

JOMEL FRANCISCO DOS SANTOS

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E
INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES DESENCADEADORES DA
CONTRATURA ARTICULAR EM OVINOS**

GARANHUNS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

JOMEL FRANCISCO DOS SANTOS

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E
INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES DESENCADEADORES DA
CONTRATURA ARTICULAR EM OVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.
Orientadora: Profa. Dra. Daniela Oliveira

GARANHUNS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E
INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES DESENCADEADORES DA
CONTRATURA ARTICULAR EM OVINOS

Dissertação elaborada por

JOMEL FRANCISCO DOS SANTOS

Aprovada em 03/06/13

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Daniela Oliveira

Presidente da Banca – Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE



Profª. Dra. Márcia Bersane Araújo de Medeiros Torres
Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE



Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior
Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE



Prof. Dr. Otávio Brijhante de Sousa
Universidade Federal de Campina Grande/UFCG

DEDICATÓRIA

A Deus! Pai Eterno que nos dá o dom da vida e nos enche de graça e alegria com a vitória de viver cada dia! A meu Pai Francisco José dos Santos e minha Mãe Maria Cecília da Silva que são tudo pra mim! Tudo na minha vida sempre dediquei e sempre dedicarei a eles! Minha base, minha força, meu amor! Devo a Deus e meus pais tudo que sou! A minha irmã Juliana e minha sobrinha Letícia, minhas duas lindas que tanto amo! Minha namorada Raquel, que é um verdadeiro presente do céu! Meus irmãos Francis e Márcio e seus familiares, que são parte do meu sangue e também muito me ajudaram quando preciso! A todos meus familiares e amigos! A minha orientadora Professora Daniela Oliveira, que nem com todas as palavras conseguiria exaltar minha enorme gratidão e respeito! A todos que sempre estiveram do meu lado, DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus! Muito obrigado Senhor por tudo! És maravilhoso e bom demais comigo e minha família! Todas as graças alcançadas são a Ti dedicadas! Todos os momentos da vida, esteve, está e sempre estará do nosso lado! Ao Senhor Meu Deus, meu muito Obrigado!

A meus Pais! Francisco José dos Santos, e Maria Cecília da Silva, nunca poderei deixar de agradecer! Pelo quão me fazem bem viver! Por tudo! Amor, carinho, compreensão, companheirismo, cumplicidade! Ser filho de Vocês é o meu orgulho! Meus Pais, Obrigado por tudo!

A minha irmã Juliana Maria dos Santos e minha sobrinha Letícia Maria, que são razões do meu viver! Obrigado pela força, obrigado por tudo! O carinho de vocês me ajudam e muito!

A meus irmãos Francis e Márcio e seus familiares! Muito obrigado pela força e apoio quando precisei! Meus irmãos, nunca esquecerei, e sempre que precisar, comigo podem contar!

A minha namorada Raquel! Meu verdadeiro presente do céu! Minha mulher guerreira, companheira, batalhadora, que me cuida demais! Meu amor, Você é uma das razões da minha paz! Te amo demais!

A minha Orientadora, Professora Daniela Oliveira! My Profs! Se eu for ressaltar todas suas qualidades e sua bondade, não pararei de escrever... e não sei como farei para agradecer! Quão amiga, mãe, orientadora, e incentivadora é para mim! My Profs, Meu muito obrigado a senhora é sem fim!

A toda minha família que muito me apóia, me ajuda, me aconselha, me alegra, me dá forças, e me mostra sentido para seguir a trilhar meu caminho! Nunca teria conseguido nada sozinho! A toda minha família, meu enorme carinho!

Aos familiares que já se foram, mas que estão para sempre em meu coração. Vó Dalila Elita de Aquino, Vô Manoel Biam da Silva, Vó Maria da Silva Santos, tio José Biam da Silva, Tia Clineide Biam da Silva, e Tia Cida. (*in memorian*).

Também aos amigos que se foram, nunca serão esquecidos, e agradeço pelos bons momentos convividos: Márcio Leite, e Joelson Dias dos Santos. (*in memorian*).

Ao meu Avô João Nanuca dos Santos, que no auge dos seus 90 anos, nos demonstra grande força pra viver! Nos ensina, como um homem deve ser; humilde e de grande coração! Vovô João, obrigadão!

As tias queridas que sempre apoiaram, deram força e incentivaram de alguma forma. A todas as minhas tias paternas: Santa, Gracinha, Lúcia, Mimi, Berninha, Ceíça, Saúde, Jane, Elke, Ilka, Cléa. A todas minhas tias maternas: Corina, Clarice, Cleonice, Carmelita, Toninha.

Aos tios que também ajudaram, deram conselhos e estiveram do lado. Aos tios paternos: Cidrone, Amarinho, Coninho, Wila, Valbênio, Marcão, Pedro, Netinho. Aos tios maternos: Clóvis e César.

As primas, pela amizade e carinho para sempre comigo. Primas paternas: Carol, Raylla, Juliana, Arielly, Aridiane, Kézia, Natália, Thayanne, Tamires. Primas maternas: Aline, Simone, Elita, Ariane, Beth, Yolanda, Larissa.

Aos primos, pela amizade e companheirismo. Primos Paternos: Fillippão, Cléristão, Delanão, Danilo, Dênis, Marcos, Marlom, Magnum, Aureliano, João Henrique. Primos maternos: Adriano, Flávio, Célio, Fábio, Ulisses, Lucas, Silas.

As minhas segundas mães, que sempre me acolheram, me deram carinho, me trataram como filho, e em todos os momentos quando minha Mãezona não estava por perto, algumas delas estavam para cuidar de mim: Tia Cora, Tia Santa, Professora Daniela, Dona Amara, Dona Eunice, Dona Laura, Dona Francisca, Dona Maria Barboza, Dona Maria, Dona Socorro, Dona Joana, Dona Romilda.

Aos amigos, que devo chamá-los na verdade de irmãos: de Rondônia: Marcelo Leite Rocha (Marcelão), Carlos Huander Filgueiras (PC), Jansen de Lima Rodrigues (Tampinha), Alessandro Soares dos Santos (Sandrão), Welington José (Bizonho), Fausto Barbosa do Rosário (Dentin), Anderson André (Dedel). De Pernambuco: Leonardo Yuri (Tevão), Vinícius Silva Pereira (Viníção), José Ricardo (Cowboyzão), Paulo Henrique (Pompom), Luis Eduardo (Lulinha), Alonso Pereira (Alonsão), Rodolfo Souto (Bagão), Alexandre Tadeu (Mudancia), Everton Diogo (Evertancia), Matheus Castro (Matheusão), Ueliton Assis (Uelitão), Robespierre (Pierrezão), Caio Júlio (Caião).

As amigas, que também posso chamá-las de irmãs: de Rondônia: Pamela Souza (PAM). De Pernambuco: Gésika Maria (Keka), Elisabeth (Betona), Dayane Rodrigues (Day) e Bárbara Dutra (Babi).

Aos meus orientadores durante a graduação: Professora Daniela Oliveira, Professor Cláudio Coutinho Bartolomeu, Professor Daniel Brandespin, Professor Marcos Pinheiro Franque e Professora Taciana Rabelo Ramalho Ramos.

A todos os professores e demais funcionários da UAG/UFRPE, que contribuíram tanto com ensinamentos técnicos como também ensinamentos de vida e de amizades feitas durante estes cinco anos e meio.

A todos os técnicos, residentes, funcionários e tratadores que compõem a Clínica de Bovinos de Garanhuns, pelos momentos de aprendizado e convivência que foram de grande valia para o resto da vida, sejam no âmbito profissional, quanto social.

Aos colegas de turma do mestrado e da pós-graduação pelos bons momentos, estudos e troca de conhecimentos compartilhados, imprescindíveis para nossa formação profissional e pessoal.

Ao pessoal do laboratório de Anatomia: Dona Amara, Ueliton Assis, Diego Gomes, pela grande força sempre que possível e os momentos de descontração passados juntos.

Ao pessoal do CENLAG (Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns), funcionários, alunos de graduação, pós graduação, professores, enfim todos que diariamente compartilhavam o ambiente e equipamentos, na maioria das vezes nos emprestando o que precisávamos, e não só isso, mas a amizade criada pelo convívio diário ficarão pra sempre.

A professora Keila Moreira, por nos permitir usarmos as instalações e equipamentos do laboratório de Biotecnologia.

Ao professor Gustavo Duda, também por permitir usarmos as instalações e equipamentos do laboratório de Solos de Agronomia.

Ao pessoal dos abatedouros de Petrolina, Buíque, e Garanhuns, que permitiram a coleta das amostras dos animais abatidos em seus estabelecimentos, e nestes momentos também foram muito cordiais e atenciosos nos ajudando sempre que preciso.

A Renato Vaz que também colaborou permitindo que fossem coletadas amostras em sua propriedade, e também muito nos ajudou, juntamente com seu primo Leonardo (Tevão, meu irmão!) durante o dia inteiro de pesquisa em sua propriedade.

Ao pessoal do laboratório de Patologia Veterinária da UNESP, Campus de Jaboticabal, em especial a Professora Rosemeri de Vasconcelos, Professora Rosângela Machado, e ao Doutorando Márcio Bandarra, que muito me auxiliou no período de realização do treinamento em Imunoistoquímica pelo PROCAD (Programa Nacional de Cooperação Acadêmica), e continuaram nos auxiliando sempre que necessitamos de suas experiências quando houveram dúvidas na execução da técnica, e no decorrer do trabalho.

Ao Doutorando Paulo Sampaio pela força e apoio também durante a estadia em Jaboticabal, e ao decorrer do trabalho.

A Juliana Rossi e sua Família que muito bem me acolheram em Jaboticabal-SP, e se tornaram meus novos amigos.

À técnica Francisca “Chica” que com toda sua paciência, em meio ao corre-corre de tantos afazeres ensinou-me, deu dicas e relatou experiências que com certeza irão ajudar e muito na realização do trabalho.

À todos que compõe o departamento de Patologia da FCAV-UNESP, meu muito obrigado!

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão de mais esta etapa muito importante da minha vida!

Muito Obrigado!

“Com cuidado e dedicação, toda criação será de qualidade! e o lucro do produtor, o bem estar animal e a segurança alimentar serão realidades!”

Jomel Francisco dos Santos.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES DESENCADEADORES DA CONTRATURA ARTICULAR EM OVINOS

RESUMO

As contraturas articulares são complicações severas de doenças articulares que podem limitar permanentemente a função de extremidades. Os tratamentos atuais para contratura em seres humanos têm pouca eficácia e há uma evidente necessidade de esclarecimento sobre a patofisiologia dessa disfunção crônica e incapacitante. A articulação do ovino é um modelo promissor para a investigação dos estados normais e patológicos, pela semelhança com a biomecânica de determinadas articulações humanas. O objetivo deste trabalho foi investigar por meio das técnicas de imuno-histoquímica e citoquímica a presença de componentes-chave para o desenvolvimento da contratura articular na espécie ovina e avaliar a potencialidade desta espécie como modelo experimental para estudo desta patologia. Para tanto, foram utilizadas 15 cápsulas articulares de joelhos de ovelhas Santa Inês sadias para localização de miofibroblastos e mastócitos. Para investigação de miofibroblastos foi realizada a técnica de imuno-histoquímica. Após a preparação para rotina histológica, a recuperação antigênica foi realizada por aquecimento em citrato, seguida pelo bloqueio das peroxidases, bloqueio de proteínas inespecíficas e então, o anticorpo primário foi incubado. Após, o anticorpo secundário foi acrescentado aos cortes, e o cromógeno DAB foi adicionado. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Harris e montadas. Na técnica citoquímica, foi aplicada a coloração de Azul de Toluidina para evidenciar os mastócitos. As análises dos cortes foram feitas em microscópio de luz. Os controles positivos da pesquisa de α -SMA (cérvis ovina) e de mastócitos (cordão umbilical) foram marcados ou corados satisfatoriamente pelas respectivas técnicas. Nas cápsulas articulares, a proteína foi observada na parede de artérias e raros miofibroblastos foram observados em cada corte, assim como poucos mastócitos foram corados. Outros estudos sobre lesões de cápsula articular de ovinos devem ser conduzidos para confirmar a presença de miofibroblastos e o desenvolvimento da contratura articular.

Palavras-Chave: Cápsula articular. Eixo fibrose. Ovelhas. α -SMA. Mastócitos.

STANDARDIZATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL TECHNIQUE AND INVESTIGATION OF COMPONENTS RELATED TO JOINT CONTRACTURE IN SHEEP

ABSTRACT

Joint contractures are a severe complication of joint injuries that can permanently limit the extremity function. Current treatments for contractures in humans have little effect and there is an obvious need for clarification of the pathophysiology of this chronic and disabling dysfunction. Sheep joint is a promising model for the investigation of normal and pathologic states by the similarity with the biomechanics of certain human joints. The aim of this study was to investigate by the techniques of immunohistochemistry and cytochemistry the presence of key components for the development of joint contractures in sheep and to evaluate the potential of this species as an experimental model to study this disease. Therefore, we used 15 knee joint capsules of healthy Santa Inês ewes to identify myofibroblasts and mast cells. For investigation of myofibroblasts was performed immunohistochemical technique. Following histologic routine preparation, the antigen retrieval was performed by heating in citrate, followed by peroxidases blockage, blocking nonspecific protein and then primary antibody was incubated. After the secondary antibody was added to the cuts, and DAB chromogen was added. Slides were counterstained with Harris Hematoxylin and mounted. In cytochemical technique was applied the stain Toluidine Blue to disclosure mast cells. Analysis of the cuts was made under a light microscope. Positive controls of myofibroblasts (ovine cervix) and mast cells (umbilical cord) were stained satisfactorily by the standard techniques. In joint capsules, α -SMA protein was observed in the wall of arteries and rare myofibroblasts were observed in each section, as well as few mast cells were scored. Other studies about ovine joint capsule injuries must be conducted to confirm the presence of myofibroblasts and the development of joint contracture.

Keywords: Joint capsule. Fibrose axis. Ewes. α -SMA. Mast cells.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fotomicrografia dos controles positivo (A) e negativo (B) da técnica de imuno-histoquímica. Em A nota-se fibras musculares longitudinais e transversais marcadas na cervice ovina e em B observa-se apenas os núcleos marcados com a contracoloração de Hematoxilina de Harris, inclusive na região de uma artéria (seta). A e B, aumento de 400x. 34
- Figura 2** – Fotomicrografias de cápsula articular de joelho ovino marcada pela imuno-histoquímica, contracorada pela Hematoxilina de Harris (A) e corada pelo Azul de Toluidina (B). Observa-se que em A a musculatura lisa da artéria (*) foi marcada pela imuno-histoquímica e a região perivascular teve integridade comprometida pelas etapas da técnica, comparativamente ao corte de cápsula corada pela técnica de Azul de Toluidina (B). A e B, aumento de 100x. 35
- Figura 3** – Fotomicrografias de cápsula articular de joelho de ovelha (A) e cervice de ovelha (B) marcada pela imuno-histoquímica e contracorada pela Hematoxilina de Harris. As setas indicam reações inespecíficas à marcação de α -SMA e em B nota-se que a musculatura lisa da cervice encontra-se marcada em maior intensidade (*) do que a coloração inespecífica (seta). A, aumento 400x. B, aumento de 100x. 35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TGF- β_1 : Transforming Growth Factor Beta 1
NGF: Nerve Growth Factor
CGRP: Calcitonin Gene-Related Peptide
CEUA: Comitê de Ética para uso de animais
UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco
pH: Potencial Hidrogeniônico
HCl: Ácido Clorídrico
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
SP: Substância P

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	Geral	15
2.2	Específicos	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Cápsula articular	16
3.2	Eixo fibrótico	16
3.3	A contratatura articular	16
3.4	Miofibroblastos	18
3.5	Mastócitos	19
3.6	Fatores neurológicos	20
3.7	Articulação do ovino	21
4	REFERÊNCIAS	22
5	ARTIGO CIENTÍFICO	28
5.1	Padronização da técnica de imuno-histoquímica e investigação de componentes desencadeadores da contratatura articular em ovinos.	28
6	ANEXO	38

1 INTRODUÇÃO

As contraturas articulares ou perda de movimentos são complicações severas de doenças articulares que podem limitar permanentemente a função de extremidades. Os tratamentos atuais para contratura em seres humanos têm pouca eficácia e há uma evidente necessidade de esclarecimento sobre a patofisiologia dessa disfunção crônica e incapacitante.

A cápsula articular é a estrutura crítica que limita o movimento da articulação prejudicada. É uma estrutura fibrosa que conecta as extremidades dos ossos que formam a articulação. A cápsula é composta predominantemente de água, colágeno e proteoglicanas, além de componentes desencadeadores da contratura articular, como mastócitos, neuropeptídeos e miofibroblastos (AKESON et al., 1980; HILDEBRAND; FRANK, 2001). Pesquisas já foram feitas na tentativa de descobrir o mecanismo de desenvolvimento da contratura articular e HILDEBRAND et al. (2004a,b, 2005, 2007, 2008b) propuseram um eixo de formação da fibrose que explica esse fenômeno. Através de vários estudos esses pesquisadores conseguiram determinar que há um eixo fibrótico que leva ao estabelecimento da contratura articular e seus componentes são os miofibroblastos, mastócitos e neuropeptídeos. Também mostraram que os números desses componentes estão aumentados na cápsula articular de pacientes com contratura pós-traumática.

Articulações de ovino são semelhantes quanto à biomecânica de algumas articulações humanas (TAPPER et al., 2006). Além disso, a raça Santa Inês tem se difundido no Brasil tropical devido à sua rusticidade e produtividade nos mais diversos climas brasileiros. A procura por animais da raça Santa Inês vem despertando o interesse de novos criadores. A carne, cada vez mais valorizada, chega a ultrapassar em 50% do valor da carne bovina (SANTA INÊS, 2006), o que aumenta a importância de estudos sobre essa raça. Assim, acredita-se que investigações sobre contratura articular em animais, especialmente os ovinos, levarão ao aumento no diagnóstico e a ampliação do conhecimento do mecanismo deste problema, contribuindo igualmente para a saúde humana e animal. Portanto, foi investigada a presença de alguns dos componentes-chave, como mastócitos e miofibroblastos, para o desenvolvimento da contratura na articulação do joelho na espécie ovina, a fim de se avaliar a potencialidade desta espécie como modelo experimental para estudo desta patologia.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar a cápsula articular do joelho de ovinos Santa Inês sadios por meio de técnicas específicas que identifiquem componentes desencadeadores da contratura articular.

2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de componentes do eixo fibrótico, tais como miofibroblastos e mastócitos, na cápsula da articulação do joelho de ovinos Santa Inês sadios, por meio das técnicas de imuno-histoquímica e da coloração de Azul de Toluidina, respectivamente.
- Padronizar a técnica de imuno-histoquímica para identificação da proteína α -actina de músculo liso (α -SMA), para observação dos miofibroblastos em cápsula articular sadia do joelho de ovinos Santa Inês.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Cápsula articular

A cápsula articular é uma estrutura fibrosa que conecta as extremidades dos ossos que formam a articulação. Ela é uma estrutura hipocelular com matriz com predomínio de água, colágeno e proteoglicanas (AKESON et al., 1980; HILDEBRAND; FRANK, 2001). A matriz está organizada em fibrilas que têm orientações em várias direções em camadas de tecido de superficial a profundo (GOHLKE et al., 1994). Devido a esse arranjo de fibrilas a cápsula sustenta a articulação em várias direções (GRIGG; HOFFMAN, 1993). A inervação da cápsula articular sugere um papel dinâmico na propriocepção, nocicepção e neuroinflamação articular (FULLER et al., 1991; GRUBB, 2004). Há pouca descrição das características celulares normais ou alterações em condições patológicas desta estrutura.

3.2 Eixo fibrótico

Enquanto a importância cirúrgica da excisão da cápsula articular patológica está bem estabelecida, a compreensão das alterações da cápsula articular é rudimentar. Hildebrand et al. (2004a,b, 2005, 2007, 2008b), através de estudos *in vivo* e *in vitro*, com análises imuno-histoquímicas, biomecânicas e moleculares, demonstraram a participação crucial de miofibroblastos, mastócitos e neuropeptídeos no eixo fibrótico da formação da contratura articular. Esse problema é bem divulgado na medicina humana, porém é raramente relatado na medicina veterinária.

3.3 A Contratura Articular

A contratura articular é uma consequência frequente de artrites, traumas, afecções neurológicas e queimaduras e é secundária a alterações na estrutura da cápsula articular (TRUDEL; UHTHOFF, 2000). A cicatrização da cápsula articular implica em fibrose e contração do tecido conjuntivo que a constitui, levando à redução da amplitude do movimento (PERRY, 1987; HILDEBRAND et al., 2004a, b, 2007).

Lesões de articulações, particularmente de cotovelo, estão sob risco de perda permanente de movimento, também conhecida como contratura articular (PERRY, 1987). Contraturas articulares limitam o funcionamento de uma extremidade, por exemplo, a perda do movimento do cotovelo torna difícil o posicionamento da mão no espaço. Atividades da rotina humana diária (alimentação, higiene pessoal, vestir-se) requerem

movimentos do cotovelo de pelo menos 30°-130° no arco de movimento de extensão-flexão; o movimento normal é de 0°-150° (MORREY et al., 1981). Ao longo dos últimos séculos, tem sido descrito o benefício da movimentação precoce da articulação após a lesão, prevenindo ou reduzindo a gravidade da contratura articular pós-traumática (PERRY, 1987). Entretanto, apesar das modalidades de tratamento atuais incluindo movimentação precoce, as contraturas articulares pós-traumáticas ainda são um problema comum.

As contraturas articulares são secundárias a mudanças nas estruturas da articulação. Observações em articulações humanas e estudos experimentais em animais indicam que a cápsula articular é a estrutura crítica causando perda de movimento (AKESON et al., 1980; COONEY, 1993; TRUDEL; UHTHOFF, 2000). Procedimentos cirúrgicos para contraturas articulares pós-traumáticas em cotovelo baseiam-se na excisão ou divisão da cápsula articular e são seguidos de programas de reabilitação intensiva e imobilização com tala por 6-9 meses. Mesmo com essa abordagem radical, tipicamente os pacientes recuperam apenas metade do movimento perdido (TIMMERMAN et al., 1994; COHEN; HASTING, 1998).

Em estudos anteriores, Hildebrand et al. (2004a,b; 2005; 2007; 2008a, b), desenvolveram uma nova metodologia para descrever as mudanças na cápsula utilizando como modelo de contratura articular o joelho de coelho, onde a lesão e imobilização/movimento são combinados. Neste estudo, portanto, os pesquisadores pretendem ampliar o conhecimento sobre a cápsula articular e descobrir a base do mecanismo para o desenvolvimento da contratura, e, finalmente iniciar um novo programa de prevenção e tratamento efetivo. Os perfis celulares, da matriz e dos fatores de crescimento estão alterados muito precocemente no processo e permanecem anormais nos estágios crônicos da formação da contratura pós-traumática (HILDEBRAND et al., 2008a). Mudanças na cápsula articular em estágios crônicos do modelo animal são semelhantes às contraturas articulares pós-traumáticas de cotovelo humano (HILDEBRAND et al., 2005). Um conjunto de observações promissoras é a associação do problema com números elevados de miofibroblastos, mastócitos e neuropeptídeos contidos em fibras nervosas (HILDEBRAND et al., 2008a). Estes três fatores têm sido implicados em outras condições caracterizadas pela contratura e fibrose (FOREMAN, 1987; XU et al., 2002; MAURER et al., 2003; GRUBER, 2003; REED et al., 2004; GRUBB, 2004; TESSIER et al., 2007; NESTERENKO et al., 2009). Os miofibroblastos podem exercer forças na matriz

extracelular e sintetizar colágeno, o maior componente sólido da cápsula. Os mastócitos contêm fatores que potencializam a função miofibroblástica e neuropeptídeos como a Substância P (SP) e Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (CGRP) estimulam os mastócitos a liberarem esses fatores.

3.4 Miofibroblastos

Os miofibroblastos são fibroblastos especializados que expressam a proteína contrátil α -actina de músculo liso (α -SMA) e participa do processo de fechamento normal de ferimentos de pele. Eles estão sendo associados à contratura e fibrose em humanos. Exemplos incluem cirrose hepática, fibrose pulmonar, complicações na cicatrização da córnea, e tração relacionada com descolamento de retina (TOMASEK et al., 2002). Condições musculoesqueléticas associadas com miofibroblastos incluem contratura de Dupuytren, capsulite adesiva (“frozen shoulder”) e “clubfoot” (ZIMNY et al., 1985; BERNDT et al., 1994; BUNKER; ANTHONY, 1995). Dados de Hildebrand et al. (2004a) mostraram que o número de miofibroblastos estão elevados em cápsulas articulares de pacientes com contraturas cubitais quando comparados com tecidos similares de pacientes sem contraturas. A perda de movimento está significativamente correlacionada com o número de fibroblastos ($r^2=0.56-0.89$, $p<0.0001$) (HILDEBRAND et al., 2004a; GERMSCHIED; HILDEBRAND, 2006).

Abdel et al. (2011), em trabalho de pesquisa sobre o tempo e atividade destas células no mecanismo da contratura articular, observaram que o número de miofibroblastos é maior no início das lesões até duas semanas após, e com o tempo diminui gradativamente. É evidente a importância de se procurar mecanismos de controle da elevação do número dessas células no início do problema para que se possa controlar ou até mesmo reverter sem muitas seqüelas a contratura articular.

O processo de contração ativa mediada por miofibroblastos é dependente da α -SMA, a qual é utilizada como marcador para miofibroblastos. Fibras da proteína contrátil α -SMA intracelular estão ligadas à matriz extracelular através do complexo fibronexo da membrana celular, no qual miofibroblastos podem exercer forças na matriz (ZIMNY et al., 1985; TOMASEK et al., 1992; BERNDT et al., 1994; BUNKEY; ANTHONY, 1995; TOMASEK et al., 2002; GERMSCHIED; HILDEBRAND, 2006). Um papel proposto do miofibroblasto no processo de contratura de tecidos moles seria a contração local da matriz através da conexão citoesqueleto-fibronexo-matriz extracelular associada a remodelação da

matriz que estabiliza o novo arranjo contraído. Os miofibroblastos podem contribuir para a formação da contratura por secretar colágeno tipo I (TOMASEK et al., 2002).

Vários fatores que alteram a formação e a função dos miofibroblastos e a expressão da α -SMA foram identificados (ZIMNY et al., 1985; TOMASEK et al., 1992; BERNDT et al., 1994; DESMOULIERE, 1995; BUNKER; ANTHONY, 1995; TOMASEK et al., 2002; GERMSCHEID; HILDEBRAND, 2006). TGF- β_1 é descrito como o maior estimulador e tem vários efeitos no aumento do número/função dos miofibroblastos. A proteína α -SMA intracelular é expressa e agrupada em fibras tensionadas. Além disso, os complexos fibronexos de adesão estão aumentados e a secreção do colágeno está elevada. A sinalização do TGF- β_1 envolve as proteínas de transcrição SMAD para a síntese de colágeno, mas parece ser um elemento de resposta diferente para TGF- β_1 no promotor de α -SMA (ZIMNY et al., 1985; TOMASEK et al., 1992; BERNDT et al., 1994; DESMOULIERE, 1995; BUNKER; ANTHONY, 1995; TOMASEK et al., 2002; EVANS et al., 2003; GERMSCHEID; HILDEBRAND, 2006). O fator de crescimento de nervo (NGF) é outra molécula que estimula a conversão de fibroblastos em miofibroblastos, aumenta a contração do gel de colágeno por fibroblastos, e NGF e seus receptores foram detectados em fibroblastos (MICERA et al., 2001).

3.5 Mastócitos

Os mastócitos são células de origem hematopoiética que atingem a maturação final no tecido conjuntivo periférico (HEBDA et al., 1993; GRUBER, 2003; KRISHNASWAMY et al., 2006). São largamente distribuídos pelos tecidos conjuntivos, incluindo pele e cápsulas articulares e estão envolvidos na cicatrização de feridas cutâneas e queimaduras (HEBDA et al., 1993; BUCKLEY et al., 1998; EGOZI et al., 2003). Estas células foram avaliadas quanto ao papel na patogênese da fibrose (DOWDALL et al., 2002; GRUBER, 2003; KRISHNASWAMY et al., 2006). Várias observações sugerem uma conexão entre a atividade dos mastócitos e desordens musculoesqueléticas caracterizadas por contraturas (BUCKLEY et al., 1998).

A hemartrose pós-traumática agrava as alterações teciduais resultantes, o que reforça o papel dos mastócitos no desenvolvimento da contratura (HORISBERGER et al., 2011). Com isso, Monument et al. (2011), demonstraram em modelo animal que o uso de anti-histamínico (Cetotifeno) pode atuar na diminuição da gravidade das contraturas articulares e manifestações moleculares nas cápsulas articulares pesquisadas. Ainda, foi observado

que o número de miofibroblastos e mastócitos nas cápsulas de animais tratados com Cetotifeno foi reduzido.

3.6 Fatores neurológicos

Todas as estruturas articulares exceto a cartilagem articular são inervadas (SCHAIBLE; GRUBB, 1993). Os nervos das articulações contêm fibras mielínicas e amielínicas. Cerca de 20% dos axônios são mielinizados e possuem mecanorreceptores com grandes diâmetros e nociceptores com diâmetros menores. Os outros 80% dos axônios são amielínicos, metade dos quais são fibras sensitivas (nociceptores), e o restante, fibras eferentes simpáticas (CRAIG et al., 1998). Os nociceptores reagem a estímulos mecânicos e térmicos, assim como a processos inflamatórios na articulação (FULLER et al., 1991; GRIGG; HOFFMAN, 1993; HOGERVORT; BRAND, 1998; GRUBB, 2004). Uma proporção significativa das fibras sensitivas amielínicas que suprem a articulação do joelho contém SP e CGRP (HANESCH et al., 1997). Fibras nervosas imunorreativas a SP e CGRP foram identificadas nas cápsulas articulares do joelho, ombro e vértebras cervicais em várias espécies, inclusive humanos (HALATA et al., 1985; KARAHAN et al., 2002; KALLAKURI et al., 2004).

Neuropeptídeos contidos nos neurônios em articulações amplificam respostas inflamatórias. A severidade de artrite induzida experimentalmente em joelhos de ratos pode ser significativamente reduzida pela transecção da raiz dorsal, desconectando o gânglio da raiz dorsal e a medula espinhal, embora deixando intactos os axônios conectados à periferia (REES et al., 1994). Efeitos semelhantes são notados quando a depleção de neuropeptídeos da articulação é provocada utilizando capsaicina (AHMED et al., 1995). Estas observações indicam que um circuito da medula espinhal media a maior parte da liberação de neuropeptídeos que amplificam a resposta inflamatória (FOREMEN, 1987). De acordo com esse modelo, sinais aferentes são transportados por neurônios nociceptivos mielínicos e amielínicos do gânglio da raiz dorsal para o corno dorsal da medula espinhal, onde eles fazem sinapse com neurônios secundários ou interneurônios, os quais então ativam outros neurônios peptidérgicos para conduzir impulsos de volta para a periferia, onde a SP, CGRP e outros neuromoduladores são liberados (KARAHAN et al., 2002).

Crescentes evidências sugerem que os neuropeptídeos podem participar de síndromes fibróticas por meio da interação nervo-mastócito. Terminações nervosas

peptidérgicas foram detectadas em estreita associação com mastócitos na pele, ligamento, cápsula articular e intestino (FOREMAN, 1987; HART et al., 1995; KARAHAN et al., 2002; JARVIKALLIO et al., 2003; DE JONGE et al., 2004). Está bem descrito que a SP e a CGRP podem causar a degranulação de mastócitos (FOREMAN, 1987; HART et al., 1995; STEINHOFF et al., 2003). Portanto, um mecanismo neurológico, que atua por meio dos neuropeptídeos SP e CGRP, pode explicar porque mastócitos são estimulados resultando em ativação de fibroblasto-miofibroblasto e fibrose (FOREMAN, 1987; MAURER et al., 2003; KRISHNASWAMY, 2006).

BEYE et al. (2006) relataram que a transecção do nervo femoral (denervação) prejudica a cicatrização dos ligamentos do joelho de coelhos. Além disso, a SP e CGRP diminuem os níveis de RNAm de fatores de crescimento e moléculas da matriz em tecidos cicatriciais explantados do ligamento colateral medial (SALO et al., 2007). A aplicação local de NGF aumenta significativamente a cicatrização do ligamento colateral medial de ratos, aumentando o crescimento de axônios na cicatriz, a angiogênese, o tamanho da cicatriz, a rigidez da cicatriz em 30%, a resistência a tração da cicatriz em 40% e, finalmente, a força de tração da cicatriz em 55% comparado à cicatrização normal do ligamento colateral medial de ratos (MAMMOTO et al., 2008).

3.7 Articulação do ovino

A mecanobiologia de articulações (TAPPER et al., 2006) e o processo de osteogênese do ovino (HOLY et al., 2000) são semelhantes aos humanos. Desta forma, o ovino torna-se uma opção de modelo experimental para pesquisas sobre sistema locomotor. Além disso, essa espécie apresenta suscetibilidade à doença articular (DAWSON, 1987; APPEYARD et al., 1999; CALLADO et al., 2001; SPADARI et al., 2013). Sabe-se que ovinos adultos podem se infectar com lentivírus (Artrite Encefalite Caprina e Maedi-Visna), causando complicações respiratórias e artrite carpiana (DAWSON, 1987; PÉTURSSON et al., 1989; CONCHA-BERMEJILLO, 1997; CALLADO et al., 2001).

4 REFERÊNCIAS

- ABDEL, M. P. et al. Myofibroblast Cells are Preferentially Expressed Early in a Rabbit Model of Joint Contracture. **Journal of orthopaedic research**. v. 30, p.713–719, 2012.
- AHMED M, et al. Capsaicin effects on substance P and CGRP in rat adjuvant arthritis. **Regulatory Peptides**. v. 55, p. 85–102. 1995.
- AKESON W, AMIEL D, WOO SL-Y. Immobility effects on synovial joints the pathomechanics of joint contracture. **Biorheology**. v.17, p. 95–110. 1980.
- APPLEYARD, R. C., GHOSH, P., SWAIN, M. V. Biomechanical, histological and immunohistological studies of patellar cartilage in an ovine model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy. **Osteoarthritis and Cartilage**. v.7, p. 281–294. 1999.
- BERNDT, A, et al. Appearance of the myofibroblasts phenotype in Dupuytren's disease is associated with a fibronectin, laminin, collagen type IV and tenascin extracellular matrix. **Pathobiology**. v. 62, 55–58, 1994.
- BEYE JA, et al. Denervation alters mRNA levels of repair-associated genes in a rabbit medial collateral ligament injury model. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 24, n.9, p. 1842-1853, Sep. 2006.
- BUCKLEY, M.G.; GALLAGHER, P.J.; WALLS, A.F. Mast Cell Subpopulations in the Synovial Tissue of Patients with Osteoarthritis: Selective Increase in the Numbers of Tryptase-Positive, Chymase-Negative Mast Cells. **Journal of Pathology**. v. 186, p. 67-74. 1998.
- BUNKER, T.D.; ANTHONY, P.P. The pathology of frozen shoulder. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 77B, p. 677-683. 1995.
- CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.
- COHEN M.S., HASTINGS I.H. Post-traumatic contracture of the elbow. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 80B, p. 805-812. 1998.
- CONCHA-BERMEJILLO, A. **Maedi-visna and ovine progressive pneumonia**. Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice. v. 13, n.1, p.13-33. 1997.
- COONEY, III W.P. Contractures of the elbow. In: MORREY, BF, ed. **The Elbow and its Disorders**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 464-75. 1993.
- CRAIG AD, HEPPELMANN B, SCHAIBLE HG. The projection of the medial and posterior articular nerves of the cat's knee to the spinal cord. **The Journal of Comparative**

Neurology. v. 276, 279-288. 1988.

DAWSON, M. Pathogenesis of maedi-visna. **Veterinary Record.** v. 120, n.19, p. 451-454. 1987.

DESMOULIERE, A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. **Cell Biology International.** v.19,p.471-476. 1995.

DOWDALL, J.F. et al. Biological role and clinical implications of mast cells in surgery. **Surgery.** v. 132, p.1-4. 2002.

EGOZI E.I., et al. Mast cells modulate the inflammatory but not the proliferative response in healing wounds. **Wound Repair and Regeneration.** v.11, p.46-54. 2003.

EVANS, R.A. et al. TGF- β 1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation--the role of smad proteins. **Experimental Cell Research.** v. 282, p.90-100. 2003.

FOREMAN, J.C. Peptides and neurogenic inflammation. **British Medical Bulletin.** v.43, p. 386-400. 1987.

FULLER, M.S.; GRIGG, P.; HOFFMAN, A.H. Response of joint capsule neurons to axial stress and strain during dynamic loading in cat. **Journal of Neurophysiology.** v.65, p.1321-1328. 1991.

GERMSCHIED, N.M.; HILDEBRAND, K.A. Regional variation is present in elbow joint capsules following injury. **Clinical Orthopaedics.** v.450, p.219-224. 2006.

GOHLKE, F., ESSIGKRUG, B., SCHMITZ, F. The patterns of the collagen fiber bundles of the capsule of the glenohumeral joint. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery.** v. 3, p.111-128. 1994.

GRIGG, P.; HOFFMAN, A.H. Loading and deformation of the cat posterior knee joint capsule in axial and extension rotations. **Journal of Biomechanics.** v.26, p. 1283-1290. 1993.

GRUBB, B.D. Activation of sensory neurons in the arthritic joint. **Novartis Foundation Symposium.** v.260, 28-48. 2004.

GRUBER, B. Mast Cells in the Pathogenesis of Fibrosis. **Current Rheumatology Reports.** v.5, p.147-153. 2003.

HALATA, Z.; RETTIG, T.; SCHULZE, W. The ultrastructure of sensory nerve endings in the human knee joint capsule. **Anatomy & Embryology.** v.172, n.3, p.265-75. 1985.

HANESCH, U.; HEPPELMANN, B.; SCHMIDT, R.F. Quantification of cat's articular afferents containing calcitonin gene-related peptide or Substance P innervating normal and

acutely inflamed joints. **Neuroscience Letters**. v.233, p.105-108. 1997.

HART, D.A.; FRANK, C.B.; BRAY, R.C. Inflammatory Processes in Repetitive Motion and Overuse Syndromes: Potential Role of Neurogenic Mechanisms in Tendons and Ligaments. In: Gordon SL, Blair SJ, Fine LJ, (Eds). **Repetitive Motion Disorders of the Upper Extremity**. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; p.247-62. 1995.

HEBDA, P.A.; COLLINS, M.A.; THARP, M.D. Mast Cell and Myofibroblast in Wound Healing. **Dermatology Clinics**. v.11, p. 685-696. 1993.

HILDEBRAND K.A. et al. Myofibroblast numbers are elevated in human elbow joint capsules following trauma. **Clinical Orthopaedics**. v.419, p.189-197. 2004.

HILDEBRAND K.A., ZHANG M., HART D.A. Myofibroblast upregulators are elevated in joint capsules in post traumatic contractures. **Clinical Orthopaedics**. v. 456, p.85-91. 2007.

HILDEBRAND, K.A. et al. Cellular, matrix and growth factor components of the joint capsule are modified early in the process of post-traumatic contracture formation in a rabbit model. **Acta Orthopaedica**. v.79, n.1, p.116-125. 2008a.

HILDEBRAND, K.A. et al. Joint Capsule Mast Cells and Neuropeptides are increased within Four Weeks of injury and remain elevated in Chronic stages of Post traumatic Contractures. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 26, n.10, p. 1313-1319. 2008b.

HILDEBRAND, K.A.; FRANK, C.B. Scar formation and ligament healing. **Canadian Journal of Surgery**. v.41, p.425-429. 2001.

HILDEBRAND, K.A.; HOLMBERG, M.; SHRIVE, N.G. A new method to measure post-traumatic joint contractures in the rabbit knee. **Journal of Biomechanical Engineering**. v.125, p.887-892. 2003.

HILDEBRAND, K.A.; ZHANG, M.; HART, D.A. High rate of joint capsule matrix turnover in chronic human elbow contractures. **Clinical Orthopaedics**.v. 439, p.228-234. 2005.

HOGERVORST, T.; BRAND, R.A. Mechanoreceptors in joint function. [Review] [161 refs]. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v.80A, p.1365-1378. 1998.

HOLY, C. E.; et al. In vivo models for bone tissue-engineering constructs. In: Davies J, editor. **Bone Engineering**. Toronto: Copyright. p. 496-504. 2000.

HORISBERGER M., et al. Does the source of hemarthrosis influence posttraumatic joint contracture and biomechanical properties of the joint. **Clin Biomech (Bristol, Avon)**. v. 26, n.7, p. 790-795. 2011.

JARVIKALLIO, A.; HARVIMA, I.T.; NAUKKARINEN, A. Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. **Archives of Dermatological Research**. v. 295, p. 2-7. 2003.

KALLAKURI, S. et al. Demonstration of substance P, calcitonin gene-related peptide, and protein gene product 9.5 containing nerve fibers in human cervical facet joint capsules. **Spine**. v.29, p.1182-1186. 2004.

KARAHAN, S. et al. Distribution of β -Endorphin and Substance P in the Shoulder Joint of the Dog Before and After a Low Impact Exercise Programme. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*. v.31, p.72-77. 2002.

KRISHNASWAMY, G.; AJITAWI, O.; CHI, D.S. **The human mast cell: an overview**. *Methods in Molecular Biology*. v.315, p.13-34. 2006.

MAMMOTO, T. et al. Nerve growth factor improves ligament healing. **Journal of Orthopaedic Research**. v.26, n.7, p. 957-964. 2008.

MAURER M. et al. **What is the physiological function of mast cells?** *Experimental Dermatology*. v. 12, p.886. 2003.

MICERA, A. et al. **Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.98, p.6162-6167. 2001.

MONUMENT, M. J. et al. The mast cell stabilizer ketotifen reduces joint capsule fibrosis in a rabbit model of post-traumatic joint contractures. **Inflammation Research**. v.61, p. 285–292. 2012.

MONUMENT, M. J. et al. The mast cell stabilizer ketotifen, significantly reduces contracture severity and molecular manifestations of joint capsule fibrosis in a rabbit model of posttraumatic joint contractures. **The Journal of bone and joint surgery**. *American*. v. 92, n.6, p.1468-1477.2010.

MORREY B.F., ASKEW L.J., CHAO E.Y. A biomechanical study of normal functional elbow motion. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v.63A, p.872-877. 1981.

NESTERENKO, S. et al. New Rabbit Knee Model of Posttraumatic Joint Contracture: Indirect Capsular Damage Induces a Severe Contracture. **Journal of orthopaedic research**. v. 27, p.1028–1032, 2009.

PERRY J. Contractures: A historical perspective. **Clinical Orthopaedics**. v.219, p.8-14. 1987.

PÉTURSSON, G.; PALSSON, P.A.; GEORGSSON, G. Maedi-visna in sheep: host virus interactions and utilization as a model. *Intervirology*. v. 30 suplem.1, p.36-44. 1989.

REED, K.L. et al. A neurokinin 1 receptor antagonist decreases postoperative peritoneal adhesion formation and increases peritoneal fibrinolytic activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.101, p. 9115-9120. 2004.

REES, H. et al. Do dorsal root reflexes augment peripheral inflammation? **Neuroreport**. v.5, p.821-824. 1994.

SALO, P. et al. Neuropeptides Regulate Expression of Matrix Molecule, Growth Factor and Inflammatory Mediator mRNA in Explants of Normal and Healing Medial Collateral Ligament. **Regulatory Peptides**. v. 142, p.1-6. 2007.

ACRIMAT. Santa inês, a raça, 2006. Acesso em 24 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.acrimat.com.br/institucional/index.asp?cod=11>> Acesso em: 17 mai. 2013.

SCHAIBLE, H.G.; GRUBB, B.D. **Afferent and spinal mechanisms of joint pain. Pain**. v. 55, p.5-54. 1993.

SPADARI, A. et al. Effects of intraarticular treatment with stanozolol on synovial membrane and cartilage in an ovine model of osteoarthritis. **Research in Veterinary Science**. v. 94, p. 379–387, 2013.

STEINHOFF, M. et al. Modern Aspects of Cutaneous Neurogenic Inflammation. **Archives Dermatology**. v.139, p.1479-1488. 2003.

TAPPER, J.E. et al. In vivo measurement of the dynamic 3-D kinematics of the ovine stifle joint. **Journal of Biomechanical Engineering**. v.126, p.301-305. 2006.

TESSIER, J. et al. Contributions of histamine, prostanoids, and neurokinins to edema elicited by edema toxin from *Bacillus anthracis*. **Infection and Immunity**. v.75, p.1895-1903. 2007.

TIMMERMAN L., ANDREWS J. Arthroscopic treatment of posttraumatic elbow pain and stiffness. **The American Journal of Sports Medicine**. v.22, p.230-235. 1994.

TOMASEK, J.J. et al. Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: Dependency on an organized actin cytoskeleton and serum. **The Anatomical Record**. v.232, p.359-368. 1992.

TOMASEK, J.J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Molecular Cell Biology**. v.3, p.349-363. 2002.

TRUDEL G., UHTHOFF H. Contractures secondary to immobility: Is the restriction articular or muscular? An experimental longitudinal study in the rat knee. **Archives of Physical Medicine Rehabilitation**. v.81, p.6-13. 2000.

XU, X. et al. Role of mast cells and myofibroblasts in human peritoneal adhesion

formation. **Annals of Surgery**. v. 236, p.593-601. 2002.

ZIMNY, M.L. et al. An Electron Microscopic Study of the Fascia from the Medial and Lateral Sides of Clubfoot. **Journal of Paediatric Orthopaedics**. v.5, p.577-581. 1985.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA E INVESTIGAÇÃO DE COMPONENTES DESENCADEADORES DA CONTRATURA ARTICULAR EM OVINOS

Jomel Francisco dos Santos¹, Matheus Castro Franco², Marcio de Barros Bandarra³, Arivonaldo Vaniel da Silva², Thiago Arcoverde Maciel¹, Daniela Oliveira⁴

¹Pós-graduando da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, PE, Brasil. jomelvet@hotmail.com

²Graduandos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, PE, Brasil.

³Pós-graduando da Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, SP, Brasil.

⁴Professora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, PE, Brasil.

Resumo

As contraturas articulares são complicações severas de doenças articulares que podem limitar permanentemente a função de extremidades. Os tratamentos atuais têm pouca eficácia e há necessidade de esclarecimento sobre a patofisiologia dessa disfunção. A articulação do ovino apresenta biomecânica favorável de um modelo animal para a investigação dos estados normais e patológicos. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de componentes-chave, como mastócitos e miofibroblastos, para o desenvolvimento da contratura articular na espécie ovina e avaliar a potencialidade desta espécie como modelo experimental para estudo deste problema. Para tanto, foram utilizadas 15 cápsulas articulares de joelhos de ovelhas Santa Inês sadias para localização da proteína α -SMA, identificando a presença de miofibroblastos pela técnica de imunohistoquímica, e mastócitos, pela coloração de Azul de Toluidina, em microscópio de luz. Os controles positivos foram corados satisfatoriamente pelas respectivas técnicas então padronizadas. Nas cápsulas articulares, raros mastócitos foram corados. Outros estudos sobre lesões de cápsula articular de ovinos devem ser conduzidos para confirmar a presença de miofibroblastos e o desenvolvimento da contratura articular.

Palavras-chave: Cápsula articular. Eixo fibrose. Ovelhas. α -SMA. Mastócitos.

STANDARDIZATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL TECHNIQUE AND INVESTIGATION OF COMPONENTS RELATED TO JOINT CONTRACTURE IN SHEEP

Abstract

Joint contractures are a severe complication of joint injuries that can permanently limit the extremity function. Current treatments have limited efficacy, and there is a need for clarification of the pathophysiology of this dysfunction. Sheep joint presents favorable biomechanical features of an animal model for the investigation of normal and pathologic states. The aim of this study was to investigate the presence of key components such as mast cells and myofibroblasts for the development of joint contractures in sheep and to evaluate the potential of this species as an experimental model to study this disease. Therefore, we used 15 knee joint capsules of healthy Santa Inês ewes for location of α -SMA protein of myofibroblasts by immunohistochemical technique and mast cells by Toluidine Blue staining in light microscopy. Positive controls were stained satisfactorily then standardized by the respective techniques. Rare mast cells were stained. Other studies about ovine joint capsule injuries must be conducted to confirm the presence of myofibroblasts and the development of joint contracture.

Keywords: Joint capsule. Fibrosis axis. Sheep. α -SMA. Mast cells.

Introdução

As contraturas articulares ou perda de movimentos são complicações severas de doenças articulares que podem limitar permanentemente a função de extremidades (MORREY et al., 1981). A cápsula articular é a estrutura crítica que limita o movimento. Os tratamentos atuais para contratura em seres humanos têm pouca eficácia e há uma evidente necessidade de esclarecimento sobre a patofisiologia dessa disfunção crônica e incapacitante (TIMMERMAN et al., 1994; COHEN; HASTING, 1998).

Pesquisas já foram feitas na tentativa de descobrir o mecanismo de desenvolvimento da contratura articular e Hildebrand et al. (2004a,b, 2005, 2007, 2008b) propuseram um eixo de formação da fibrose que explica esse mecanismo. Desses estudos esses conseguiram determinar um eixo fibrótico que leva ao estabelecimento da contratura articular e seus componentes são os miofibroblastos, mastócitos e neuropeptídeos. Também mostraram que os números desses componentes estão aumentados na cápsula articular de pacientes com contratura pós-traumática.

As articulações do ovino são modelos promissores para a investigação dos estados normais e patológicos, pela semelhança com a mecanobiologia de determinadas articulações humanas e pela susceptibilidade a doenças articulares (DAWSON, 1987; APPLEYARD et al., 1999; HOLY et al., 2000; CALLADO et al., 2001; TAPPER et al., 2006; SPADARI et al., 2013).

Assim, investigações sobre contratura articular em animais, especialmente os ovinos, poderão levar ao aumento de diagnóstico e à melhoria do conhecimento do mecanismo deste problema, contribuindo igualmente para a saúde humana e animal. Portanto, foram padronizadas as técnicas de identificação de miofibroblastos e mastócitos para investigar a presença desses componentes-chave para o desenvolvimento da contratura articular no joelho ovino, a fim de se avaliar a potencialidade desta espécie como modelo experimental para estudo desta patologia.

Material e Métodos

Esta pesquisa está em acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), registrado sob número 016037/2012-34.

Animais

Foram utilizados 15 ovinos da raça Santa Inês, fêmeas, adultas, sadias, obtidas em Abatedouro Municipal da região de Garanhuns, PE. A região Nordeste em 2013, segundo a Organização das Nações Unidas, teve a pior seca dos últimos 50 anos, o que levou à escassez de alimento nos 1.400 municípios atingidos (ONU, 2013), inclusive na região de Garanhuns. Com isso, houve um aumento do abate de fêmeas, justificando a maior oferta deste gênero para as coletas de cápsula articular neste experimento.

Os animais foram avaliados quanto à higidez das articulações e somente os que não apresentaram sinais de doença articular ao exame físico foram incluídos no estudo. Após o abate do animal, foram coletadas as cápsulas da articulação do joelho, nas regiões mediais e laterais ao ligamento patelar.

Imuno-histoquímica

Fragmentos da cápsula articular do joelho de cada animal foram coletados e imersos em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas, para posteriormente serem processados na rotina histológica em aparelho histotécnico¹. Os blocos de parafina contendo os fragmentos de cápsula articular foram cortados em micrótomo manual² com espessura de 5 µm, utilizando lâminas polarizadas³.

As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinadas em estufa a aproximadamente 60°C por no mínimo uma hora, diafanizadas em dois banhos com xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de álcool para então iniciar as colorações imuno-histoquímica e citoquímica pelo Azul de Toluidina.

Em todas as reações foram adicionados um controle positivo e um negativo.

Dentre as etapas da técnica imuno-histoquímica a recuperação antigênica foi realizada pelo calor imergindo as lâminas em citrato de sódio 10 mM e pH 6,0 em banho-maria a 95°C, com subsequente resfriamento a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, realizou-se o bloqueio⁴ das peroxidases endógenas por 20 minutos, após delimitação dos cortes com caneta hidrofóbica⁵. As proteínas inespecíficas foram

¹ LupeTec, São Carlos, SP.

² Leica, São Paulo, SP.

³ Imunoslide, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Envision, Dako, São Paulo, SP.

⁵ DakoPen, Dako, São Paulo, SP

bloqueadas⁶ por 20 minutos. O anticorpo primário⁷ foi adicionado na diluição de 1:100 por duas horas em temperatura ambiente aproximadamente 27°C, ou *overnight* (18 horas) a 4°C. Em seguida, o anticorpo secundário⁸ foi aplicado às secções em temperatura ambiente por 60 minutos. O substrato Diaminobenzidina (DAB)/peróxido⁴ foi aplicado às secções por 10 minutos conforme recomendações do fabricante. A água destilada foi utilizada em todos os processos, realizando duas lavagens rápidas com água destilada e uma com Tris HCl pH 7,4 ou Tris EDTA pH 9,0. As lâminas foram rapidamente contracoradas com Hematoxilina de Harris por 30 segundos, e, após 10 minutos em água corrente, passaram pelo processo de reidratação e diafanização em bateria de concentrações crescentes de álcool e xilol, respectivamente, e após foram montadas com lamínula e Entellan⁹ para serem avaliadas em microscópio de luz.

O controle positivo para a α -SMA utilizado foram cortes histológicos de cervice ovina (Figura 1A), e o controle negativo, as mesmas lâminas de cápsula articular, porém, sem o anticorpo primário (Figura 1B).

Para a evidenciação dos mastócitos foi realizada a coloração de Azul de Toluidina (TOLOSA et al., 2003), específico para células metacromáticas, como o mastócito. A técnica consiste em, após a diafanização e desidratação, imergir as lâminas em solução a 0,1% de Azul de Toluidina¹⁰ em água destilada, por 30 minutos. Como controle positivo foram utilizados cortes histológicos de cordão umbilical bovino.

As imagens dos cortes foram capturadas em aumentos de 50, 100 e 400 vezes para cada amostra com câmera digital¹¹ acoplada ao microscópio de luz¹¹.

Resultados e Discussão

A rotina de imuno-histoquímica foi realizada com variações até se obter a padronização da técnica. No início do processo de padronização, utilizaram-se lâminas histológicas comuns, sem adição de produto fixante. Foi observado que os cortes de cápsula articular nestas lâminas, quando submetidos à rotina imuno-histoquímica, não

⁶ Protein Block, Dako, São Paulo, SP.

⁷ Monoclonal anti α -SMA antibody produced in mouse, Sigma, São Paulo, SP.

⁸ Anti-Mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in rabbit, Sigma, São Paulo, SP.

⁹ Merck, Damstadt, Germany.

¹⁰ Vetec, Rio de Janeiro, RJ.

¹¹ Leica, Recife, PE

mantiveram a integridade do tecido. Com isso, testou-se a utilização de lâminas tratadas com poli-lisina¹², onde uma parte das lâminas foi adicionada solução de 10% de poli-lisina em água destilada, e outras foram adicionadas 100% de poli-lisina. Apesar da recomendação do uso de lâminas tratadas com poli-lisina em rotina imuno-histoquímica (VOLPATO et al., 2012), no presente experimento essa substância não favoreceu a permanência e a qualidade do tecido estudado. Assim, optou-se pela utilização de lâminas polarizadas, que proporcionou maior aderência do tecido, ainda que não garantisse a integridade deste em todas as lâminas preparadas com a técnica de imuno-histoquímica.

Observou-se que a completa desparafinização dos cortes para iniciar a preparação histológica foi fundamental para o reconhecimento específico da α -SMA pelo anticorpo primário.

Não foi observada diferença na utilização das soluções de Tris HCl ou Tris EDTA para lavagem das lâminas.

A realização da recuperação antigênica pelo calor, pode ter contribuído para a perda da integridade do tecido de algumas lâminas (Figura 2). Utilizou-se três métodos diferentes para esta etapa: por meio de banho-maria, micro-ondas em potência máxima por 15 minutos, e panela de pressão comum (20 segundos após atingir a pressão). O banho-maria mostrou-se como o método mais prático para uso em qualquer laboratório de pesquisa.

O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com o uso de um bloqueador específico do kit comercial Envision utilizado por 20 minutos. Também utilizou-se solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 8% durante o processo de padronização da técnica. Notou-se que, por apenas acrescentar gotas ao corte histológico e não lavar a lâmina como na solução de metanol e peróxido de hidrogênio, o uso do bloqueador do kit preservou melhor a integridade do tecido.

O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito em câmara úmida na temperatura ambiente ou em estufa seca a 40°C. Como não houve diferença entre as técnicas, optou-se pela padronização em temperatura ambiente.

Para a preparação da solução de anticorpo primário a ser utilizado, este foi diluído em Tris HCl pH 7,4 com concentração de 1:100 e também foram feitos testes com concentrações de 1:50 (anticorpo:diluyente). Também utilizou-se diluição em TRIS EDTA pH 9,0 ou solução de PBS autoclavado, ambas em concentração de 1:100. Não houve diferença entre as soluções utilizadas e, pela praticidade e pelo custo, optou-se pelo Tris

¹² Poly-L-lisine - Sigma Chemical Co, USA.

HCl pH 7,4. A concentração de 1:100 foi mais adequada para evidenciar as estruturas que contém a α -SMA na cápsula articular de ovelhas (artérias e miofibroblastos) e está em acordo com o utilizado para também identificar miofibroblastos por Monument et al. (2010) em cápsula articular de coelhos e Volpato et al. (2012), estudando piometra em cadelas. Já autores como Lima et al. (2011), em pesquisa sobre endométrio de vacas, e Zuccari et al (2011) ao investigarem tumores de mama em cadela, utilizaram satisfatoriamente a concentração de anticorpo primário de 1:50.

Notou-se que o anticorpo secundário monoclonal α -SMA alcalino fosfatase produzido em camundongo¹³ era incompatível com o anticorpo primário. Logo, substituiu-se este pelo anticorpo monoclonal SMA sem fosfatase, com preparação para o DAB, quando obteve-se êxito na marcação da proteína.

Não houve diferença quanto ao método de incubação do anticorpo por duas horas em câmara úmida em temperatura ambiente ou *overnight* (18 horas) a 4°C, assim como Hübner et al. (2005) observaram.

A Hematoxilina de Harris é um corante amplamente utilizado na contracoloração imuno-histoquímica (HÜBNER et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006; LIMA et al., 2011; VOLPATO et al., 2012), por marcar os núcleos de todas as células do tecido avaliado, delimitando a identificação imuno-histoquímica, possibilitando a análise histomorfométrica.

A coloração de Azul de Toluidina foi adequada para localização dos mastócitos e já é uma técnica consagrada para tal (TOLOSA et al., 2003). A técnica de imuno-histoquímica oferece maior precisão para marcar proteínas específicas (marcadores), como a triptase ou a quimase, para a identificação dos mastócitos, tal como Monument et al. (2010) utilizaram. Comparando ambas as técnicas, o Azul de Toluidina oferece vantagem porque alia especificidade e baixo custo, ainda que não tenha a precisão da imuno-histoquímica.

Cápsulas articulares saudáveis possuem baixo número de mastócitos (HILDEBRAND et al., 2008b), assim como constatado nesse estudo. Raros campos observados continham um mastócito e, em determinados cortes nenhum exemplar foi visibilizado. Em cápsulas lesionadas esse número pode variar, assim como relatado por Monument et al. (2010), que observaram um aumento no número de mastócitos em cápsulas com contratura pós-traumática.

¹³ Sigma, São Paulo, SP

Devido ao baixo número dos tipos celulares estudados, não se avaliou histomorfometricamente miofibroblastos ou mastócitos.

Reações inespecíficas aconteceram na marcação imuno-histoquímica (Figura 3) na região em que poderiam ser localizados os miofibroblastos. Como as artérias (músculo liso) da cápsula e o controle positivo (cérvice) foram satisfatoriamente marcados (Figuras 1 e 2), então outros estudos deverão ser conduzidos para a confirmação da presença do miofibroblasto em cápsulas articulares. Hildebrand et al. (2004) e Abdel et al. (2012) observaram um aumento de quatro a cinco vezes no número de miofibroblastos em cápsulas articulares que apresentaram contratura pós-traumática. Portanto, estudos posteriores que avaliem cápsulas articulares lesionadas de ovinos poderão confirmar a presença desse tipo celular nesse tecido.

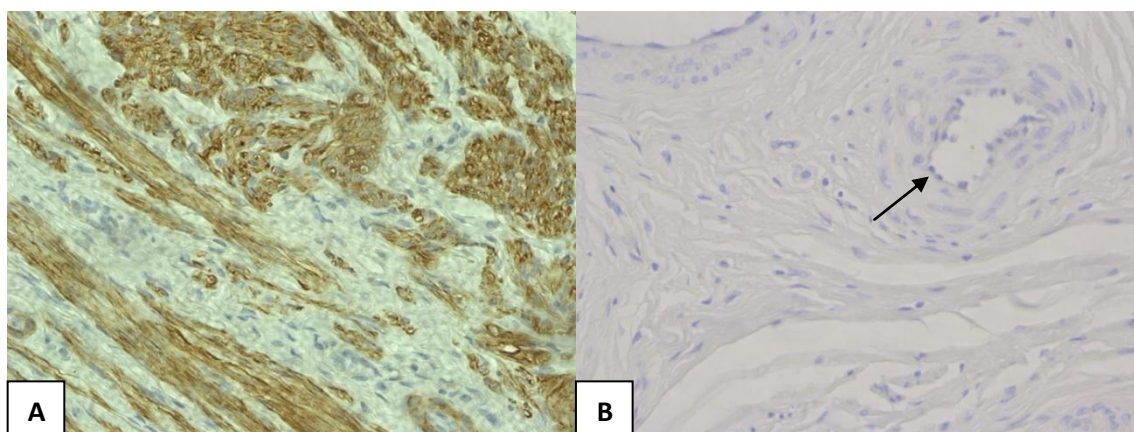


Figura 1 – Fotomicrografia dos controles positivo (A) e negativo (B) da técnica de imuno-histoquímica. Em A nota-se fibras musculares longitudinais e transversais marcadas na cérvice ovina e em B observa-se apenas os núcleos marcados com a contracoloração de Hematoxilina de Harris, inclusive na região de uma artéria (seta). A e B, aumento de 400x.

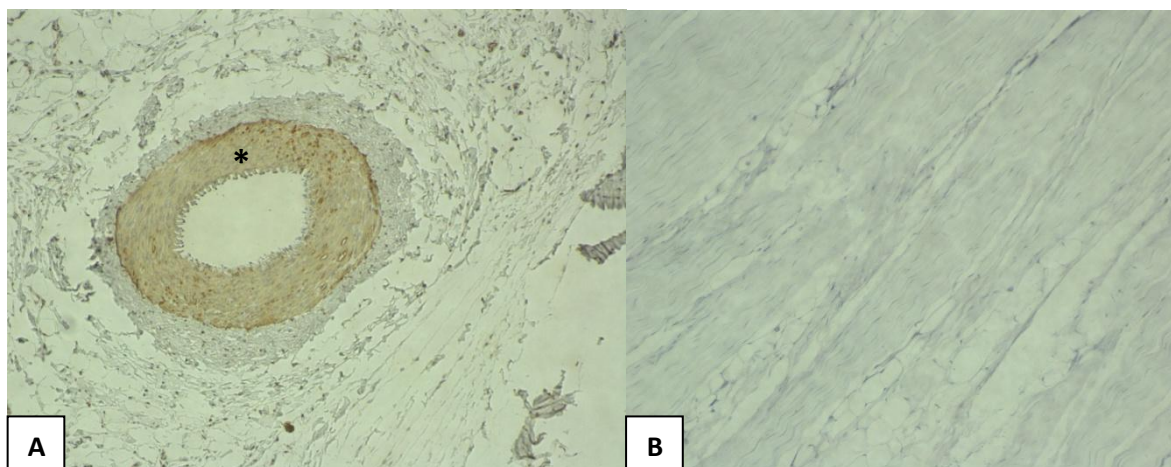


Figura 2 – Fotomicrografias de cápsula articular de joelho ovino marcadas pela imuno-histoquímica e contracoradas pela Hematoxilina de Harris (A) e coradas pelo Azul de Toluidina (B). Observa-se que em A a musculatura lisa da artéria (*) foi marcada pela imuno-histoquímica e a região perivascular teve integridade comprometida pelas etapas da técnica, comparativamente ao corte de cápsula corada pela técnica de Azul de Toluidina (B). A e B, aumento de 100x.

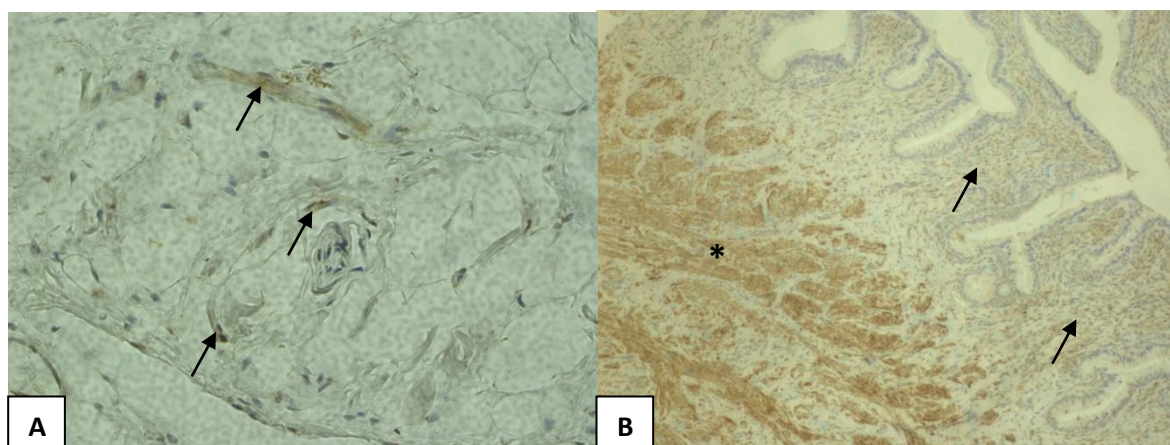


Figura 3 – Fotomicrografias de cápsula articular de joelho de ovelha (A) e cervice de ovelha (B) marcadas pela imuno-histoquímica e contracoradas pela Hematoxilina de Harris. As setas indicam reações inespecíficas à marcação de α -SMA e em B nota-se que a musculatura lisa da cervice encontra-se corada em maior intensidade (*) do que a coloração inespecífica (seta). A, aumento 400x. B, aumento de 100x.

Conclusão

O número de mastócitos encontrado em cápsula articular sadia do joelho de ovinos é baixo, porém estudos sobre cápsulas articulares lesionadas de ovinos devem ser conduzidos para confirmar a presença de miofibroblastos e avaliar a variação do número das células analisadas e a patofisiologia do desenvolvimento da contratura articular.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) e aos pesquisadores do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal, SP, pelo fundamental apoio técnico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.S.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; VERINAUD, L.M.C.; ARNS, C.W. Bovine respiratory syncytial virus: immunohistochemical detection in mouse and bovine tissues using a Mab against human respiratory syncytial virus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.6, p.973-981, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000041&pid=S0102-0935200900040002800001&lng=en>. Acesso em: 15 de abril de 2013.
- APPLEYARD, R. C., GHOSH, P., SWAIN, M. V. Biomechanical, histological and immunohistological studies of patellar cartilage in an ovine model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy. **Osteoarthritis and Cartilage**. v.7, p. 281–294, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329303>>. Acesso em: 16 de abril de 2013.
- CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2001000300001> Acesso em: 25 de maio de 2012.
- COHEN M.S., HASTINGS I.H. Post-traumatic contracture of the elbow. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 80B, p. 805-812, 1998. Disponível em: <<http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/80-B/5/805.full.pdf>> . Acesso em: 21 de novembro de 2011.
- DAWSON, M. Pathogenesis of maedi-visna. **Veterinary Record**. v. 120, n.19, p. 451-454. 1987. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/120/19/451.abstract>> .Acesso em: 20 de novembro de 2011.
- HILDEBRAND K.A. et al. Myofibroblast numbers are elevated in human elbow joint capsules following trauma. **Clinical Orthopaedics**. v.419, p.189-197. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15021153>> . Acesso em: 21 de novembro de 2011.
- HILDEBRAND K.A., ZHANG M., HART D.A. Myofibroblast upregulators are elevated in joint capsules in post traumatic contractures. **Clinical Orthopaedics**. v. 456, p.85-91, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195814>> . Acesso em: 20 de novembro de 2011.
- HILDEBRAND, K.A. et al. Cellular, matrix and growth factor components of the joint capsule are modified early in the process of post-traumatic contracture formation in a rabbit model. **Acta Orthopaedica**. v.79, n.1, p.116-125, 2008a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18283583>> . Acesso em: 22 de novembro de 2011.
- HILDEBRAND, K.A. et al. Joint Capsule Mast Cells and Neuropeptides are increased within Four Weeks of injury and remain elevated in Chronic stages of Post traumatic Contractures. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 26, n.10, p. 1313-1319, 2008b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404724>> . Acesso em: 22 de novembro de 2011.
- HILDEBRAND, K.A.; ZHANG, M.; HART, D.A. High rate of joint capsule matrix turnover in chronic human elbow contractures. **Clinical Orthopaedics**.v. 439, p.228-234, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950173/>> Acesso em: 20 de novembro de 2011.

2011.

HOLY, C. E.; et al. In vivo models for bone tissue-engineering constructs. In: Davies J, (Ed). **Bone Engineering**. Toronto: Copyright. p. 496-504, 2000.

HÜBNER, S.O.; PESCADOR, C.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Otimização da imunoistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados com formaldeído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, n.1, p.1-6, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0102-09352005000100001&script=sci_arttext > . Acesso em: 15 de mai. de 2013.

LIMA, R.S. et al. Detecção imunoistoquímica de receptores de estrógeno e progesterona no endométrio de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o anestro pós-parto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.791-798, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352011000400001&script=sci_arttext > . Acesso em: 15 de mai. de 2013.

MONUMENT, M. J. et al. The mast cell stabilizer ketotifen, significantly reduces contracture severity and molecular manifestations of joint capsule fibrosis in a rabbit model of posttraumatic joint contractures. **The Journal of bone and joint surgery**. American. v. 92, n.6, p.1468-1477, 2010. Disponível em: < http://www.bjjprocs.boneandjoint.org.uk/content/93-B/SUPP_III/243.3.short > . Acesso em: 10 de mai. de 2013.

MORREY B.F., ASKEW L.J., CHAO E.Y. A biomechanical study of normal functional elbow motion. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v.63A, p.872-877, 1981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7240327> > . Acesso em: 10 de mai. de 2013.

ONU 2013. **Pior seca dos últimos 50 anos no nordeste brasileiro confirma estatísticas da onu sobre escassez**. Disponível em: <<http://www.onu.org.br/pior-seca-dos-ultimos-50-anos-no-nordeste-brasileiro-confirma-estatisticas-da-onu-sobre-escassez/> > . Acesso em: 22 mai. 2013.

SPADARI, A. et al. Effects of intraarticular treatment with stanozolol on synovial membrane and cartilage in an ovine model of osteoarthritis. **Research in Veterinary Science**. v. 94, p. 379–387, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528812003797> > . Acesso em: 22 de mai. 2013.

TAPPER, J.E. et al. In vivo measurement of the dynamic 3-D kinematics of the ovine stifle joint. **Journal of Biomechanical Engineering**. v.126, p.301-305, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15179862> > . Acesso em: 20 de novembr. 2011.

TIMMERMAN L., ANDREWS J. Arthroscopic treatment of posttraumatic elbow pain and stiffness. **The American Journal of Sports Medicine**. v.22, p.230-235. 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8198192> > . Acesso em: 20 de novembr. 2011.

TOLOSA, E. M. C; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2 ed. São Paulo: Manole, p.331, 2003.

VOLPATO, R. et al. Imunoistoquímica de útero e cérvix de cadelas com diagnóstico de piometra. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP-Botucatu). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64, n.5, p.1109-1117, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352012000500004&script=sci_arttext > . Acesso em: 20 de mai. 2013.

ZUCCARI, D.A.P.C., et al. Polachini Immunohistochemical and molecular expression of laminin-332 gamma-2 chain in canine mammary tumors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.1, p.28-35, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000100005 > . Acesso em: 20 de mai. 2013.

6 ANEXO



(<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/about/submissions#authorGuidelines>)

DIRETRIZES PARA AUTORES

Os trabalhos podem ser redigidos em português, inglês. Os nomes dos autores, bem como a filiação institucional de cada um dos mesmos, devem ser inseridos nos campos adequados a serem preenchidos durante a submissão, e não devem aparecer no arquivo. Ciência Animal Brasileira sugere que o número máximo de autores por artigo seja de 6 (seis). Artigos com número superior a 6 (seis) serão considerados exceções e avaliados pelo Conselho Editorial e, se necessário, solicitada a correção. O não atendimento de tal proposta pode implicar em recusa de sua publicação. Sugere-se um número máximo de 20 páginas e as figuras, gráficos e tabelas devem ser colocados no corpo do texto onde forem citados. É importante ressaltar que pesquisas feitas com animais devem citar a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da instituição onde foi realizada a pesquisa. A falta dessa aprovação impede a publicação do artigo. Os textos devem ser organizados da seguinte forma:

Para submissões em português:

Título em português: Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito;

Resumo: Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado, com um máximo de 200 palavras;

Palavras-chave: idem, e no máximo 5 palavras chave;

Título em inglês: Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado;

Abstract (e não Summary): Fonte Times New Roman 11, espaço 1, justificado;

Keywords: idem

Introdução: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Material e Métodos: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Resultados e Discussão: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Preferivelmente evitar a separação destes tópicos)

Conclusões: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Agradecimentos: (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Referências: (e não bibliografia) Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo. As referências devem estar em ordem alfabética pelo sobrenome do primeiro autor, seguindo a NBR 6023, da ABNT. Não colocar nenhum tipo de recuo no parágrafo.

Para as submissões em língua inglesa, a tipografia e espaçamentos são os mesmos, na seguinte sequência:

Título em inglês (Title);

Abstract;

Keywords;

Título em português (obrigatório);

Resumo em português (obrigatório);

Palavras-chave;

Introduction;

Material and Methods;

Results and Discussion;

Conclusions;

Acknowledgments (opcional)

References

Artigos do tipo Nota Científica, Relato de Caso e similares não estão sendo aceitos para submissão. **Artigos de Revisão de Literatura** somente serão publicados quando solicitados por convite do Conselho Editorial.

A utilização de referências a partir de resumos simples ou expandidos e trabalhos completos em anais de eventos é, em muitas ocasiões, de difícil recuperação. Solicitamos que os autores reduzam ao máximo o número desse tipo de citação e, quando o fizer, obrigatoriamente, citem as páginas eletrônicas para recuperação desses documentos.

Com relação às teses, dissertações, monografias e documentos semelhantes também deve ser seguido o mesmo procedimento, pois existe o cadastro nacional de teses da CAPES e os bancos locais das universidades que publicam esses documentos no formato .pdf. Documentos dessa natureza com mais de cinco anos de conclusão costumam ser de difícil resgate. Além do mais, costumam gerar artigos em revistas científicas e técnicas, cujo acesso, normalmente, é mais fácil. Solicita-se, também, priorizar referências de periódicos, e não de livros-texto. O editor científico pode solicitar essas informações no momento de sua editoração. Seu atendimento agilizará a sua publicação. O processo de resgate fácil das informações é o ponto principal de uma referência bibliográfica, técnica ou eletrônica.

Exemplos de referências

Trabalho em Periódicos:

PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. FRANCO, S. L.; PRADO, I. N. do; JACOBI, G. Efeito da adição de própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminais em bubalinos alimentados com dietas a base de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.2055-2065, 2010.

Livros:

BURLEY, R.W.; VADEHRA, D.V. **The Avian Egg: Chemistry and Biology**. John Wiley and Sons, New York, NY, 372p, 1989. p 68–71.

CONDIÇÕES PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
2. Os autores devem estar cientes de que são os responsáveis diretos por todo o conteúdo de seu artigo.
3. Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapasse os 2MB). No arquivo da submissão, excluir apenas os nomes e identificação dos autores, todos os outros elementos (título em português e em inglês, resumo, palavras chave, abstract e key words) devem permanecer no arquivo. O preenchimento do cadastro inclui todos os autores envolvidos (máximo de 6 autores), selecionando o contato principal. Atentar para o item 6 destas normas.
4. Todos os endereços de URLs no texto (Ex.: <http://www.ibict.br>) estão ativos e prontos para clicar.
5. O texto está em espaço 1,5 com linhas numeradas; usa uma fonte de 12-pontos Times New Roman; emprega itálico ao invés de sublinhar (exceto em endereços URL); com figuras e tabelas inseridas no texto, e não em seu final.
6. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na seção Sobre a Revista.

7. A identificação de autoria deste trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos). Os nomes de TODOS os autores, com sua respectiva identificação institucional, foi cadastrada nos metadados da submissão, usando a opção incluir autor. Em caso de citação de autores, "Autor" e ano são usados na bibliografia, ao invés de Nome do autor, título do documento, etc.
8. Nos casos de artigos que envolvam pesquisa com animais, é obrigatória a inserção da aprovação pelo Comitê de Ética da instituição de origem do trabalho

DECLARAÇÃO DE DIREITO AUTORAL

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

- a. Autores mantém os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a [Licença Creative Commons Attribution](#) que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.
- b. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.
- c. Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja [O Efeito do Acesso Livre](#)).

POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.