo mecânico, apresentaram uma redução da síntese dos marcadores de [ $^3\text{H}$ ] timidina e de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato estatisticamente significativa para ambos os períodos de estímulo mecânico de 12 h. e 24 h. ( $p < 0,01$ ) (Tabelas 9 e 10, pág. 57 e 58). No entanto, quando os condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno foram submetidos à essa mesma magnitude de força, foi verificado uma maior produção dos níveis de [ $^3\text{H}$ ] timidina e de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato (Tabelas 11 e 12, pág. 59 e 60). O aumento da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina foi considerado estatisticamente significativo tanto para o período de estímulo mecânico de 12 h. ( $p < 0,01$ ) quanto para o tempo de 24 h. ( $p < 0,05$ ) (Tabela 11, pág. 59). Apesar de os condrócitos dessa articulação terem apresentado um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) na síntese de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato no período de 24 h., esse incremento no grupo de 12 h. não foi considerado estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ) (Tabela 12, pág. 60).

A Tabela 13, pág. 61, mostra os resultados da quantificação e qualificação da densidade óptica dos ácidos nucléicos dos condrócitos das cartilagens do côndilo mandibular e do joelho de suínos, para a avaliação da expressão do colágeno tipo II e agrecanos no RNAm.

A quantificação da expressão de colágeno tipo II e dos agrecanos no RNAm dos condrócitos dos tecidos cartilaginosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, em relação a idade de cultivo celular, podem ser observados nas tabelas 14 (pág. 61) e 15 (pág. 63). Foi verificado uma diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ) da expressão de colágeno tipo II e de agrecanos nos RNAm entre os condrócitos do côndilo mandibular e da articulação do joelho de suínos.

Tabela 1: Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 2 kPa.

| Côndilo mandibular - Síntese de DNA (2 kPa) |                                   |         |         |         |                      |          |                     |          |
|---|-----------------------------------|---------|---------|---------|----------------------|----------|---------------------|----------|
| Amostra                                     | [ $^3\text{H}$ ] timidina (H-CPM) |         |         |         | Fórmula (1800 / 300) |          |                     |          |
|   | (-) 12h                           | 12h     | (-) 24h | 24h     | (-) 12h              | 12h      | (-) 24h             | 24h      |
| 1   | 33443                             | 39697   | 37817   | 30745   | 200658               | 238182   | 226902              | 184470   |
| 2   | 34736                             | 34404   | 37631,1 | 31502,9 | 208416               | 206424   | 225786,6            | 189017,4 |
| 3   | 42670                             | 71144   | 32358,3 | 39447,2 | 256020               | 426864   | 194149,8            | 236683,2 |
| 4   | 41234                             | 70061   | 31504,2 | 40956,5 | 247404               | 420366   | 189025,2            | 245739   |
| 5   | 44917                             | 62966   | 34273,2 | 28815,8 | 269502               | 377796   | 205639,2            | 172894,8 |
| 6   | 45859                             | 66409   | 33174,7 | 28223   | 275154               | 398454   | 199048,2            | 169338   |
| 7   | 41042                             | 36362   | 31571,8 | 43505,8 | 246252               | 218172   | 189430,8            | 261034,8 |
| 8   | 41225                             | 37183   | 32159,4 | 44330   | 247350               | 223098   | 192956,4            | 265980   |
| 9   | 34379                             | 45158   | 33235,8 | 36988,9 | 206274               | 270948   | 199414,8            | 221933,4 |
| 10  | 32950                             | 47183   | 35101,3 | 37343,8 | 197700               | 283098   | 210607,8            | 224062,8 |
| 11  | 41229                             | 57464   | 41538,9 | 45141,2 | 247374               | 344784   | 249233,4            | 270847,2 |
| 12  | 40212                             | 60690   | 42456,7 | 47612,5 | 241272               | 364140   | 254740,2            | 285675   |
| 13  | 35875                             | 53489   | 36568   | 34098   | 215250               | 320934   | 219408              | 204588   |
| 14  | 40556                             | 61476   | 40867,8 | 40978,8 | 243336               | 368856   | 245206,8            | 245872,8 |
| 15  | 41294                             | 42376   | 31657   | 39079,2 | 247764               | 254256   | 189942              | 234475,2 |
| <b>Média</b>                                | 39441,4                           | 52404,1 | 35461,0 | 37917,9 | 236648,4             | 314424,8 | 212766,0            | 227507,4 |
| <b>DP</b>                                   | 4119,8                            | 12826,3 | 3818,1  | 6129,6  | 24718,8              | 76958,0  | 22909,0             | 36777,9  |
| <b>Significância</b>                        |                                   |         |         |         | <b>p &lt; 0,01**</b> |          | <b>p &lt; 0,05*</b> |          |

Nota: teste ANOVA; (\*) Significativo ao nível de 5%, (\*\*) Significativo ao nível de 1%

Tabela 2: Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 2 kPa.

| Côndilo mandibular - Síntese de PTG (2 kPa) |                                     |        |         |        |                      |         |                     |         |
|---|-------------------------------------|--------|---------|--------|----------------------|---------|---------------------|---------|
| Amostra                                     | [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato (C-DPM) |        |         |        | Fórmula (2000 / 100) |         |                     |         |
|   | (-) 12h                             | 12h    | (-) 24h | 24h    | (-) 12h              | 12h     | (-) 24h             | 24h     |
| 1   | 310,4                               | 345,28 | 365,76  | 374,4  | 6208                 | 6905,6  | 7315,2              | 7488    |
| 2   | 272,64                              | 323,52 | 320,96  | 474,56 | 5452,8               | 6470,4  | 6419,2              | 9491,2  |
| 3   | 306,88                              | 339,52 | 379,52  | 528,32 | 6137,6               | 6790,4  | 7590,4              | 10566,4 |
| 4   | 285,76                              | 312,64 | 386,24  | 417,28 | 5715,2               | 6252,8  | 7724,8              | 8345,6  |
| 5   | 180,48                              | 323,2  | 329,28  | 303,04 | 3609,6               | 6464    | 6585,6              | 6060,8  |
| 6   | 224,96                              | 316,16 | 317,12  | 380,8  | 4499,2               | 6323,2  | 6342,4              | 7616    |
| 7   | 224                                 | 287,04 | 381,76  | 378,24 | 4480                 | 5740,8  | 7635,2              | 7564,8  |
| 8   | 207,09                              | 343,68 | 283,18  | 428,93 | 4141,8               | 6873,6  | 5663,6              | 8578,6  |
| 9   | 267,5                               | 300,16 | 306,91  | 394,68 | 5350                 | 6003,2  | 6138,2              | 7893,6  |
| 10  | 220,08                              | 313,28 | 276,92  | 365,1  | 4401,6               | 6265,6  | 5538,4              | 7302    |
| 11  | 216                                 | 334,98 | 310,65  | 502,98 | 4320                 | 6699,6  | 6213                | 10059,6 |
| 12  | 260,9                               | 298,76 | 264,87  | 435,03 | 5218                 | 5975,2  | 5297,4              | 8700,6  |
| 13  | 291,36                              | 342,1  | 238     | 359,27 | 5827,2               | 6842    | 4760                | 7185,4  |
| 14  | 259,21                              | 310,4  | 241,64  | 310,76 | 5184,2               | 6208    | 4832,8              | 6215,2  |
| 15  | 205,67                              | 317,43 | 238,41  | 471,04 | 4113,4               | 6348,6  | 4768,2              | 9420,8  |
| <b>Média</b>                                | 248,86                              | 320,54 | 309,41  | 408,29 | 4977,24              | 6410,86 | 6188,29             | 8165,90 |
| <b>DP</b>                                   | 40,41                               | 17,84  | 52,29   | 65,88  | 808,34               | 356,80  | 1045,86             | 1317,73 |
| <b>Significância</b>                        |                                     |        |         |        | <b>p &lt; 0,01**</b> |         | <b>p &lt; 0,05*</b> |         |

Nota: teste ANOVA; (\*) Significativo ao nível de 5%, (\*\*) Significativo ao nível de 1%

Tabela 3: Valores, média e desvio padrão da incorporação de  $[^3\text{H}]$  timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 2 kPa.

| Joelho - Síntese de DNA (2 kPa) |                                 |         |         |         |                      |         |                    |          |
|---------------------------------|---------------------------------|---------|---------|---------|----------------------|---------|--------------------|----------|
| Amostra                         | $[^3\text{H}]$ timidina (H-CPM) |         |         |         | Fórmula (1800 / 300) |         |                    |          |
|                                 | (-) 12h                         | 12h     | (-) 24h | 24h     | (-) 12h              | 12h     | (-) 24h            | 24h      |
| 1                               | 28583                           | 27564   | 31920   | 35427   | 171498               | 165384  | 191520             | 212562   |
| 2                               | 33942                           | 28910   | 33615   | 34377   | 203652               | 173460  | 201690             | 206262   |
| 3                               | 30714                           | 37395   | 32262   | 34230   | 184284               | 224370  | 193572             | 205380   |
| 4                               | 30862                           | 37737   | 33366   | 31523   | 185172               | 226422  | 200196             | 189138   |
| 5                               | 32900                           | 32122   | 30613   | 32643   | 197400               | 192732  | 183678             | 195858   |
| 6                               | 31282                           | 34230   | 31577   | 32993   | 187692               | 205380  | 189462             | 197958   |
| 7                               | 34517                           | 34548   | 29228   | 33778   | 207102               | 207288  | 175368             | 202668   |
| 8                               | 34447                           | 35280   | 31017   | 31966   | 206682               | 211680  | 186102             | 191796   |
| 9                               | 34564                           | 36275   | 30947   | 32821   | 207384               | 217650  | 185682             | 196926   |
| 10                              | 34494                           | 35956   | 30247   | 33978   | 206964               | 215736  | 181482             | 203868   |
| 11                              | 30312                           | 30910   | 32345   | 32190   | 181872               | 185460  | 194070             | 193140   |
| 12                              | 28668                           | 32880   | 31701   | 35021   | 172008               | 197280  | 190206             | 210126   |
| 13                              | 31500                           | 33016   | 32324   | 34089   | 189000               | 198096  | 193944             | 204534   |
| 14                              | 33197                           | 35647   | 30701   | 33291   | 199182               | 213882  | 184206             | 199746   |
| 15                              | 31982                           | 29645   | 33678   | 34655   | 191892               | 177870  | 202068             | 207930   |
| <b>Média</b>                    | 32130,9                         | 33474,3 | 31702,7 | 33532,1 | 192785,6             | 200846  | 190216,4           | 201192,8 |
| <b>DP</b>                       | 2073,9                          | 3124,1  | 1281,0  | 1158,0  | 12443,5              | 18745,0 | 7686,2             | 6948,09  |
| <b>Significância</b>            |                                 |         |         |         | <b>p &gt; 0,05</b>   |         | <b>p &gt; 0,05</b> |          |

Nota: teste ANOVA; (p > 0,05) não significativo ao nível de 5%

Tabela 4: Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 2 kPa.

| Joelho - Síntese de PTG (2 kPa) |                                     |        |         |        |                      |        |                    |         |
|---------------------------------|-------------------------------------|--------|---------|--------|----------------------|--------|--------------------|---------|
| Amostra                         | [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato (C-DPM) |        |         |        | Fórmula (2000 / 100) |        |                    |         |
|                                 | (-) 12h                             | 12h    | (-) 24h | 24h    | (-) 12h              | 12h    | (-) 24h            | 24h     |
| 1                               | 461,4                               | 418,2  | 393,4   | 477,8  | 9228                 | 8364   | 7868               | 9556    |
| 2                               | 384,1                               | 446,5  | 334,9   | 468,4  | 7682                 | 8930   | 6698               | 9368    |
| 3                               | 367,6                               | 423,8  | 488,5   | 395,4  | 7352                 | 8476   | 9770               | 7908    |
| 4                               | 400,2                               | 431,5  | 336,3   | 417,3  | 8004                 | 8630   | 6726               | 8346    |
| 5                               | 426,2                               | 360,4  | 322,5   | 454,5  | 8524                 | 7208   | 6450               | 9090    |
| 6                               | 404,4                               | 433,9  | 434,6   | 433,4  | 8088                 | 8678   | 8692               | 8668    |
| 7                               | 397,6                               | 439,6  | 365,4   | 399,4  | 7952                 | 8792   | 7308               | 7988    |
| 8                               | 401,4                               | 425,8  | 430,2   | 448    | 8028                 | 8516   | 8604               | 8960    |
| 9                               | 391                                 | 445,1  | 351,4   | 461,6  | 7820                 | 8902   | 7028               | 9232    |
| 10                              | 438,2                               | 435,9  | 372,3   | 451,7  | 8764                 | 8718   | 7446               | 9034    |
| 11                              | 385,8                               | 395,2  | 388,1   | 425,2  | 7716                 | 7904   | 7762               | 8504    |
| 12                              | 422,5                               | 443,7  | 405,8   | 450,9  | 8450                 | 8874   | 8116               | 9018    |
| 13                              | 392,6                               | 398,4  | 421,6   | 397,1  | 7852                 | 7968   | 8432               | 7942    |
| 14                              | 420,4                               | 385,9  | 359,1   | 461,5  | 8408                 | 7718   | 7182               | 9230    |
| 15                              | 415,7                               | 402,3  | 375,3   | 476,2  | 8314                 | 8046   | 7506               | 9524    |
| <b>Média</b>                    | 407,27                              | 419,08 | 385,29  | 441,22 | 8145,46              | 8381,6 | 7705,86            | 8824,53 |
| <b>DP</b>                       | 23,84                               | 25,36  | 44,95   | 28,33  | 476,83               | 507,22 | 899,10             | 566,64  |
| <b>Significância</b>            |                                     |        |         |        | <b>p &gt; 0,05</b>   |        | <b>p &gt; 0,05</b> |         |

Nota: teste ANOVA; (p > 0,05) não significativo ao nível de 5%

Tabela 5: Valores, média e desvio padrão da incorporação de  $[^3\text{H}]$  timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 5 kPa.

| Côndilo mandibular - Síntese de DNA (5 kPa) |                                 |         |         |         |                      |          |                    |          |
|---|---------------------------------|---------|---------|---------|----------------------|----------|--------------------|----------|
| Amostra                                     | $[^3\text{H}]$ timidina (H-CPM) |         |         |         | Fórmula (1800 / 300) |          |                    |          |
|   | (-) 12h                         | 12h     | (-) 24h | 24h     | (-) 12h              | 12h      | (-) 24h            | 24h      |
| 1   | 47394                           | 55250   | 29298   | 30609   | 284364               | 331500   | 175788             | 183654   |
| 2   | 43278                           | 55100   | 27675   | 30003   | 259668               | 330600   | 166050             | 180018   |
| 3   | 41332                           | 58736   | 29127   | 30006   | 247992               | 352416   | 174762             | 180036   |
| 4   | 41666                           | 57988   | 27849   | 31587   | 249996               | 347928   | 167094             | 189522   |
| 5   | 27516                           | 54992   | 33642   | 53871   | 165096               | 329952   | 201852             | 323226   |
| 6   | 26936                           | 59932   | 30876   | 53124   | 161616               | 359592   | 185256             | 318744   |
| 7   | 27032                           | 58028   | 31758   | 24813   | 162192               | 348168   | 190548             | 148878   |
| 8   | 28596                           | 50254   | 33498   | 24858   | 171576               | 301524   | 200988             | 149148   |
| 9   | 36974                           | 52308   | 29592   | 25119   | 221844               | 313848   | 177552             | 150714   |
| 10  | 32027                           | 53930   | 28900   | 31957   | 192162               | 323580   | 173400             | 191742   |
| 11  | 32421                           | 58026   | 28051   | 40696   | 194526               | 348156   | 168306             | 244176   |
| 12  | 41194                           | 57018   | 30139   | 33428   | 247164               | 342108   | 180834             | 200568   |
| 13  | 33710                           | 58204   | 32150   | 30791   | 202260               | 349224   | 192900             | 184746   |
| 14  | 41150                           | 55972   | 33194   | 33819   | 246900               | 335832   | 199164             | 202914   |
| 15  | 33280                           | 52059   | 29805   | 31920   | 199680               | 312354   | 178830             | 191520   |
| <b>Média</b>                                | 35633,7                         | 55853,1 | 30370,2 | 33773,4 | 213802,4             | 335118,8 | 182221,6           | 202640,4 |
| <b>DP</b>                                   | 6688,8                          | 2797,1  | 2046,6  | 8943,9  | 40133,3              | 16783,1  | 12280,1            | 53663,4  |
| <b>Significância</b>                        |                                 |         |         |         | <b>p &lt; 0,01**</b> |          | <b>p &gt; 0,05</b> |          |

Nota: teste ANOVA; (\*\*) Significativo ao nível de 1%; (p > 0,05) não significativo ao nível de 5%

Tabela 6: Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 5 kPa.

| Côndilo mandibular - Síntese de PTG (5 kPa) |                                     |        |         |        |                      |         |                     |         |
|---|-------------------------------------|--------|---------|--------|----------------------|---------|---------------------|---------|
| Amostra                                     | [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato (C-DPM) |        |         |        | Fórmula (2000 / 100) |         |                     |         |
|   | (-) 12h                             | 12h    | (-) 24h | 24h    | (-) 12h              | 12h     | (-) 24h             | 24h     |
| 1   | 250,1                               | 428,8  | 242,5   | 345,1  | 5002                 | 8576    | 4850                | 6902    |
| 2   | 253,1                               | 345,4  | 314     | 352,2  | 5062                 | 6908    | 6280                | 7044    |
| 3   | 362,9                               | 420,1  | 319,4   | 373,1  | 7258                 | 8402    | 6388                | 7462    |
| 4   | 331,7                               | 387,3  | 333,9   | 427,8  | 6634                 | 7746    | 6678                | 8556    |
| 5   | 352,7                               | 335,7  | 328,2   | 345,4  | 7054                 | 6714    | 6564                | 6908    |
| 6   | 268,8                               | 407,4  | 351     | 362,5  | 5376                 | 8148    | 7020                | 7250    |
| 7   | 295,7                               | 383,4  | 332,9   | 396,6  | 5914                 | 7668    | 6658                | 7932    |
| 8   | 302,9                               | 408,2  | 298,9   | 315,9  | 6058                 | 8164    | 5978                | 6318    |
| 9   | 300,1                               | 445,9  | 325,4   | 343,4  | 6002                 | 8918    | 6508                | 6868    |
| 10  | 270,3                               | 400,6  | 299,9   | 339,1  | 5406                 | 8012    | 5998                | 6782    |
| 11  | 331,2                               | 376,1  | 293,3   | 402,5  | 6624                 | 7522    | 5866                | 8050    |
| 12  | 289,8                               | 428,1  | 345,4   | 391    | 5796                 | 8562    | 6908                | 7820    |
| 13  | 321,9                               | 370    | 289,1   | 330,2  | 6438                 | 7400    | 5782                | 6604    |
| 14  | 327,4                               | 404,3  | 350,3   | 320,3  | 6548                 | 8086    | 7006                | 6406    |
| 15  | 289,6                               | 396,1  | 297,2   | 389,6  | 5792                 | 7922    | 5944                | 7792    |
| <b>Média</b>                                | 303,21                              | 395,82 | 314,76  | 362,31 | 6064,26              | 7916,53 | 6295,2              | 7246,26 |
| <b>DP</b>                                   | 34,40                               | 30,52  | 28,84   | 33,05  | 688,09               | 610,58  | 576,88              | 661,05  |
| <b>Significância</b>                        |                                     |        |         |        | <b>p &lt; 0,01**</b> |         | <b>p &lt; 0,05*</b> |         |

Nota: teste ANOVA; (\*) Significativo ao nível de 5%, (\*\*) Significativo ao nível de 1%

Tabela 7: Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 5 kPa.

| Joelho - Síntese de DNA (5 kPa) |                                   |         |         |         |                      |         |                      |         |
|---------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|
| Amostra                         | [ $^3\text{H}$ ] timidina (H-CPM) |         |         |         | Fórmula (1800 / 300) |         |                      |         |
|                                 | (-) 12h                           | 12h     | (-) 24h | 24h     | (-) 12h              | 12h     | (-) 24h              | 24h     |
| 1                               | 31155                             | 41107   | 23870   | 31888   | 186930               | 246642  | 143220               | 191328  |
| 2                               | 32209                             | 39489   | 22832   | 32301   | 193254               | 236934  | 136992               | 193806  |
| 3                               | 33735                             | 41851   | 24020   | 31013   | 202410               | 251106  | 144120               | 186078  |
| 4                               | 33131                             | 41546   | 24560   | 32000   | 198786               | 249276  | 147360               | 192000  |
| 5                               | 29826                             | 44438   | 28258   | 36832   | 178956               | 266628  | 169548               | 220992  |
| 6                               | 28863                             | 42250   | 28413   | 36337   | 173178               | 253500  | 170478               | 218022  |
| 7                               | 30263                             | 44604   | 29521   | 38047   | 181578               | 267624  | 177126               | 228282  |
| 8                               | 31253                             | 43949   | 28734   | 38207   | 187518               | 263694  | 172404               | 229242  |
| 9                               | 32286                             | 40642   | 26803   | 41447   | 193716               | 243852  | 160818               | 248682  |
| 10                              | 32730                             | 39173   | 26301   | 41681   | 196380               | 235038  | 157806               | 250086  |
| 11                              | 32417                             | 39750   | 26351   | 41617   | 194502               | 238500  | 158106               | 249702  |
| 12                              | 32415                             | 42945   | 26438   | 42093   | 194490               | 257670  | 158628               | 252558  |
| 13                              | 29990                             | 40987   | 25319   | 35312   | 179940               | 245922  | 151914               | 211872  |
| 14                              | 32354                             | 42780   | 28301   | 33851   | 194124               | 256680  | 169806               | 203106  |
| 15                              | 32731                             | 41359   | 25410   | 41709   | 196386               | 248154  | 152460               | 250254  |
| <b>Média</b>                    | 31690,5                           | 41791,3 | 26342,0 | 36955,6 | 190143,2             | 250748  | 158052,4             | 221734  |
| <b>DP</b>                       | 1399,3                            | 1713,4  | 2013,5  | 4105,1  | 8395,9               | 10280,4 | 12081,3              | 24630,9 |
| <b>Significância</b>            |                                   |         |         |         | <b>p &lt; 0,01**</b> |         | <b>p &lt; 0,01**</b> |         |

Nota: teste ANOVA; (\*\*) Significativo ao nível de 1%



Tabela 8: Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 5 kPa.

| Joelho - Síntese de PTG (5 kPa) |                                     |        |         |        |                      |          |                      |         |
|---------------------------------|-------------------------------------|--------|---------|--------|----------------------|----------|----------------------|---------|
| Amostra                         | [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato (C-DPM) |        |         |        | Fórmula (2000 / 100) |          |                      |         |
|                                 | (-) 12h                             | 12h    | (-) 24h | 24h    | (-) 12h              | 12h      | (-) 24h              | 24h     |
| 1                               | 366                                 | 551,4  | 217,5   | 678    | 7320                 | 11028    | 4350                 | 13560   |
| 2                               | 405,6                               | 492    | 337,5   | 624,9  | 8112                 | 9840     | 6750                 | 12498   |
| 3                               | 360                                 | 552,6  | 292,2   | 713,4  | 7200                 | 11052    | 5844                 | 14268   |
| 4                               | 410,7                               | 580,5  | 311,7   | 869,1  | 8214                 | 11610    | 6234                 | 17382   |
| 5                               | 340,5                               | 596,1  | 265,5   | 557,1  | 6810                 | 11922    | 5310                 | 11142   |
| 6                               | 363                                 | 780,3  | 337,8   | 616,2  | 7260                 | 15606    | 6756                 | 12324   |
| 7                               | 369,6                               | 587,2  | 340,8   | 618,3  | 7392                 | 11744    | 6816                 | 12366   |
| 8                               | 379,5                               | 561,6  | 363,3   | 779,1  | 7590                 | 11232    | 7266                 | 15582   |
| 9                               | 558,7                               | 604,1  | 389,7   | 759,3  | 11174                | 12082    | 7794                 | 15186   |
| 10                              | 351,9                               | 542    | 411,9   | 662,1  | 7038                 | 10840    | 8238                 | 13242   |
| 11                              | 536,4                               | 601,3  | 293,7   | 744,9  | 10728                | 12026    | 5874                 | 14898   |
| 12                              | 382,8                               | 527,1  | 268,5   | 692,1  | 7656                 | 10542    | 5370                 | 13842   |
| 13                              | 414,5                               | 505,2  | 292,5   | 653,8  | 8290                 | 10104    | 5850                 | 13076   |
| 14                              | 394,1                               | 499,1  | 303,6   | 704,8  | 7882                 | 9982     | 6072                 | 14096   |
| 15                              | 410,9                               | 510,9  | 361,3   | 719,8  | 8218                 | 10218    | 7226                 | 14396   |
| <b>Média</b>                    | 402,94                              | 566,09 | 319,16  | 692,86 | 8058,93              | 11321,86 | 6383,33              | 13857,2 |
| <b>DP</b>                       | 63,12                               | 70,39  | 51,14   | 77,50  | 1262,52              | 1407,86  | 1022,83              | 1550,01 |
| <b>Significância</b>            |                                     |        |         |        | <b>p &lt; 0,01**</b> |          | <b>p &lt; 0,01**</b> |         |

Nota: teste ANOVA; (\*\*) Significativo ao nível de 1%

Tabela 9: Valores, média e desvio padrão da incorporação de  $[^3\text{H}]$  timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 10 kPa.

| Côndilo mandibular - Síntese de DNA (10 kPa) |                                 |         |         |        |                      |          |                      |         |
|--|---------------------------------|---------|---------|--------|----------------------|----------|----------------------|---------|
| Amostra                                      | $[^3\text{H}]$ timidina (H-CPM) |         |         |        | Fórmula (1800 / 300) |          |                      |         |
|  | (-) 12h                         | 12h     | (-) 24h | 24h    | (-) 12h              | 12h      | (-) 24h              | 24h     |
| 1  | 46245                           | 26918   | 43330   | 18870  | 277470               | 161508   | 259980               | 113220  |
| 2  | 46406                           | 27459   | 46850   | 18638  | 278436               | 164754   | 281100               | 111828  |
| 3  | 44890                           | 27127   | 45081   | 21505  | 269340               | 162762   | 270486               | 129030  |
| 4  | 50068                           | 29756   | 50344   | 21031  | 300408               | 178536   | 302064               | 126186  |
| 5  | 50938                           | 29774   | 50884   | 22638  | 305628               | 178644   | 305304               | 135828  |
| 6  | 48689                           | 29097   | 45556   | 24972  | 292134               | 174582   | 273336               | 149832  |
| 7  | 38028                           | 25445   | 48301   | 24608  | 228168               | 152670   | 289806               | 147648  |
| 8  | 34504                           | 26233   | 42429   | 24665  | 207024               | 157398   | 254574               | 147990  |
| 9  | 40598                           | 30284   | 43856   | 31139  | 243588               | 181704   | 263136               | 186834  |
| 10   | 45294                           | 30660   | 50110   | 30674  | 271764               | 183960   | 300660               | 184044  |
| 11   | 39740                           | 29925   | 46935   | 18862  | 238440               | 179550   | 281610               | 113172  |
| 12   | 40275                           | 38990   | 43184   | 18382  | 241650               | 233940   | 259104               | 110292  |
| 13   | 50059                           | 38271   | 43720   | 18074  | 300354               | 229626   | 262320               | 108444  |
| 14   | 43926                           | 24940   | 47910   | 22610  | 263556               | 149640   | 287460               | 135660  |
| 15   | 47750                           | 24192   | 50218   | 24192  | 286500               | 145152   | 301308               | 145152  |
| <b>Média</b>                                 | 44494                           | 29271,4 | 46580,5 | 22724  | 266964               | 175628,4 | 279483,2             | 136344  |
| <b>DP</b>                                    | 4904,7                          | 4319,3  | 2946,4  | 4139,1 | 29428,5              | 25916,2  | 17678,4              | 24834,6 |
| <b>Significância</b>                         |                                 |         |         |        | <b>p &lt; 0,01**</b> |          | <b>p &lt; 0,01**</b> |         |

Nota: teste ANOVA; (\*\*) Significativo ao nível de 1%

Tabela 10: Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 10 kPa.

| Côndilo mandibular - Síntese de PTG (10 kPa) |                                     |        |         |        |                      |         |                      |         |
|--|-------------------------------------|--------|---------|--------|----------------------|---------|----------------------|---------|
| Amostra                                      | [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato (C-DPM) |        |         |        | Fórmula (2000 / 100) |         |                      |         |
|  | (-) 12h                             | 12h    | (-) 24h | 24h    | (-) 12h              | 12h     | (-) 24h              | 24h     |
| 1  | 260,2                               | 203,9  | 298,5   | 269,4  | 5204                 | 4078    | 5970                 | 5388    |
| 2  | 285,6                               | 245,4  | 264     | 244,4  | 5712                 | 4908    | 5280                 | 4888    |
| 3  | 251,9                               | 232,7  | 284     | 275,8  | 5038                 | 4654    | 5680                 | 5516    |
| 4  | 297                                 | 257,9  | 264     | 252,4  | 5940                 | 5158    | 5280                 | 5048    |
| 5  | 257,1                               | 242,1  | 280     | 268,2  | 5142                 | 4842    | 5600                 | 5364    |
| 6  | 241,2                               | 175,6  | 269     | 188,1  | 4824                 | 3512    | 5380                 | 3762    |
| 7  | 255,1                               | 222,9  | 274,2   | 180,1  | 5102                 | 4458    | 5484                 | 3602    |
| 8  | 246,5                               | 153,9  | 294     | 213,4  | 4930                 | 3078    | 5880                 | 4268    |
| 9  | 279,5                               | 164,8  | 330,6   | 172,2  | 5590                 | 3296    | 6612                 | 3444    |
| 10   | 332,7                               | 176,9  | 299,3   | 173,8  | 6654                 | 3538    | 5986                 | 3476    |
| 11   | 261,7                               | 165,3  | 289,1   | 213,9  | 5234                 | 3306    | 5782                 | 4278    |
| 12   | 285,6                               | 198,9  | 290,2   | 215,6  | 5712                 | 3978    | 5804                 | 4312    |
| 13   | 260                                 | 208,4  | 280,5   | 204,9  | 5200                 | 4168    | 5610                 | 4098    |
| 14   | 297                                 | 203,7  | 295     | 199,7  | 5940                 | 4074    | 5900                 | 3994    |
| 15   | 235,9                               | 167,9  | 265,5   | 215,4  | 4718                 | 3358    | 5310                 | 4308    |
| <b>Média</b>                                 | 269,8                               | 201,35 | 285,19  | 219,15 | 5396                 | 4027,06 | 5703,86              | 4383,06 |
| <b>DP</b>                                    | 26,03                               | 33,360 | 17,67   | 35,15  | 520,74               | 667,20  | 353,41               | 703,09  |
| <b>Significância</b>                         |                                     |        |         |        | <b>p &lt; 0,01**</b> |         | <b>p &lt; 0,01**</b> |         |

Nota: teste ANOVA; (\*\*) Significativo ao nível de 1%

Tabela 11: Valores, média e desvio padrão da incorporação de  $[^3\text{H}]$  timidina para avaliação da síntese de DNA produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 10 kPa.

| Joelho - Síntese de DNA (10 kPa) |                                 |         |         |         |                      |         |                     |          |
|----------------------------------|---------------------------------|---------|---------|---------|----------------------|---------|---------------------|----------|
| Amostra                          | $[^3\text{H}]$ timidina (H-CPM) |         |         |         | Fórmula (1800 / 300) |         |                     |          |
|                                  | (-) 12h                         | 12h     | (-) 24h | 24h     | (-) 12h              | 12h     | (-) 24h             | 24h      |
| 1                                | 26448                           | 62265   | 19593   | 31590   | 158688               | 373590  | 117558              | 189540   |
| 2                                | 27834                           | 61644   | 19833   | 29934   | 167004               | 369864  | 118998              | 179604   |
| 3                                | 27558                           | 57207   | 19872   | 32214   | 165348               | 343242  | 119232              | 193284   |
| 4                                | 27945                           | 58323   | 20097   | 31293   | 167670               | 349938  | 120582              | 187758   |
| 5                                | 17661                           | 56343   | 30717   | 30381   | 105966               | 338058  | 184302              | 182286   |
| 6                                | 16851                           | 58269   | 31074   | 31383   | 101106               | 349614  | 186444              | 188298   |
| 7                                | 24718                           | 55221   | 31392   | 30714   | 148308               | 331326  | 188352              | 184284   |
| 8                                | 25918                           | 53418   | 36197   | 30540   | 155508               | 320508  | 217182              | 183240   |
| 9                                | 19972                           | 56819   | 18264   | 28362   | 119832               | 340914  | 109584              | 170172   |
| 10                               | 23347                           | 56821   | 25459   | 28398   | 140082               | 340926  | 152754              | 170388   |
| 11                               | 24692                           | 55921   | 18126   | 29100   | 148152               | 335526  | 108756              | 174600   |
| 12                               | 25194                           | 57012   | 19255   | 28980   | 151164               | 342072  | 115530              | 173880   |
| 13                               | 26210                           | 60443   | 22473   | 30611   | 157260               | 362658  | 134838              | 183666   |
| 14                               | 22332                           | 58162   | 21557   | 28971   | 133992               | 348972  | 129342              | 173826   |
| 15                               | 24048                           | 55912   | 30917   | 31153   | 144288               | 335472  | 185502              | 186918   |
| <b>Média</b>                     | 24048,5                         | 57585,3 | 24321,7 | 30241,6 | 144291,2             | 345512  | 145930,4            | 181449,6 |
| <b>DP</b>                        | 3490,6                          | 2384,4  | 6060,8  | 1223,3  | 20944,1              | 14306,4 | 36364,8             | 7339,9   |
| <b>Significância</b>             |                                 |         |         |         | <b>p &lt; 0,01**</b> |         | <b>p &lt; 0,05*</b> |          |

Nota: teste ANOVA; (\*) Significativo ao nível de 5%, (\*\*) Significativo ao nível de 1%

Tabela 12: Valores, média e desvio padrão da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato para avaliação da síntese de proteoglicanos (PTG) produzida pelos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, referente aos grupos controles (-12 h. e -24 h.) e experimentais (12 h. e 24 h.), durante a aplicação da força de tração de 10 kPa.

| Joelho - Síntese de PTG (10 kPa) |                                     |        |         |        |                      |         |                      |         |
|----------------------------------|-------------------------------------|--------|---------|--------|----------------------|---------|----------------------|---------|
| Amostra                          | [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato (C-DPM) |        |         |        | Fórmula (2000 / 100) |         |                      |         |
|                                  | (-) 12h                             | 12h    | (-) 24h | 24h    | (-) 12h              | 12h     | (-) 24h              | 24h     |
| 1                                | 406                                 | 306,75 | 292     | 302,6  | 8120                 | 6135    | 5840                 | 6052    |
| 2                                | 385,75                              | 320,5  | 326     | 311,75 | 7715                 | 6410    | 6520                 | 6235    |
| 3                                | 349,5                               | 304    | 330     | 531,25 | 6990                 | 6080    | 6600                 | 10625   |
| 4                                | 401,25                              | 379,25 | 253,25  | 565    | 8025                 | 7585    | 5065                 | 11300   |
| 5                                | 387,5                               | 350    | 302,25  | 572,5  | 7750                 | 7000    | 6045                 | 11450   |
| 6                                | 332,25                              | 341,75 | 273,5   | 524    | 6645                 | 6835    | 5470                 | 10480   |
| 7                                | 413,25                              | 477    | 311,75  | 347,25 | 8265                 | 9540    | 6235                 | 6945    |
| 8                                | 379                                 | 468,25 | 374,25  | 371,6  | 7580                 | 9365    | 7485                 | 7432    |
| 9                                | 335,5                               | 504,75 | 375     | 402,8  | 6710                 | 10095   | 7500                 | 8056    |
| 10                               | 357                                 | 499,75 | 326,7   | 389,1  | 7140                 | 9995    | 6534                 | 7782    |
| 11                               | 367,6                               | 398,4  | 348,1   | 381,5  | 7352                 | 7968    | 6962                 | 7630    |
| 12                               | 321,9                               | 371,9  | 295,7   | 450,1  | 6438                 | 7438    | 5914                 | 9002    |
| 13                               | 381,5                               | 422,1  | 305,4   | 551,4  | 7630                 | 8442    | 6108                 | 11028   |
| 14                               | 297,1                               | 372,9  | 315,1   | 489    | 5942                 | 7458    | 6302                 | 9780    |
| 15                               | 401,3                               | 359,5  | 318,6   | 545    | 8026                 | 7190    | 6372                 | 10900   |
| <b>Média</b>                     | 367,76                              | 391,78 | 316,50  | 448,99 | 7355,2               | 7835,73 | 6330,13              | 8979,8  |
| <b>DP</b>                        | 34,48                               | 67,98  | 33,13   | 96,10  | 689,79               | 1359,71 | 662,68               | 1922,01 |
| <b>Significância</b>             |                                     |        |         |        | <b>p &gt; 0,05</b>   |         | <b>p &lt; 0,01**</b> |         |

Nota: teste ANOVA; (\*\*) Significativo ao nível de 1%; (p > 0,05) não significativo ao nível de 5%

Tabela 13: Quantificação e qualificação da densidade óptica dos ácidos nucleicos em duas diferentes coletas de cultura celular.

| Quantificação e Qualificação da Densidade Óptica (DO) |                              |                |       |                |       |
|---|------------------------------|----------------|-------|----------------|-------|
| Tempo de cultura celular (dias)                       | Tipo de tecido cartilaginoso | Coletas        |       |                |       |
|   |                              | 1 <sup>a</sup> |       | 2 <sup>a</sup> |       |
|   |                              | µg / µl        | taxa  | µg / µl        | taxa  |
| 3   | Côndilo                      | 1,49           | 1,519 | 1,34           | 1,534 |
|   | Joelho                       | 1,01           | 1,499 | 1,00           | 1,619 |
| 6   | Côndilo                      | 1,13           | 1,534 | 1,29           | 1,499 |
|   | Joelho                       | 1,35           | 1,501 | 1,36           | 1,593 |
| 9   | Côndilo                      | 1,50           | 1,60  | 1,39           | 1,512 |
|   | Joelho                       | 1,52           | 1,509 | 1,07           | 1,533 |
| 12  | Côndilo                      | 1,49           | 1,511 | 1,05           | 1,494 |
|   | Joelho                       | 1,22           | 1,510 | 1,10           | 1,520 |

Tabela 14: Quantificação da expressão de colágeno tipo II no RNAm dos condrócitos dos tecidos cartilaginosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos e tempo-dependente do cultivo celular.

| Colágeno tipo II  |         |              |            |              |             |   |
|-------------------|---------|--------------|------------|--------------|-------------|---|
| Cartilagem (dias) | Amostra | CT           | CT (G3PDH) | ΔCT          | G3PDH       | $2^{\wedge-((\text{cont}\Delta\text{CT})-\Delta\text{CT})}$ |
| Côndilo (3d)      | 1       | 22,76        | 14,68      | 7,98         | 0,003960779 |   |
|                   | 2       | 22,29        | 14,88      | 7,51         | 0,005486113 |   |
|                   |         | <b>Média</b> | 14,78      | <b>Média</b> | 0,004723446 | 1   |
|                   |         |              |            | <b>DP</b>    | 0,001078574 | 0,228344669   |
| Joelho (3d)       | 1       | 23,92        | 15,66      | 8,32         | 0,003129179 |   |
|                   | 2       | 23,78        | 15,54      | 8,18         | 0,003448059 |   |

|  |              |      |              |             |             |
|--|--------------|------|--------------|-------------|-------------|
|  | <b>Média</b> | 15,6 | <b>Média</b> | 0,003288619 | 0,696232981 |
|  |              |      | <b>DP</b>    | 0,000225482 | 0,047736708 |

(Continua)

(Continuação tabela 14)

|               |   |       |        |        |             |             |
|---------------|---|-------|--------|--------|-------------|-------------|
| Côndilo (6d)  | 1 | 26,17 | 14,78  | 11,24  | 0,00041345  |             |
|               | 2 | 26,04 | 15,08  | 11,11  | 0,000452436 |             |
|               |   | Média | 14,93  | Média  | 0,000432943 | 0,091658234 |
|               |   |       |        | DP     | 2,75671E-05 | 0,005836219 |
| Joelho (6d)   | 1 | 20,3  | 14,4   | 5,77   | 0,018325546 |             |
|               | 2 | 20,34 | 14,66  | 5,81   | 0,017824433 |             |
|               |   | Média | 14,53  | Média  | 0,01807499  | 3,826653156 |
|               |   |       |        | DP     | 0,00035434  | 0,075017353 |
| Côndilo (9d)  | 1 | 32,11 | 15,17  | 16,93  | 8,0087E-06  |             |
|               | 2 | 31,61 | 15,19  | 16,43  | 1,1326E-05  |             |
|               |   | Média | 15,18  | Média  | 9,66736E-06 | 0,002046675 |
|               |   |       |        | DP     | 2,34569E-06 | 0,000496607 |
| Joelho (9d)   | 1 | 22,08 | 15,8   | 6,185  | 0,013744517 |             |
|               | 2 | 21,96 | 15,99  | 6,065  | 0,014936646 |             |
|               |   | Média | 15,895 | Média  | 0,014340581 | 3,036042156 |
|               |   |       |        | DP     | 0,000842962 | 0,178463423 |
| Côndilo (12d) | 1 | 33,82 | 15,33  | 18,335 | 3,02423E-06 |             |
|               | 2 | 34,02 | 15,64  | 18,535 | 2,63275E-06 |             |
|               |   | Média | 15,485 | Média  | 2,82849E-06 | 0,000598819 |
|               |   |       |        | DP     | 2,76822E-07 | 5,86059E-05 |
| Joelho (12d)  | 1 | 22,99 | 16,52  | 6,345  | 0,012301687 |             |
|               | 2 | 23,16 | 16,77  | 6,515  | 0,010934265 |             |
|               |   | Média | 16,645 | Média  | 0,011617976 | 2,459639813 |
|               |   |       |        | DP     | 0,000966914 | 0,204705159 |
| Significância |   |       |        |        |             | p = 0,019*  |

Nota: teste *t* de Student; (\*) Significativo ao nível de 5%

Tabela 15: Quantificação da expressão de agrecanos no RNAm dos condrócitos dos tecidos cartilagosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos e tempo-dependente do cultivo celular.

| Agrecanos         |         |              |            |              |             |   |
|-------------------|---------|--------------|------------|--------------|-------------|---|
| Cartilagem (dias) | Amostra | CT           | CT (G3PDH) | $\Delta$ CT  | G3PDH       | $2^{\Delta - ((\text{cont}\Delta\text{CT}) - \Delta\text{CT})}$ |
| Côndilo (3d)      | 1       | 23,25        | 14,68      | 8,47         | 0,002820174 |   |
|                   | 2       | 23,18        | 14,88      | 8,4          | 0,002960384 |   |
|                   |         | <b>Média</b> | 14,78      | <b>Média</b> | 0,002890279 | 1   |
|                   |         |              |            | <b>DP</b>    | 9,91432E-05 | 0,034302306   |
| Joelho (3d)       | 1       | 25,17        | 15,66      | 9,57         | 0,001315658 |   |
|                   | 2       | 25,34        | 15,54      | 9,74         | 0,001169413 |   |
|                   |         | <b>Média</b> | 15,6       | <b>Média</b> | 0,001242535 | 0,429901496   |
|                   |         |              |            | <b>DP</b>    | 0,000103411 | 0,035778838   |
| Côndilo (6d)      | 1       | 24,74        | 14,78      | 9,81         | 0,001114027 |   |
|                   | 2       | 24,57        | 15,08      | 9,64         | 0,001253346 |   |
|                   |         | <b>Média</b> | 14,93      | <b>Média</b> | 0,001183686 | 0,409540501   |
|                   |         |              |            | <b>DP</b>    | 9,85131E-05 | 0,03408428  |
| Joelho (6d)       | 1       | 22,57        | 14,4       | 8,04         | 0,003799433 |   |
|                   | 2       | 22,33        | 14,66      | 7,8          | 0,004487103 |   |
|                   |         | <b>Média</b> | 14,53      | <b>Média</b> | 0,004143268 | 1,433518382   |
|                   |         |              |            | <b>DP</b>    | 0,000486256 | 0,16823836  |
| Côndilo (9d)      | 1       | 26,99        | 15,17      | 11,81        | 0,000278507 |   |
|                   | 2       | 26,89        | 15,19      | 11,71        | 0,000298496 |   |
|                   |         | <b>Média</b> | 15,18      | <b>Média</b> | 0,000288501 | 0,099817858   |
|                   |         |              |            | <b>DP</b>    | 1,41346E-05 | 0,004890406   |
| Joelho (9d)       | 1       | 22,97        | 15,8       | 7,075        | 0,007416735 |   |
|                   | 2       | 23,55        | 15,99      | 7,655        | 0,004961527 |   |



|  |              |        |              |             |             |
|--|--------------|--------|--------------|-------------|-------------|
|  | <b>Média</b> | 15,895 | <b>Média</b> | 0,006189131 | 2,141361149 |
|  |              |        | <b>DP</b>    | 0,001736094 | 0,600666655 |

(Continua)

(Continuação da tabela 15)

|                  |   |       |        |        |             |             |
|------------------|---|-------|--------|--------|-------------|-------------|
| Côndilo<br>(12d) | 1 | 28,94 | 15,33  | 13,455 | 8,90515E-05 |             |
|                  | 2 | 29,13 | 15,64  | 13,645 | 7,80631E-05 |             |
|                  |   | Média | 15,485 | Média  | 8,35573E-05 | 0,028909772 |
|                  |   |       |        | DP     | 7,77001E-06 | 0,002688324 |
| Joelho (12d)     | 1 | 24    | 16,52  | 7,355  | 0,006108357 |             |
|                  | 2 | 24,07 | 16,77  | 7,425  | 0,005819053 |             |
|                  |   | Média | 16,645 | Média  | 0,005963705 | 2,063366359 |
|                  |   |       |        | DP     | 0,000204569 | 4,01115E-06 |
| Significância    |   |       |        |        |             | p = 0,046*  |

Nota: teste *t* de Student; (\*) Significativo ao nível de 5%

## 5 DISCUSSÃO

A cartilagem articular fornece uma camada resiliente que protege a articulação, distribuindo as forças sobre a superfície óssea e prevenindo danos potenciais que poderiam ser causados por altas concentrações de cargas mecânicas (JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997; LEIPZIG e ATHANASIOU, 2007).

Força mecânica excessiva tem sido relacionada como um dos fatores de degradação da matriz extracelular do tecido cartilaginoso e uma das causas de doenças degenerativas, como a osteoartrite (FUJISAWA *et al.*, 1999; HONDA *et al.*, 2000; OSTENDORF *et al.*, 1995). A compreensão do metabolismo da matriz extracelular dos tecidos cartilagosos, em relação as forças mecânicas, é considerada fundamental para um melhor entendimento desses processos patológicos que acometem as articulações sinoviais. A articulação têmporo-mandibular (ATM) e o joelho são estruturas anatômicas preparadas para resistir às cargas mecânicas externas, devido ao seu mecanismo de absorção de força e dissipação de energia. Entretanto, o comportamento dos condrócitos provenientes dessas diferentes articulações aos picos de forças ainda permanece obscuro. De acordo com a literatura consultada, não existem pesquisas que avaliem, simultaneamente, os efeitos das forças mecânicas de tração sobre os condrócitos dos tecidos cartilagosos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, portanto, este estudo pode ser considerado inédito.

O porco foi eleito o animal modelo para essa pesquisa porque a sua ATM é semelhante anatomicamente a dos seres humanos (BERMEJO, GONZÁLEZ e GONZÁLEZ, 1993), sendo freqüentemente utilizado em outros estudos (BERMEJO, GONZÁLEZ e GONZÁLEZ, 1993; HERRING, 2002; KUBOKI *et al.*, 1997; MARKS *et al.* 1997; ROTH *et al.*, 1997; SUN, LIU e HERRING, 2003; TANAKA E. *et al.*, 2006). Funcionalmente, a ATM suína proporciona movimentos de translação e rotação durante a mastigação como a dos humanos (DRUZINSKY, 1993; LANGENBACH e VAN EIJDEN, 2001; SUN, LIU e HERRING, 2003), porém se diferencia no aspecto da freqüência de mastigação, visto que a do porco é de 2-3 Hz, enquanto que a do ser humano é de aproximadamente 1 Hz (GALLO *et al.*, 2000). A força que incide no pescoço do côndilo suíno durante a mastigação normal parece ser de aproximadamente 0,02% de alongamento (MARKS *et al.*, 1997), enquanto que na ATM

humana foi verificado, *in vitro*, que essa força condilar é de 0,04% de alongamento (THROCKMORTON e DECHOW, 1994). Apesar de existir essas pequenas diferenças entre essas articulações, o porco é considerado um dos melhores modelos de animal para se estudar a ATM (HERRING, 2003; SUN, LIU e HERRING, 2003).

O material e método utilizado para extração e cultura celular, aplicação das forças mecânicas de tração e avaliação da síntese de DNA e proteoglicanos (PTG), através da incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina e [<sup>35</sup>S] sulfato, respectivamente, e utilização dos métodos RT-PCR e PCR em tempo real, foram determinados com base nas pesquisas de Fujisawa *et al.* (1999); Honda *et al.* (2000) e Tanaka N. *et al.* (2005).

Para a avaliação da expressão de colágeno tipo II e de agrecanos no RNAm dos condrocitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, o método escolhido foi o PCR em tempo real, por apresentar diversas vantagens. Essa técnica é rápida de ser realizada e é um dos métodos mais sensíveis e reproduzíveis para quantificar a concentração do alvo do DNA em soluções biológicas. É mais sensível porque os alvos são projetados para funcionar ao máximo da sua eficiência numa ordem de magnitude 5 vezes superior, e mais reproduzíveis porque os dados da quantificação são coletados na fase exponencial do PCR, onde a variabilidade é reduzida. O PCR em tempo real é a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), que inclui um corante fluorescente ou sonda marcadora utilizada para a detecção do DNA amplificado à medida que este está sendo produzido. O corante fluorescente usado nessa pesquisa foi o *SYBR Green*, por ser de baixo custo e bastante sensível.

Nesse estudo, os condrocitos extraídos do côndilo mandibular e do joelho de suínos foram submetidos às forças cíclicas de tração, porque têm sido demonstrado que cargas mecânicas dinâmicas causam menos desgaste da cartilagem (JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997) e estimulam mais a síntese de matriz extracelular do que as forças estáticas (HOLMVALL *et al.*, 1995; LARSSON, ASPDEN e HEINEGARD, 1991). Os estudos de Wang e Mao (2002 a,b) demonstraram que a aplicação de uma pequena carga de estímulo oscilatório não invasivo, em associação com forças cíclicas, foi um estímulo anabólico potente para o crescimento condral e para o aumento do número de células proliferativas (WANG e MAO, 2002 a,b). Esses autores observaram que a média do número de condrocitos na zona proliferativa tratados com forças cíclicas foram significativamente maior ( $1045 \pm 127$ ) do que a dos submetidos às forças estáticas ( $632 \pm 85$ ) e a dos grupos controles ( $632 \pm 60$ ). Além disso, Wu e Chen (2000) verificaram em seu estudo, que forças mecânicas cíclicas foram capazes de estimular não apenas a proliferação dos condrocitos, mas também

promoveram a maturação e a hipertrofia da matriz. O número de condrócitos, quando comparados aos grupos controles, demonstrou um aumento de mais de 30% após 48 h. de estímulo mecânico cíclico. Holmval et al. (1995) também constataram um aumento da síntese de PTG e de colágeno tipo II durante a aplicação de forças cíclicas, mesmo sob a elevada magnitude de carga de 18 kPa (24% de alongamento).

Em relação às magnitudes das forças de tração, as condições determinadas nessa pesquisa foram de 2 kPa (3% de alongamento), 5 kPa (7% de alongamento) e 10 kPa (12% de alongamento), em uma frequência de 30 ciclos/min. com duração e intervalo de 1 seg. cada. Houve a preocupação de estipular forças menores do que 15 kPa e de 23% de alongamento, pois Fujisawa *et al.* (1999) e Honda *et al.* (2000) já haviam demonstrado que essas cargas excessivas causaram diminuição do metabolismo celular, podendo estar relacionada com a degradação da matriz cartilaginosa.

Os valores utilizados para a análise estatística foram aqueles submetidos às fórmulas de [1800/300] para a análise da incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina e a de [2000/100] para a análise da expressão de [<sup>35</sup>S] sulfato. Essas fórmulas foram estabelecidas, pois para a análise da síntese de DNA, 300 µl da amostra foram inoculados em 1800 µl de substância química, assim como para avaliação da síntese de PTG, 100 µl da amostra foram inseridos num total de 2000 µl de solução química.

A partir dos dados contidos nas tabelas 1 à 8 (pág. 49 à 56) e representados nos gráficos 1 (pág. 68) e 2 (pág. 69), pôde-se constatar que as forças mecânicas de tração mais leves, tais como as de 2 kPa (3% alongamento) e 5 kPa (7% alongamento), estimularam a síntese de DNA e de PTG produzidas pelos condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, para ambos os tempos de 12h e 24h. Este estímulo pode ser constatado pelo aumento médio de [<sup>3</sup>H] timidina e de [<sup>35</sup>S] sulfato observado nos grupos experimentais (12 h. e 24 h.) quando comparados aos grupos controles (-12 h. e -24 h.), conforme dados das tabelas 1 à 4 (pág. 49 à 52) para a aplicação de força de tração de 2 kPa e das tabelas 5 à 8 (pág. 53 à 56), para as forças de tração de 5 kPa. Conforme ilustrado no gráfico 1 (pág. 68) foi observado que a força de 2 kPa teve um efeito estatisticamente significativo sobre os condrócitos do côndilo mandibular suíno, provocando um aumento médio de [<sup>3</sup>H] timidina e de [<sup>35</sup>S] sulfato para os tempos de 12 h. ( $p < 0,01$ ) e de 24 h. ( $p < 0,05$ ). Para os condrócitos do joelho suíno submetidos à força de 2 kPa, os incrementos médios de [<sup>3</sup>H] timidina e de [<sup>35</sup>S] sulfato, em ambos os tempos de 12 h. e em 24h, não foram considerados estatisticamente significativos. Portanto, as forças de 2 kPa estimularam a síntese de DNA e de PTG, de forma significativa,

somente para os condrócitos extraídos do côndilo mandibular suíno em relação aos do joelho suíno e conforme ilustrado no gráfico 1 (pág. 68). Estes achados estão de acordo com os encontrados por Wang e Mao (2002 a,b) que também verificaram que forças leves estimularam o metabolismo celular.

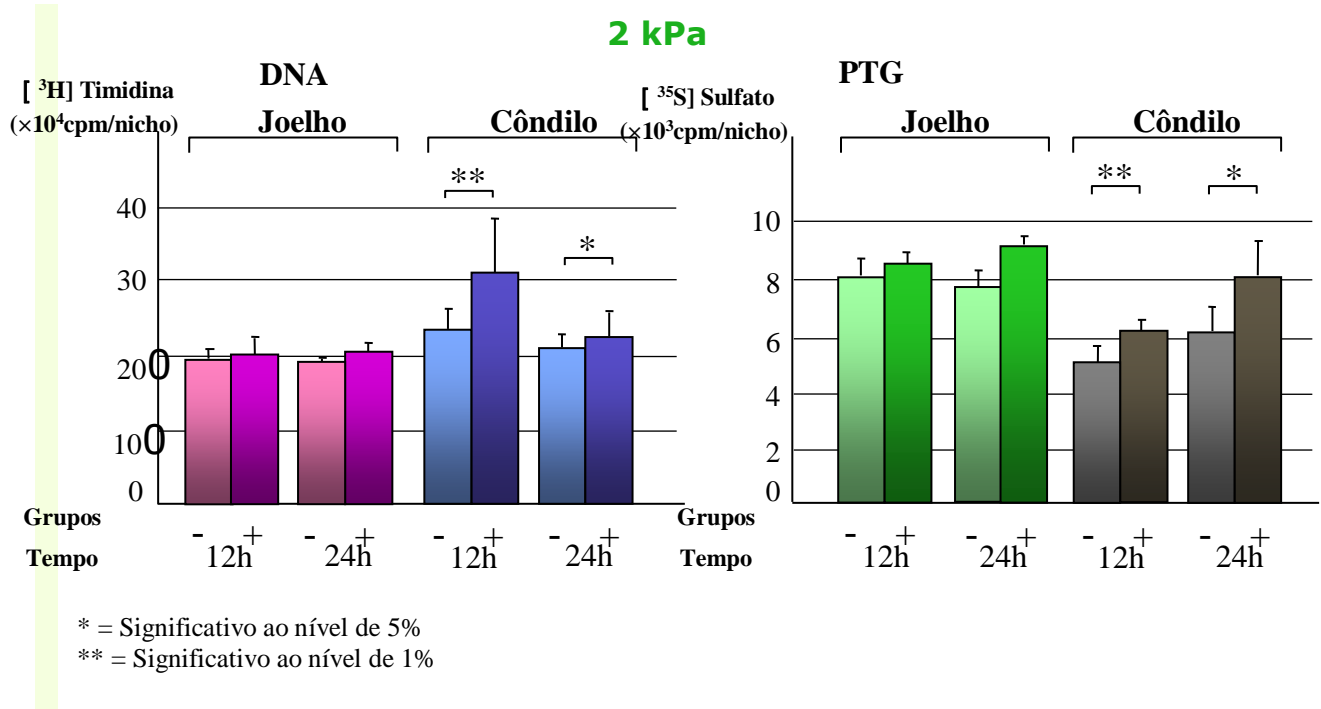


Gráfico 1: Comparação da síntese de DNA e proteoglicanos (PTG) entre os condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, sob força cíclica de tração de 2 kPa (3% de alongamento).

Os dados das tabelas 5 (pág. 53) e 6 (pág. 54) e representados no gráfico 2 (pág. 69), mostram que os condrócitos do côndilo mandibular suíno submetidos a uma carga de tração de 5 kPa, continuaram apresentando um aumento médio estatisticamente significativo de [<sup>3</sup>H] timidina e de [<sup>35</sup>S] sulfato nas primeiras 12 h. ( $p < 0,01$ ), porém durante as 24 h. o aumento de [<sup>3</sup>H] timidina não apresentou mais uma significância estatística ( $p > 0,05$ ). O incremento médio da incorporação de [<sup>35</sup>S] sulfato continuou sendo estatisticamente significativo apenas ao nível de significância de 5% de probabilidade. No entanto, pôde-se notar que a magnitude de carga de 5 kPa teve um grande efeito sobre as células do joelho suíno, gerando um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) da incorporação desses dois marcadores radioativos tanto para 12 h. quanto para 24 h. de estímulo mecânico,

conforme relacionado nas tabelas 7 (pág. 55) e 8 (pág. 56) e representado no gráfico 2 (pág. 69). Apesar das variações na metodologia utilizada, os achados deste presente estudo relacionando leves cargas de estímulo mecânico ao aumento dos marcadores radioativos de [ $^3\text{H}$ ] timidina e de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato, estão de acordo com as observações feitas por De Witt *et al.* (1984) e Wu e Chen (2000).

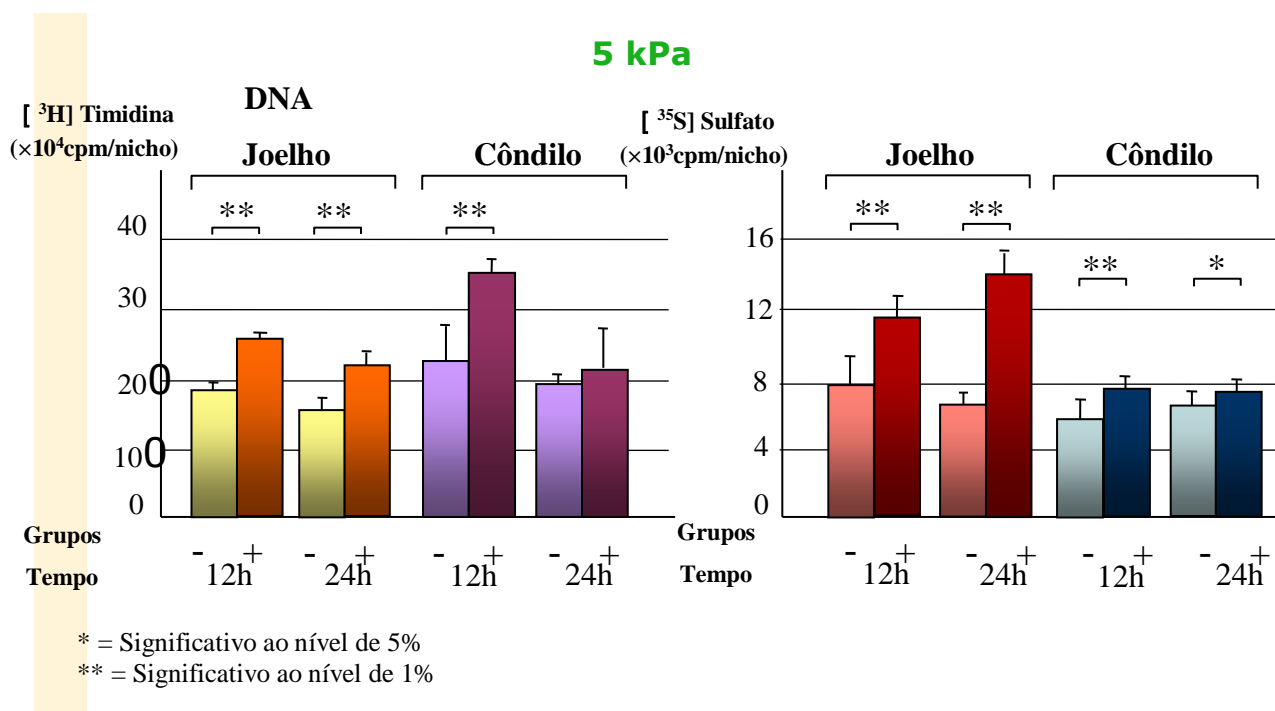


Gráfico 2: Comparação da síntese de DNA e proteoglicanos (PTG) entre os condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, sob força cíclica de tração de 5 kPa (5% de alongamento).

Tendo por base os dados das tabelas 9 (pág. 57) e 10 (pág. 58), foi elaborado o gráfico 3 (pág. 70), no qual pôde-se observar que os condrócitos do côndilo mandibular suíno não mostraram capacidade de resistir a uma maior magnitude de força (10 kPa, 12% de alongamento) apresentando consequentemente, uma inibição estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) das expressões tanto de [ $^3\text{H}$ ] timidina como de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato, para ambos os períodos de estímulo mecânico. Conforme os resultados das tabelas 11 (pág. 59) e 12 (pág. 60) e também representados no gráfico 3 (pág. 70), os condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno quando submetidos a essa mesma magnitude de força, continuaram demonstrando um aumento estatisticamente significativo dos níveis de [ $^3\text{H}$ ] timidina para o

tempo de 12 h. ( $p < 0,01$ ) e para o tempo de 24 h. ( $p < 0,05$ ), e de  $[^{35}\text{S}]$  sulfato para o período de 24 h. ( $p < 0,01$ ). Apesar de o grupo de 12 h. ter demonstrado um aumento da síntese de  $[^{35}\text{S}]$  sulfato, este incremento não foi considerado estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

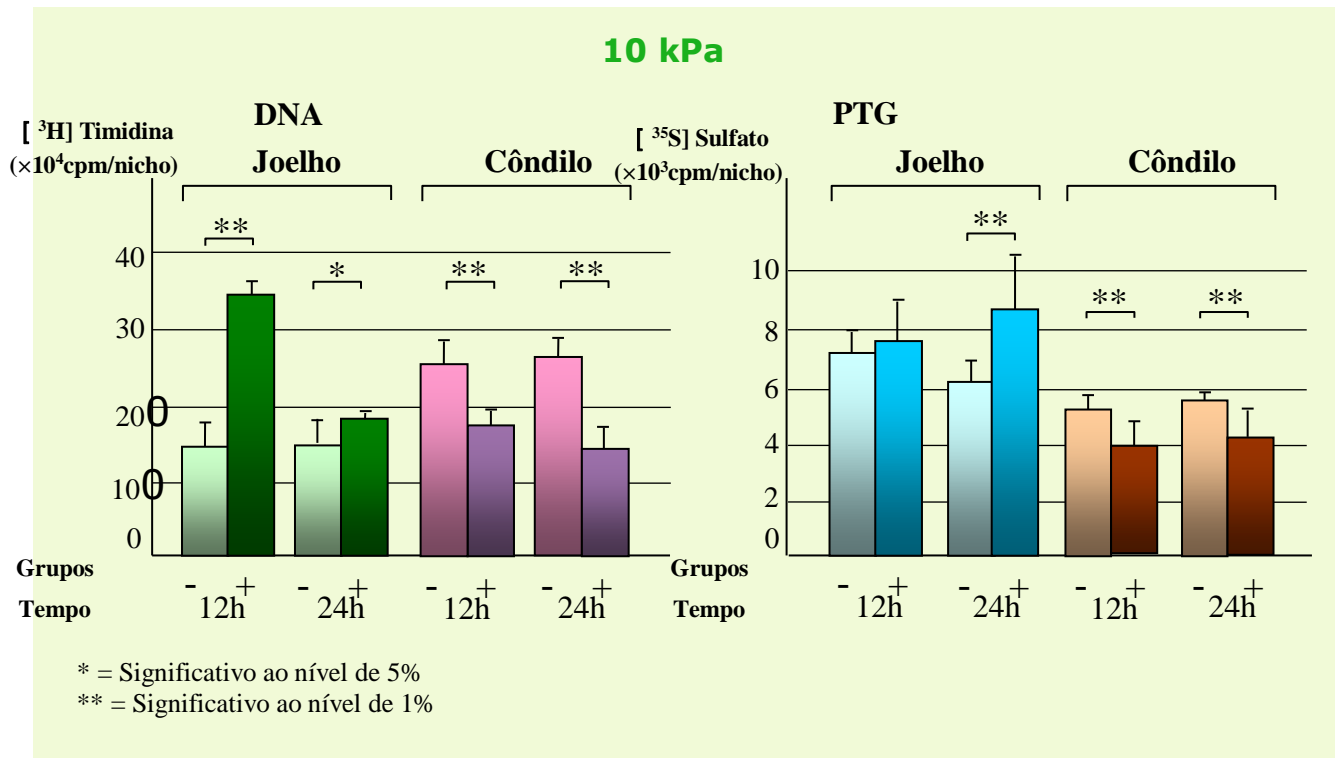


Gráfico 3: Comparação da síntese de DNA e proteoglicanos (PTG) entre os condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos, sob força cíclica de tração de 10 kPa (12% de alongamento).

Portanto, os resultados dessa pesquisa evidenciaram que, exceto para os condrócitos do joelho suíno, forças mecânicas de tração de magnitudes excessivas (10 kPa) ocasionaram um efeito supressivo na síntese de DNA e PTG conforme os dados das tabelas 9 à 12 (pág. 57 à 60); o que está de acordo com outros estudos (DE WITT *et al.*, 1984; FUJISAWA *et al.*, 1999). Ohno *et al.* (2005) mostraram que forças mecânicas cíclicas de 12% de alongamento influenciaram negativamente a diferenciação dos condrócitos e Fukuda *et al.* (1997) revelaram que forças de 10 kPa diminuíram os níveis de PTG produzidos pelos condrócitos, enquanto que forças leves, tais como 2 kPa aumentaram o estímulo de síntese de PTG. De Witt *et al.* (1984) também observaram que houve um aumento da síntese de DNA e de PTG pelos condrócitos quando submetidos à forças de tração de 5,5% de alongamento. No entanto, Homlval *et al.* (1995) reportaram que as forças de 18 kPa (2 seg./ 2 seg.) estimularam a

expressão no RNAm celular de colágeno tipo II e agreganos. A diferença de resultados entre os estudos *in vitro* pode estar relacionada com o tipo de cartilagem utilizada, as condições de ensaio mecânico empregadas e até com processos biológicos de difícil domínio (TORZILLI *et al.*, 1997; DAHLBERG *et al.*, 2000). Portanto, comparar os resultados desse estudo, de forma direta, com os de outras pesquisas se torna complicado devido às diferenças de material e método utilizados, tais como os tipos e magnitudes de força usados, o animal modelo utilizado e regiões anatômicas diferenciadas. Essas variáveis, entrem outras, devem ser consideradas como fatores de influência nos respectivos resultados.

Em relação a produção de matriz extracelular e o período de estímulo mecânico, não foi possível correlacionar esses dois fatores, pois os dados demonstraram uma diversidade de comportamento dos condrócitos de ambas as articulações quando submetidos ao ensaio mecânico durante os tempos de 12 h. e 24 h, conforme pode ser visto nas tabelas 1 à 12 (pág. 49 à 60) e representados nos gráficos 1 ao 3 (pág. 68 à 70). Os grupos experimentais de 24 h. das células do joelho suíno, em comparação aos grupos experimentais de 12 h., apresentaram valores menores da síntese de [ $^3\text{H}$ ] timidina quando submetidas às forças de tração de 5 kPa (12 h. = 250748 / 24 h. = 221734) e de 10 kPa (12 h. = 345512 / 24 h. = 181449,6). Em 2 kPa, o grupo experimental de 24h. (8824,53) apresentou um discreto aumento no nível de [ $^3\text{H}$ ] timidina quando comparado com o grupo experimental de 12h (8381,6). Os condrócitos do joelho suíno apresentaram valores maiores de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato nas unidades submetidas à força mecânica por 24 h. do que nas de 12 h., independente da magnitude de força aplicada (tabelas 4, 8 e 12, pág. 52, 56 e 60 e, gráficos 1 ao 3, pág. 68 à 70). As células do côndilo mandibular suíno, quando submetidas à força de 2 kPa, mostrou que o grupo de 12 h. (314424,8) teve um maior aumento no nível de incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina do que o grupo de 24 h. (227507,4). No entanto, foi observado que para a síntese de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato, o grupo de 24 h. (8165,90) apresentou valores maiores desse marcador do que o grupo submetido ao ensaio mecânico nas primeiras 12 h. (6410,86). Para as células do côndilo mandibular suíno que receberam a força de 5 kPa, os grupos experimentais de 12 h. demonstraram maiores valores de [ $^3\text{H}$ ] timidina (12 h = 335118,8 / 24 h. = 202640,4) e de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato do que os de 24 h. (12 h = 7916,53 / 24 h. = 7246,26). Nas tabelas 9 à 12 (pág. 57 à 60), representados no gráfico 3 (pág. 70), pôde-se observar que o estímulo mecânico de 10 kPa teve maior efeito sobre a produção de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato pelos condrócitos do côndilo suíno quando submetidos ao ensaio mecânico durante as 24 h. (4383,06) do que as primeiras 12 h. (4027,06). Os valores da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina foram maiores no grupo estimulado por 12h. (175628,4) do que nos de 24 h. (136344). Fujisawa *et al.* (1999) também não encontraram correlação entre tempo de estímulo



mecânico e metabolismo celular. Esses autores observaram uma diminuição da incorporação de  $[^{35}\text{S}]$  sulfato, independente do tempo de 24 h. e 48 h. de exposição às forças cíclicas de tração. Bachrach *et al.* (1995) verificaram a síntese de  $[^{35}\text{S}]$  sulfato através da aplicação de forças estáticas de compressão com magnitude de 0,1 MPa, durante 10 min. e 20 h. Concluíram que quando os condrócitos foram submetidos ao ensaio mecânico por 10 min., a incorporação de  $[^{35}\text{S}]$  sulfato apresentou um aumento de 57%, no entanto quando as células foram submetidos à força mecânica por 20 h., o nível de incorporação desse marcador radioativo diminuiu em 48%.

Segundo Fujisawa *et al.* (1999), não apenas a magnitude de força mas também a frequência da carga mecânica afeta a produção de DNA e de PTG. Esses autores concluíram que alta frequência de forças cíclicas de tração (30 ciclos / min., 1 seg. duração / 1 seg. intervalo) produziu um efeito supressivo na síntese de  $[^3\text{H}]$  timidina e  $[^{35}\text{S}]$  sulfato quando comparados com as frequências médias (1 ciclo / 2 min.; 1 seg. duração / 119seg. intervalo) e baixas (1 ciclo / 4 min.; 1 seg. duração / 239 seg. intervalo). No presente estudo foi adotado somente a frequência de 30 ciclos/min. com 1 seg. duração / 1 seg. intervalo, não sendo possível verificar a influência da variação da frequência de força na síntese de DNA e PTG.

Para a realização do RT-PCR e do PCR em tempo real, a quantificação e qualificação da densidade óptica dos ácidos nucleicos (RNA total) foram determinadas previamente, como pode ser observado na tabela 13 (pág. 61).

De acordo com os dados contidos nas tabelas 14 (pág. 61) e 15 (pág. 63) e representados nos gráficos 4 e 5, (pág. 73), foi verificado que existe uma diferença no padrão de metabolismo dos condrócitos das cartilagens do côndilo mandibular e do joelho de suínos.

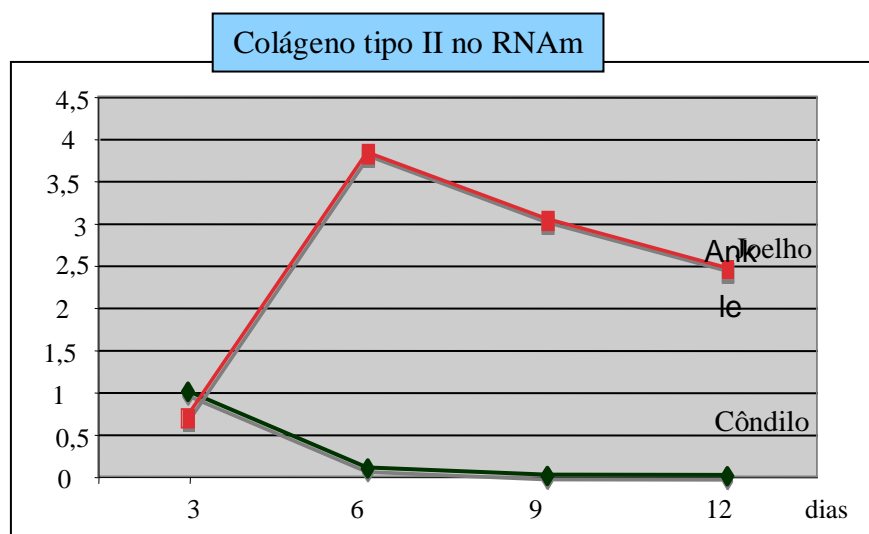


Gráfico 4: Comparação da expressão de colágeno tipo II no RNAm dos condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos.

Os gráficos 4 (pág. 72) e 5 mostram que os condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno demonstraram uma alta expressão de colágeno tipo II e de agrecanos no 3º dia (1,0) de cultivo celular. Porém, foi observado uma diminuição progressiva da expressão dessas duas proteínas no RNAm conforme o processo de diferenciação dos condrócitos. Essa diminuição de expressão de colágeno tipo II foi bastante acentuada, alcançando níveis de 0,09 no 6º dia, 0,002 no 9º dia e finalizando em 0,0005 no dia 12. O gráfico 5, gerado pelos dados da tabela 15 (pág. 63), mostram que os condrócitos do côndilo mandibular suíno apresentaram esse mesmo comportamento para a expressão de agrecanos, onde foi verificado níveis dessa proteína no 3º dia de 1,0, no 6º dia de 0,40, no 9º dia de 0,09 e no 12º dia de 0,02. Em contra-partida e conforme representado nos gráficos 4 (pág. 72) e 5, os condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno demonstraram baixos níveis de expressão de colágeno do tipo II (0,69) e agrecanos (0,42) no início do cultivo celular (3º dia). Na tabela 15 (pág. 63), representado no gráfico 5, pôde-se verificar que houve um aumento da expressão de agrecanos no RNAm conforme o amadurecimento do cultivo celular, onde uma estabilidade de nível foi atingida entre o 9º dia (2,14) e o 12º dia (2,06). Em relação à expressão de colágeno do tipo II (gráfico 4, pág. 72), foi observado que do 3º dia (0,69) ao 6º dia (3,82), houve um grande aumento da expressão dessa proteína, com uma leve queda do 6º dia (3,82) ao 12º dia (2,45) de cultivo celular. É importante ressaltar que os condrócitos do joelho suíno expressaram uma maior quantidade de colágeno tipo II e de agrecanos nos RNAm do que as células do côndilo mandibular suíno, diferença essa estatisticamente significativa ao nível de 5% ( $p < 0,05$ ), conforme os dados das tabelas 14 (pág. 61) e 15 (pág. 63) e representados nos gráficos 4 (pág. 72) e 5.

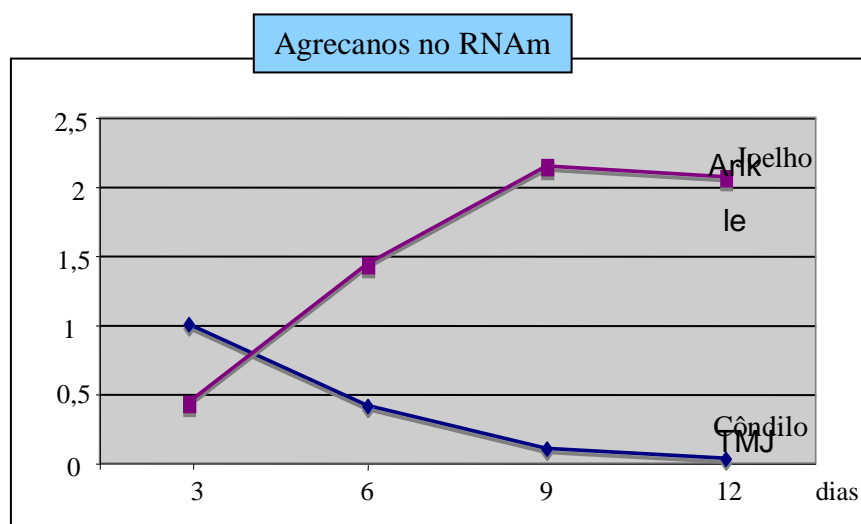


Gráfico 5: Comparação da expressão de agrecanos no RNAm dos condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos.

De acordo com os resultados desse estudo (tabelas 1 à 12, gráficos 1 ao 3), ficou evidente que os condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos demonstraram comportamentos distintos às cargas mecânicas, o que poderia elucidar o processo de destruição e reparo dos tecidos cartilaginosos dessas duas articulações (POOLE *et al.*, 1994). De acordo com Little e Ghosh (1997), Salter, Godolphin e Gourlay (1995), Tanaka, Fujii e Kumagae (1999), como as cartilagens podem apresentar diferentes populações de condrócitos dependendo da região da articulação e do estágio de desenvolvimento, é de se esperar que condrócitos de diferentes articulações também apresentem fenótipos distintos. Portanto, esse fato pode justificar as diferenças de metabolismo entre os condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos. Estudos adicionais sobre as propriedades da matriz extracelular que compõem cada cartilagem articular podem esclarecer esses diferentes mecanismos de resistência às forças mecânicas e elucidar alguns processos degenerativos dos tecidos cartilaginosos.

O côndilo mandibular humano distingue-se das outras cartilagens articulares dos ossos longos por diversos aspectos morfológicos e funcionais (DURKIN, HEELEY e IRVING, 1974). O côndilo mandibular humano apresenta a capacidade de remodelamento e de adaptação durante o período de crescimento (MOSS, 1960; PROFFIT, 2002), fato esse que pode ser utilizado durante o tratamento ortodôntico com a utilização de aparelhos funcionais para alcançar os efeitos desejados em relação ao crescimento mandibular. Roth *et al.* (1997) descreveram que a cartilagem do côndilo mandibular suíno apresenta uma maior quantidade de PTG com um baixo conteúdo de glicosaminoglicanos do que a do joelho suíno, e concluíram que os componentes da sua matriz extracelular parecem se adaptar às necessidades funcionais. A alta capacidade de ligação aquosa da cartilagem do côndilo pode estar relacionada com o processo de regulação do metabolismo, migração, proliferação e diferenciação celular (RUOSLAHTI, 1989). Diferentemente do côndilo mandibular suíno, a cartilagem articular do joelho suíno é composto por uma maior quantidade de glicosaminoglicanos do que conteúdo aquoso. Essa característica estrutural da cartilagem pode estar relacionada com a proteção da articulação do joelho contra uma força excessiva e os possíveis danos causados por ela (KUETTNER e COLE, 2005; TREPPO *et al.*, 2000).

A avaliação da expressão da matriz cartilaginosa entre os condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos revelou que as células do joelho suíno mostraram uma

maior expressão de colágeno tipo II e de agrecanos no RNAm durante a fase de formação de matriz do que os condrócitos do côndilo suíno (Gráficos 4, pág. 72 e 5, pág. 73). De uma maneira geral, foi constatado que, independente das magnitudes de forças aplicadas, as células do joelho suíno (gráficos 1 ao 3, pág. 68 à 70) apresentaram maior síntese de PTG do que as do côndilo suíno. Essas duas observações confirmam a evidência de que a quantidade de matriz extracelular sintetizada pelos condrócitos do joelho suíno é maior do que a produzida pelas células do côndilo mandibular suíno.

O fato de a força de 10 kPa ter reduzido a síntese de DNA e de PTG nos condrócitos do côndilo mandibular suíno (tabelas 9 e 10, pág. 57 e 58, e gráfico 3, pág. 70), essa magnitude de carga pode ser considerada uma força excessiva e inibitória do metabolismo celular. Alguns autores verificaram que forças não balanceadas e/ou excessivas podem causar injúrias às células, alterações no ambiente local (JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997), diminuição do conteúdo aquoso (HONDA *et al.*, 2000), modificações no pH intersticial, aumento da densidade de carga, alteração na bio-síntese (BACHRACH *et al.*, 1995; TORZILLI *et al.*, 1997) e mudanças na morfologia (BEN-ZE'EV, 1991; HONDA *et al.*, 2000; SACHS, 1991) e no citoesqueleto das células (JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997; VAREDI ET AL., 1997; WANG e INGBER, 1994). Essa deformação no citoesqueleto por sua vez, pode estar associada com a regulação do gene de expressão das propriedades da matriz extracelular (VAREDI ET AL., 1997; SACHS, 1991; WATSON, 1991). Essas observações sugerem que forças demasiadas e acima de 15 kPa (FUJISAWA *et al.*, 1999; HONDA *et al.*, 2000) podem causar não apenas deformação na cartilagem articular mas também ocasionar degradação na matriz extracelular (JEFFREY, THOMSON e ASPDEN, 1997). Essa pesquisa não teve como objetivo avaliar o processo e o mecanismo de degradação da matriz extracelular, portanto estudos adicionais são necessários para uma melhor compreensão da tradução dos sinais celulares e, conseqüentemente, do processo de degeneração dos tecidos cartilagosos, como ocorre nos casos da doença osteoartrite.

Foi verificado também, que os condrócitos do côndilo mandibular e do joelho de suínos apresentaram diferentes mecanismos de respostas às forças mecânicas e diferenciado metabolismo celular. Estudos futuros serão de grande valia para esclarecer que as interações entre os condrócitos e a matriz extracelular circundante através dos receptores da superfície celular, em diferentes áreas e estágios de desenvolvimento, parecem estar envolvidos no metabolismo das proteínas da matriz e função da cartilagem (SALTER, GODOLPHIN e GOURLAY, 1995).

## 6 CONCLUSÃO

1. Os condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno quando submetidos à força de tração de 2 kPa apresentaram um aumento da síntese de DNA estatisticamente significante para os tempos de estímulo mecânico de 12 h. ( $p < 0,01$ ) e de 24 h. ( $p < 0,05$ ). Quando aplicados a força mecânica de 5 kPa, os condrócitos do côndilo mandibular suíno também apresentaram um aumento da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina para ambos os períodos de 12 h. e 24 h., sendo estatisticamente significante ao nível de 1% apenas para o período de 12 h. No entanto, quando os condrócitos do côndilo suíno foram submetidos a magnitude de força de tração de 10 kPa, houve uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) da síntese de DNA nos tempos de 12 h. e 24 h. Os condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno apresentaram um aumento da incorporação de [ $^3\text{H}$ ] timidina para todas as magnitudes de força de tração. Para a força de tração de 2 kPa, o aumento da síntese de DNA não foi considerado estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). O aumento da expressão de [ $^3\text{H}$ ] timidina foi estatisticamente significante ao nível de 1% para os grupos de 5 kPa (12 h. e 24 h.) e de 10 kPa (12h.) e estatisticamente significante ao nível de 5% para o grupo de 10 kPa (24 h.).

2. Os condrócitos do tecido cartilaginoso do côndilo mandibular suíno, quando submetidos as magnitudes de forças de tração de 2 kPa e de 5 kPa, apresentaram um aumento estatisticamente significante da síntese de proteoglicanos (PTG) para os períodos de tempo de 12 h. ( $p < 0,01$ ) e de 24 h. ( $p < 0,05$ ). A força de tração de 10 kPa reduziu estatística e significantemente a síntese de PTG produzida pelos condrócitos do côndilo mandibular suíno, em ambos os períodos de 12 h. e 24 h. ( $p < 0,01$ ). Em relação aos condrócitos do tecido cartilaginoso do joelho suíno, as três magnitudes de forças estimularam a incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato em todos os grupos testados. No entanto, o aumento da síntese de PTG quando a força de tração de 2 kPa foi aplicada, não foi considerado estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). As forças de tração de 5 kPa em 12 h. e 24 h., e os de 10 kPa em 24h. estimularam

o aumento da incorporação de [ $^{35}\text{S}$ ] sulfato estatisticamente significativo ao nível de 1% ( $p < 0,01$ ).

3. Os condrócitos das cartilagens do côndilo mandibular e do joelho de suínos apresentaram diferenças no metabolismo celular. Foi verificado que os condrócitos do joelho suíno apresentaram uma maior expressão de colágeno tipo II e de agrecanos do que os condrócitos do côndilo mandibular suíno, diferença essa estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). A expressão de colágeno tipo II e agrecanos nos condrócitos do côndilo mandibular suíno foram altamente evidenciadas na fase inicial e proliferativa de cultivo celular (dia 3) e diminuíram progressivamente durante a fase de formação de matriz extracelular (dia 6 ao dia 12). Contrariamente, os condrócitos do joelho suíno apresentaram um aumento da expressão de agrecanos cronologicamente conforme o amadurecimento do cultivo celular (dia 6 ao dia 12). Já em relação ao colágeno tipo II, as células do joelho suíno apresentaram um aumento expressivo na fase proliferativa (dia 3), seguida de discreta queda durante a fase da matriz celular (dia 6 ao dia 12).

## REFERÊNCIAS

- AYDELOTTE, M.B.; KUETTNER, K.E. Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res*, Philadelphia, v. 18, n. 3, p. 205-222, 1988.
- AYDELOTTE, M.B.; GREENHILL, R.R.; KUETTNER, K.E. Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes 2 proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res*, Philadelphia, v. 18, n. 3, p. 223-234. 1988.
- BACHRACH, N.M.; VALHMU, W.B.; STAZZONE, E.; RATCLIFFE, A.; LAI, W.M.; MOW, V.C. Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment. *J Biomech*, New York, v. 28, n. 12, p. 1561-1569, Dec. 1995.
- BASDRA, E.K.; HUBER, L.A.; KOMPOSCH, G.; PAPAVALASSILIOU, A.G. Mechanical loading triggers specific biochemical responses in mandibular condylar chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam, v. 1222, n. 2, p. 315-322, Jun. 1994.
- BEN-ZE'EV A. Animal cell shape changes and gene expression. *Bio Essays*, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 207-212, May. 1991.
- BERMEJO, A.; GONZÁLEZ, O.; GONZÁLEZ, J.M. The pig as an animal model for experimentation on the temporomandibular articular complex. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, St. Louis, v. 75, n. 1, p. 18-23, Jan. 1993.
- BULLOUGH, P.G.; YAWITZ, P.S.; TAFRA, L.; BOSKEY, A.L. Topographical variations in the morphology and biochemistry of adult canine tibial plateau articular cartilage. *J Orthop Res*, New York, v. 3, n. 1, p. 1-16. 1985.
- BUSCHMANN, M.D.; GLUZBAND, Y.A.; GRODZINSKY, A.J.; HUNZIKER, E.B. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte / agarose culture. *J Cell Sci*, Cambridge, v. 108, n. Pt 4, p. 1497-1508, Apr. 1995.
- CASTAGNOLA, P.; DOZIN, B.; MORO, G.; CANCEDDA, R. Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation in vitro. *J Cell Biol*, New York, v. 106, n. 2, p. 461-467, Feb. 1988.
- CHEN, Q.; JOHNSON, D.M.; HAUDENSCHILD, D.M.; GOETINCK, P.F. Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Dev Biol*, San Diego, v. 172, n. 1, p. 293-306, Nov. 1995.

CHURCHES, A.E.; HOWLETT, C.R. Functional adaptation of bone in response to sinusoidally varying controlled compressive loading of the ovine metacarpus. *Clin Orthop*, Philadelphia, v. 168, p. 265-280, Aug. 1982.

DAHLBERG, L.; BILLINGHURST, R.C.; MANNER, P.; NELSON, F.; WEBB, G.; IONESCU, M.; *et al.* Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). *Arthritis Rheum*, Atlanta, v. 43, n. 3, p. 673-82, Mar. 2000.

DAVIES, P.F.; TRIPATHI, S.C. Mechanical stress mechanisms and the cell: an endothelial paradigm. *Circ Res*, Baltimore, v. 72, n. 2, p. 239-245, Feb. 1993.

DEL SANTO, M. Jr.; MARCHES, F.; NG, M.; HINTON, R.J. Age-associated changes in decorin in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 45, n. 6, p. 485-493, Jun. 2000.

DE WITT, M.T.; HANDLEY, C.J.; OAKES, B.W.; LOWTHER, D.A. *In vitro* response of chondrocytes to mechanical loading. The effect of short term mechanical tension. *Connect Tissue Res*, Philadelphia, v. 12, n. 2, p. 97-109. 1984.

DRUZINSKY, R.E. The time allometry of mammalian chewing movements: chewing frequency scales with body mass in mammals. *J Theor Biol*, Amsterdam, v. 160, n. 4, p. 427-440, Feb. 1993.

DURKIN, J.F.; HEELEY, J.D.; IRVING, J.T. The cartilage of the mandibular condyle. *Oral Sci Rev*, Copenhagen, v. 2, n. 0, p. 29-99. 1973.

EGGLI, P.S.; HUNZIKER, E.B.; SCHENK, R.K. Quantitation of structural features characterizing weight and less weight bearing regions in articular cartilage – a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. *Anat Rec*, New York, v. 222, n. 3, p. 217-27, Nov. 1988.

ELDER, S.H.; KIMURA, J.H.; SOSLOWSKY, L.J.; LAVAGNINO, M.; GOLDSTEIN, S.A. Effects of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb bud cells. *J Orthop Res*, New York, v. 18, n. 1, p. 78-86, Jan. 2000.

EYRE, D.R.; MUIR, H. The distribution of different molecular species of collagen in fibrous elastic and hyaline cartilages of the pig. *Biochem J*, London, v. 151, n. 3, p. 595-602, Dec. 1975.

FARQUHAR, T.; TODHUNTER, R.J.; FUBINI, S.L.; BURTON-WURSTER, N.; LUST, G. Effect of methylprednisolone and mechanical loading on canine articular cartilage in explant culture. *Osteoarthritis Cartilage*, London, v. 4, n. 1, p. 55-62, Mar. 1996.

FRANZEN, A.; INEROT, S.; HEJDERUP, S.O.; HEINEGARD, D. Variations in the composition of bovine hip articular cartilage with distance from the articular surface. *Biochem J*, London, v. 195, n. 3, p. 535-543, Jun. 1981.



FROST, H.M. A chondral modeling theory. *Calcif Tissue Int*, Berlin, v. 28, n. 3, p. 181-200, Nov. 1979.

FROST, H.M. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 3. The hyaline cartilage modeling problem. *Anat. Rec*, New York, v. 226, n. 4, p. 423-432, Apr. 1990.

FUJISAWA, T.; HATTORI, T.; TAKAHASHI, K.; KUBOKI, T.; YAMASHITA, A.; TAKIGAWA, M. Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin-1. *J Biochem*, Tokyo, v. 125, n. 5, p. 966-975, May. 1999

FUKUDA, K.; ASADA, S.; KUMANO, F.; SAITOH, M.; OTANI, K.; TANAKA, S. Cyclic tensile stretch on bovine articular chondrocytes inhibits protein kinase C activity. *J Lab Clin Med*, St. Louis, v. 130, n. 2, p. 209-215, Aug. 1997.

GALLO, L.M.; NICKEL, J.C.; IWASAKI, L.R.; PALLA, S. Stress-field translation in the healthy human temporomandibular joint. *J Dent Res*, Chicago, v. 79, n. 10, p. 1740-1746, Oct. 2000.

GUILAK, F.; MOW, V.C. Determination of the mechanical response of the chondrocyte in situ using confocal microscopy and finite element analysis. *Adv Bioeng*, v. BED22, p. 21-23. 1992.

GRUSHKO, G.; SCHNEIDERMAN, R.; MAROUDAS, A. Some biochemical and biophysical parameters for the study of the pathogenesis of osteoarthritis: a comparison between the processes of ageing and degeneration in human hip cartilage. *Connect Tissue Res*, Philadelphia, v. 19, n. 2-4, p. 149-176. 1989.

HARDINGHAM, T.; BAYLISS, M. Proteoglycans of articular cartilage: changes in aging and in joint disease. *Semin. Arthritis. Rheum*, Philadelphia, v. 20, n. 3 (Suppl. 1), p. 12-33, Dec. 1990.

HASSLER, C.R.; RYBICKI, E.F.; CUMMINGS, K.D.; CLARK, L.C. Quantification of bone stresses during remodeling. *J Biomech*, New York, v. 13, n. 2, p. 185-190. 1980.

HERRING, S.W. TMJ anatomy and animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, Kifissia, v. 3, n. 4, p. 391-394; discussion 406-407, Dec. 2003.

HERT, J.; LISKOVÁ, M.; LANDRGOT, B. Influence of the long-term, continuous bending on the bone. An experimental study on the tibia of the rabbit. *Folia Morphol (Praha)*, Prague, v. 17, n. 4, p. 389-399. 1969.

HOLMVALL, K.; CAMPER, L.; JOHANSSON, S.; KIMURA, J.H.; LUNDGREN-AKERLUND, E. Chondrocyte and chondrosarcoma cell integrins with affinity for collagen type II and their response to mechanical stress. *Exp Cell Res*, Orlando, v. 221, n. 2, p. 496-503, Dec. 1995.

HONDA, K.; OHNO, S.; TANIMOTO, K.; IJUIN, C.; TANAKA, N.; DOI T; *et al.* The effects of high magnitude cyclic tensile load on cartilage matrix metabolism in cultured chondrocytes. *Eur J Cell Biol*, Stuttgart, v. 79, n. 9, p. 601-609, Sept. 2000.

HORTON, W.A.; MACHADO, M.M. Extracellular matrix alterations during endochondral ossification in humans. *J Orthop Res*, Hoboken, v. 6, n. 6, p. 793-803. 1988.

HOWARD, S.; ANASTASSIADES, T. Differential effects of bone associated factors on newly synthesized anionic glycoconjugates by articular chondrocyte cultures from adult and immature bovines. *J Rheumatol*, Toronto, v. 20, n. 12, p. 2083-2094, Dec. 1993.

HU, K.; RADHAKRISHNAN, P.; PATEL, R.V.; MAO, J.J. Regional structural and viscoelastic properties of fibrocartilage upon dynamic nanoindentation of the articular condyle. *J Struct Biol*, San Diego, v. 136, n. 1, p. 46-52, Oct. 2001.

HYNES, R.O. Integrins: versatility modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, Cambridge, v. 69, n. 1, p. 11-25, Apr. 1992.

INOUE, H.; HIASA, K.; SAMMA, Y.; NAKAMURA, O.; SAKUDA, M.; IWAMOTO, M.; *et al.* Stimulation of proteoglycan and DNA syntheses in chondrocytes by centrifugation. *J Dent Res*, Chicago, v. 69, n. 9, p. 1560-1563, Sep. 1990.

JEFFREY, J.E.; THOMSON, L.A.; ASPDEN, R.M. Matrix loss and synthesis following a single impact load on articular cartilage *in vitro*. *Biochim Biophys Acta*, Amsterdam, v. 1334, n. 2-3, p. 223-232. Mar. 1997.

JONES, I.L.; KLÄMFELDT, A.; SANDSTRÖM, T. The effect of continuous mechanical pressure upon the turnover of articular cartilage proteoglycans *in vitro*. *Clin Orthop Relat Res*, Philadelphia, v. 165, p. 283-289, May. 1982.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido cartilaginoso. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. cap. 7, p. 100-107.

KANTOMAA, T.; TUOMINEN, M.; PIRTTINIEMI, P. Effect of mechanical forces on chondrocyte maturation and differentiation in the mandibular condyle of the rat. *J Dent Res*, Chicago, v. 73, n. 6, p. 1150-1156, Jun. 1994.

KIM, Y.J.; SAH, R.L.; GRODZINSKY, A.J.; PLAAS, A.H.; SANDY, J.D. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: physical stimuli. *Arch Biochem Biophys*, New York, v. 311, n. 1, p. 1-12, May. 1994.

KORVER, G.H.V.; VAN DE STADT, R.J.; VAN KAMPEN, G.P.J.; VAN DER KORST, J.K. Composition of proteoglycans synthesized in different layers of cultured anatomically intact articular cartilage. *Matrix*, Stuttgart, v. 10, n. 6, p. 394-401, Dec. 1990.

KORVER, T.H.V.; VAN DE STADT, R.J.; KILJAN, E.; VAN KAMPEN, G.P.J.; VAN DER KORST, J.K. Effects of loading on the synthesis of proteoglycans in different layers of anatomically intact articular cartilage *in vitro*. *J Rheumatol*, Toronto, v. 19, n. 6, p. 905-912, Jun. 1992.

KUBOKI, T.; SHINODA, M.; ORSINI, M.G.; YAMASHITA, A. Viscoelastic properties of the pig temporomandibular joint articular soft tissues of the condyle and disc. *J Dent Res*, Chicago, v. 76, n. 11, p. 1760-1769, Nov. 1997.

KUETTNER, K.E.; COLE, A.A. Cartilage degeneration in different human joints. *Osteoarthritis Cartilage*, London, v. 13, n. 2, p. 93-103, Feb. 2005.

KUETTNER, K.E.; THONAR, E. Cartilage integrity and homeostasis. In: KLIPPEL, J.H.; DIEPPE, A.P. *Rheumatology*. 1 ed. London: Mosby International, 1998. p. 1-16.

LANGENBACH, G.E.J.; VAN EIJDEN, T.M.G.J. Mammalian feeding motor patterns. *Amer Zool*, Chicago, v. 41, n. 6, p. 1338-1351, Jan. 2001.

LANYON, L.E.; RUBIN, C.T. Static vs dynamic loads as an influence on bone remodeling. *J Biomech*, New York, v. 17, n. 12, p. 897-905. 1984.

LARSSON, T.; ASPDEN, R.M.; HEINEGARD, D. Effects of mechanical load on cartilage matrix biosynthesis in vitro. *Matrix*, Stuttgart, v. 11, n. 6, p. 388-394, Dec. 1991.

LEIPZIG, N.D.; ATHANASIOU, K. Static compression of single chondrocytes catabolically modifies single cell gene expression. *Biophys J*. [periódico na Internet]. 2007 Dec [acesso em 2007 Dec 7]; Disponível em: <http://dx.doi:10.1529/biophysj.107.114207>

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Principles of Biochemistry*. 4 ed. New York: Freeman, 2004. 1100p.

LITTLE, C.B.; GHOSH, P. Variation in proteoglycan metabolism by articular chondrocytes in different joint regions is determined by post-natal mechanical loading. *Osteoarthritis Cartilage*, London, v. 5, n. 1, p. 49-62, Jan. 1997.

LOESER, R.F. Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix proteins. *Arthritis Rheum*, New York, v. 36, n. 8, p. 1103-1110, Aug. 1993.

MAO, J.J.; RAHEMTULLA, F.; SCOTT, P.G. Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. *J Dent Res*, Chicago, v. 77, n. 7, p. 1520-1528, Jul. 1998.

MARKS, L.; TENG, S.; ARTUN, J.; HERRING, S. Reaction strains on the condylar neck during mastication and maximum muscle stimulation in different condylar positions: an experimental study in the miniature pig. *J Dent Res*, Chicago, v. 76, n. 7, p. 1412-1420, Jul. 1997.

MCDONALD, F.; YETTRAM, A.L.; MACLEOD, K. The response of bone to external loading regimens. *Med Eng Phys*, Oxford, v. 16, n. 5, p. 384-397, Sept. 1994

MEADE, J.B.; COWIN, S.C.; KLAWITTER, J.J.; VAN BUSKIRK, W.C.; SKINNER, H.B. Bone remodeling due to continuously applied loads. *Calcif Tissue Int*, New York, v. 36, n. 1, p. S25-S30. 1984.

MÖRGELIN, M.; PAULSSON, M.; HARDINGHAM, T.E.; HEINEGÅRD, D.; ENGEL, J. Cartilage proteoglycans: assembly with hyaluronate and link protein as studied by electron microscopy. *Biochem J*, London, v. 253, n. 1, p. 175-185, Jul. 1988.

MOSS ML. Functional analysis of human mandibular growth. *J Prosthet Dent*, St. Louis, v. 10, n. 6, p.1149–1153, Nov.-Dec. 1960.

MOW, V.C.; BACHRACH, N.M.; SETTON, L.A.; GUILAK, F. Stress, strain, pressure and flow fields in articular cartilage and chondrocytes. In: *Cell mechanics and cellular engineering*. 1 ed. New York: Springer, 1994. p. 345-379.

MURATA, K.; YOKOYAMA, Y. Dermatan sulfate isomers in human articular cartilage characterized by high-performance liquid chromatography. *Biochem Int*, Sydney, v. 15, n. 1, p. 87-94, Jul. 1987.

OHASHI, N.; ROBLING, A.G.; BURR, D.B.; TURNER, C.H. The effects of dynamic axial loading on the rat growth plate. *J Bone Miner Res*, Washington DC, v. 17, n. 2, p. 284-292, Feb. 2002.

OHNO, S.; TANAKA, N.; UEKI, M.; HONDA, K.; TANIMOTO, K.; YONENO, K.; et al. Mechanical regulation of terminal chondrocyte differentiation via RGD-CAP/beta ig-h3 induced by TGF-beta. *Connect Tissue Res*, Philadelphia, v. 46, n. 4-5, p. 227-234. 2005.

OSTENDORF, R.H.; DE KONING, M.H.M.T.; VAN DE STADT, R.J.; VAN KAMPEN, G.P.J. Cyclic loading is harmful to articular cartilage from which proteoglycans have been partially depleted by retinoic acid. *Osteoarthritis Cartilage*, London, v. 3, n. 4, p. 275-284, Dec. 1995.

PALMOSKI, M.J.; BRANDT, K.D. Effects of static and cyclic compressive loading on articular cartilage plugs *in vitro*. *Arthritis Rheum*, New York, v. 27, n. 6, p. 675-681, Jun. 1984.

PALMOSKI, M.J.; COLYER, R.A.; BRANDT, K.D. Joint motion in the absence of normal loading does not maintain normal articular cartilage. *Arthritis Rheum*, New York, v. 23, n. 3, p. 325-334, Mar. 1980.

PALMOSKI, M.J.; PERRICONE, E.; BRANDT, K.D. Development and reversal of a proteoglycan aggregation defect in normal canine knee cartilage after immobilization. *Arthritis Rheum*, New York, v. 22, n. 5, p. 508-517, May. 1979.

PARKKINEN, J.J.; LAMMI, M.J.; HELMINEN, H.J.; TAMMI, M. Local stimulation of proteoglycan synthesis in articular cartilage explants by dynamic compression *in vitro*. *J Orthop Res*, Hoboken, v. 10, n. 5, p. 610-620, Sep. 1992.

PÉRIN, J.P.; BONNET, F.; THURIEAU, C.; JOLLÈS, P. Link protein interaction with hyaluronate and proteoglycans. Characterization of two distinct domains in bovine cartilage link proteins. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 262, n. 27, p. 13269-13272, Sept. 1987.

POLLARD, T.D.; EARNSHAW, W.C. *Cell Biology*. 1 ed. Philadelphia: Saunders, 2004. 813p.

POOLE, A.R.; IONESCU, M.; SWAN, A.; DIEPPE, P.A. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J Clin Invest*, Ann Arbor, v. 94, n. 1, p. 25-33, Jul. 1994.

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

PORTER, R.W. The effect of tension across a growing epiphysis. *J Bone Joint Surg Am*, London, v. 60-B, n. 2, p. 252-255, May. 1978.

PROFFIT, W.R. A má oclusão e a deformação dentofacial na sociedade contemporânea. In: *Ortodontia contemporânea*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 1, p. 2-20.

RAAB-CULLEN, D.M.; AKHTER, M.P.; KIMMERL, D.B.; RECKER, R.R. Periosteal bone formation stimulated by externally induced bending strains. *J Bone Miner Res*, New York, v. 9, n. 8, p. 1143-1152, Aug. 1994.

ROBLING, A.G.; DUIJVELLAR, K.M.; GEEVERS, J.V.; OHASHI, N.; TURNER, C.H. Modulation of longitudinal and appositional bone growth in the rat ulna by applied mechanical force. *Bone*, New York, v. 29, n. 2, p. 105-113, Aug. 2001.

ROTH, S.; MULLER, K.; FISCHER, D.C.; DANNHAUER, K.H. Specific properties of the extracellular chondroitin sulphate proteoglycans in the mandibular condylar growth centre in pigs. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 42, n. 1, p. 63-76, Jan. 1997.

RUBIN, C.T.; LANYON, L.E. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone J Surg Am*, Boston, v. 66, n. 3, p. 397-402, Mar. 1984.

RUOSLAHTI, E. Proteoglycans in cell regulation. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 264, n. 23, p. 13369-13372, Aug. 1989.

SACHS, F. Mechanical transduction by membrane ion channels: a mini review. *Mol Cell Biochem*, Hague, v. 104, n. 1-2, p. 57-60, May. 1991.

SALTER, D.M.; GODOLPHIN, J.L.; GOURLAY, M.S. Chondrocyte heterogeneity: immunohistologically defined variation of integrin expression at different sites in human fetal knees. *J Histochem Cytochem*, New York, v. 43, n. 4, p. 447-457, Apr. 1995.

SANDY, J.D.; BROWN, H.L.G.; LOWTHER, D.A. Control of proteoglycan synthesis. Studies on the activation of synthesis observed during culture of articular cartilages. *Biochem J*, London, v. 188, n. 1, p. 119-130, Apr. 1980.

SCHMID, T.M.; LINSSENMAYER, T.F. A short chain (pro)collagen from aged endochondral chondrocytes: biochemical characterization. *J Biol Chem*, Baltimore, v. 258, n. 15, p. 9504-9509, Aug. 1983.

SCHNEIDERMAN, R.; KERET, D.; MAROUDAS, A. Effects of mechanical and osmotic-pressure on the rate of glycosaminoglycan synthesis in the human adult femoral head cartilage: an in vitro study. *J Orthop Res*, New York, v. 4, n. 4, p. 393-408. 1986.

SHIBATA, S.; FUKADA, K.; SUZUKI, S.; OGAWA, T.; YAMASHITA, Y. Histochemical localization of versican, aggrecan and hyaluronan in the developing condylar cartilage of the fetal rat mandible. *J Anat*, Oxford, v. 198, n. Pt 2, p. 129-135, Feb. 2001.

SICZKOWSKI, M.; WATT, F.M. Subpopulations of chondrocytes from different zones of pig articular cartilage – isolation, growth and proteoglycan synthesis in culture. *J Cell Sci*, London, v. 97, n. Pt 2, p. 349-360, Oct. 1990.

SLOWMAN, S.D.; BRANDT, K.D. Composition and glycosaminoglycan metabolism of articular cartilage from habitually loaded and habitually unloaded sites. *Arthritis Rheum*, v. 29, n. 1, p. 88-94, Jan. 1986.

SMITH, R.L.; RUSK, S.F.; ELLISON, B.E.; WESSELLS, P.; TSUCHIYA, K.; CARTER, D.R.; *et al.* In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure. *J Orthop Res*, New York, v. 14, n. 1, p. 53-60, Jan. 1997.

STEGENGA, B.; DE BONT, L.G.; BOERING, G.; VAN WILLIGEN, J.D. Tissue responses to degenerative changes in the temporomandibular joint: a review. *J Oral Maxillofac Surg*, Philadelphia, v. 49, n. 10, p. 1079-1088, Oct. 1991.

STEINMEYER, J.; TORZILLI, P.A.; BURTON-WURSTER, N.; LUST, G. A new pressure chamber to study the biosynthetic response of articular cartilage to mechanical loading. *Res. Exp. Med*, Berlin, v.193, n. 3, p. 137-142. 1993.

STOCKWELL, R.A. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat*, Oxford, v. 109, n. Pt 3, p. 411-421, Sep. 1971.

SUN, Z.; LIU, Z.J.; HERRING, S.W. Movement of temporomandibular joint tissues during mastication and passive manipulation in miniature pigs. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 47, n. 4, p. 293-305, Apr. 2002.

TAKAHASHI, I.; NUCKOLLS, G.H.; TAKAHASHI, K.; TANAKA, O.; SEMBA, I.; DASHNER, R.; *et al.* Compressive force promotes sox9, type II collagen and aggrecan and inhibits IL-1beta expression resulting in chondrogenesis in mouse embryonic limb bud mesenchymal cells. *J Cell Sci*, London, v. 111, n. Pt 14, p. 2067-2076, Jul. 1998.

TANAKA, E.; YAMANO, E.; DALLA-BONA, D.A.; WATANABE, M.; INUBUSHI, T.; SHIRAKURA, M.; *et al.* Dynamic compressive properties of the mandibular condylar cartilage. *J Dent Res*, Chicago, v. 85, n. 6, p. 571-575, Jun. 2006.

TANAKA, T.; FUJII, K.; KUMAGAE, Y. Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, Heidelberg, v. 7, n. 2, p. 75-80. 1999.

TANAKA, N.; OHNO, S.; HONDA, K.; TANIMOTO, K.; DOI, T.; OHNO-NAKAHARA, M.; *et al.* Cyclic mechanical strain regulates the PTHrP expression in cultured chondrocytes via activation of the Ca<sup>2+</sup> channel. *J Dent Res*, Chicago, v. 84, n. 1, p. 64-68, Jan. 2005.

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*, Tokyo, v. 21, n. 5, p. 276-286. 2003.

THROCKMORTON, G.S.; DECHOW, P.C. In vitro strain measurements in the condylar process of the human mandible. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 39, n. 10, p. 853-867, Oct. 1994.

TORZILLI, P.A.; GRIGIENE, R.; HUANG, C.; FRIEDMAN, S.M.; DOTY, S.B.; BOSKEY, A.L.; *et al.* Characterization of cartilage metabolic response to static and dynamic stress using a mechanical explant test system. *J Biomech*, New York, v. 30, n. 1, p. 1-9, Jan. 1997.

TREPPPO, S.; KOEPP, H.; QUAN, E.C.; COLE, A.A.; KUETTNER, K.E.; GRODZINSKY, A.J. Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs. *J Orthop Res*, New York, v. 18, n. 5, p. 739-748, Sep. 2000.

TURNER, C.H. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone*, New York, v. 23, n. 5, p. 399-407, Nov. 1998.

TURNER, C.H.; OWAN, I.; TAKANO, Y. Mechanotransduction in bone: Role of strain rate. *Am J Physiol*, Washington, v. 269, n. 3 Pt 1, p. E438-E442, Sep. 1995.

URBAN, J.P. The chondrocytes: a cell under pressure. *Br J Rheumatol*, London, v. 33, n. 10, p. 901-8, Oct. 1994.

VAREDI, M.; GHAAHARY, A.; SCOTT, P.G.; TREDGET, E.E. Cytoskeleton regulates expression of genes for transforming growth factor-beta 1 and extracellular matrix proteins in dermal fibroblasts. *J Cell Physiol*, New York, v. 172, n. 2, p. 192-199, Aug. 1997.

VIGNON, E.; ARLOT, M.; PATRICOT, L.M.; VIGNON, G. The cell density of human femoral head cartilage. *Clin Orthop Related Res*, Philadelphia v. 121, p. 303-308, Nov-Dec. 1976.

VINGARD, E. Sport and the development of osteoarthritis of the hip [editorial]. *Sports Med*, Auckland, v. 18, n. 1, p. 1-3, Jul. 1994.

VINGARD, E.; ALFREDSSON, L.; MALCHAU, H. Osteoarthritis of the hip in women and its relation to physical load at work and in the home. *Ann Rheum Dis*, London, v. 56, n. 5, p. 293-298, May. 1997a.

VINGARD, E.; ALFREDSSON, L.; MALCHAU, H. Osteoarthritis of the hip in women and its relationship to physical load from sports activities. *Am J Sports Med*, Baltimore, v. 26, n. 1, p. 78-82, Jan.-Feb. 1998b.

WANG, N.; BUTLER, J.P.; INGBER, D.E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, New York, v. 260, n. 5111, p. 1124-1127, May. 1993.

WANG, N.; INGBER, D.E. Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension. *Biophys J*, New York, v. 66, n. 6, p. 2181-2189, Jun. 1994.

WANG, X.; MAO, J.J. Accelerated chondrogenesis of the rabbit cranial base growth plate by oscillatory mechanical stimuli. *J Bone Miner Res*, Washington DC, v. 17, n. 10, p. 1843-1850, Oct. 2002a.

WANG, X.; MAO, J.J. Chondrocyte proliferation of the cranial base cartilage upon in vivo mechanical stresses. *J Dent Res*, Chicago, v. 81, n. 10, p. 701-705, Oct. 2002b.

WATSON, P.A. Function follows form: generation of intracellular signals by cell deformation. *FASEB J*, Bethesda, v. 5, n. 7, p. 2013-2019, Apr. 1991.

WILSON-MACDONALD, J.; HOUGHTON, G.R. The relationship between periosteal division and compression or distraction of the growth plate. *J Bone Joint Surg Am*, London, v. 72, n. 2, p. 303-308, Mar. 1990.

WU, Q.Q.; CHEN, Q. Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals. *Exp. Cell Res*, New York, v. 256, n. 2, p. 383-391, May. 2000.

YANAGISHITA, M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn*, Tokyo, v. 43, n. 6, p. 283-293, Jun. 1993.

ZANETTI, M.; RATCHLIFFE, A.; WATT, F.M. Two subpopulations of differentiated chondrocytes identified with a monoclonal antibody to keratan sulfate. *J Cell Biol*, New York, v. 101, n. 1, p. 53-59, Jul. 1985.



**APÊNDICE A** - Solução padrão de  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -minimum essential medium)

- 500 ml de água destilada
- 5,05 g de pó  $\alpha$ -MEM (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis , USA)
- 1,25 g de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )
- 146 mg de L(+) Glutamina
- 32 unidades/ml (250  $\mu$ l) de penicilina (Meijiseika, Tóquio, Japão)
- 120  $\mu$ g/ml de kanamicin (Meijiseika, Tóquio, Japão)
- 250 ng/ml (500 $\mu$ l) de anfotericin B (ICN Biomedicals Corp., Costa Mesa, USA)