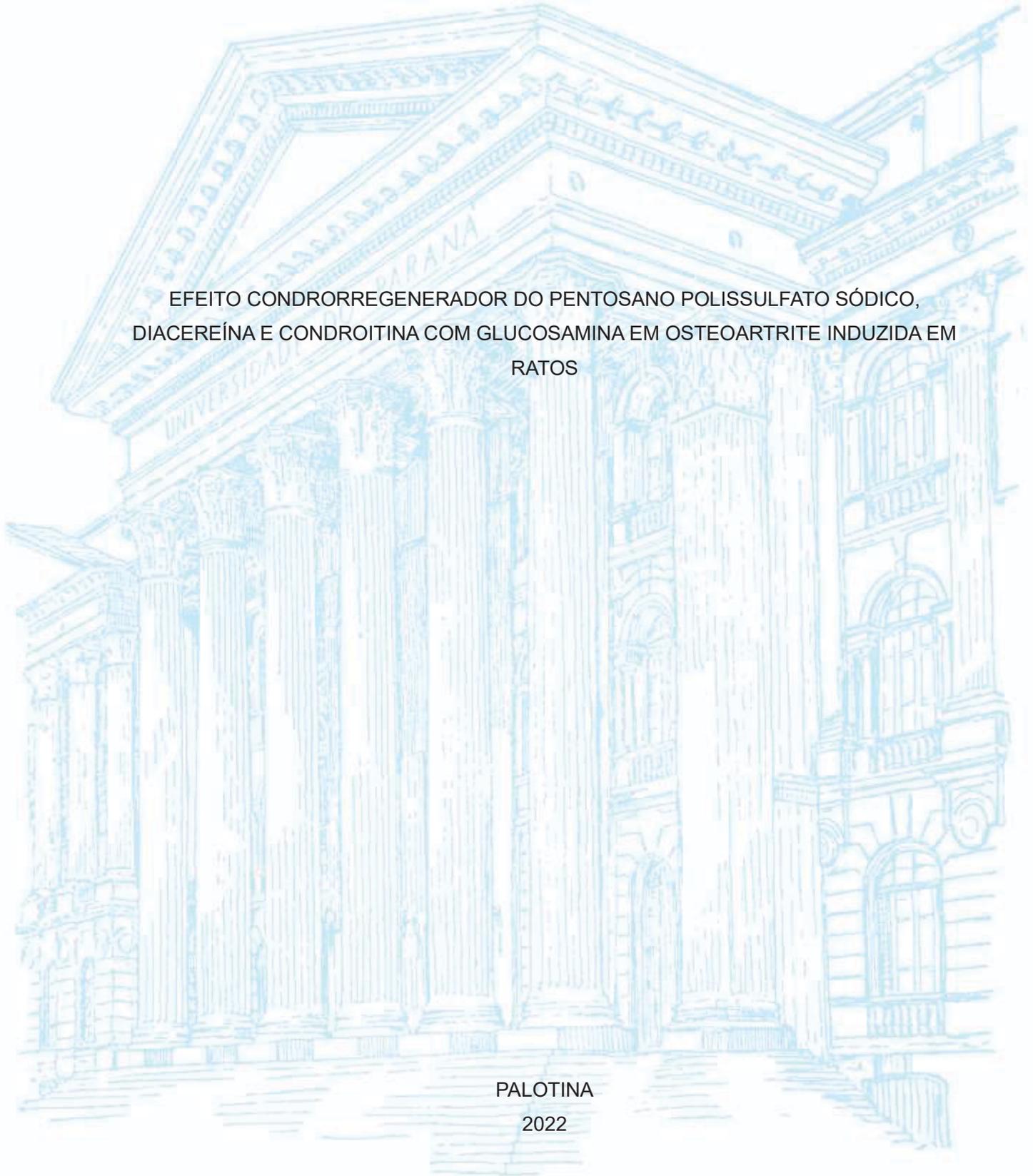


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SOLIMAR DUTRA DA SILVEIRA

EFEITO CONDRORREGENERADOR DO PENTOSANO POLISSULFATO SÓDICO,  
DIACEREÍNA E CONDROITINA COM GLUCOSAMINA EM OSTEOARTRITE INDUZIDA EM  
RATOS

PALOTINA  
2022



SOLIMAR DUTRA DA SILVEIRA

EFEITO CONDRORREGENERADOR DO PENTOSANO POLISSULFATO SÓDICO,  
DIACEREÍNA E CONDROITINA COM GLUCOSAMINA EM OSTEOARTRITE INDUZIDA EM  
RATOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Olicies da Cunha.

PALOTINA

2022

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.  
Biblioteca UFPR Palotina.

S587 Silveira, Solimar Dutra da  
Efeito condrorregenerador do pentosano polissulfato sódico,  
diacereína e condroitina com glucosamina em osteoartrite induzida  
em ratos / Solimar Dutra da Silveira. – Palotina, PR, 2022.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,  
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.  
Orientador: Prof. Dr. Olicies da Cunha.

1. Artropatia. 2. Condroprotetores. 3. Osteoartrose.  
I. Cunha, Olicies da. II. Universidade Federal do Paraná.  
III. Título.

CDU 591.8

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -  
40001016077P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **SOLIMAR DUTRA DA SILVEIRA** intitulada: **EFEITO CONDRORREGENERADOR DO PENTOSANO POLISSULFATO SÓDICO, DIACERÉINA E CONDROITINA COM GLUCOSAMINA EM OSTEOARTRITE INDUZIDA EM RATOS**, sob orientação do Prof. Dr. OLICIES DA CUNHA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 30 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica

30/08/2022 22:40:11.0

OLICIES DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/08/2022 09:38:06.0

MARILENE MACHADO SILVA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/08/2022 09:15:03.0

PAULO TADEU FIGUEIRA

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVEL)

---

R. Pioneiro, 2153 - PALOTINA - Paraná - Brasil

CEP 85950-000 - Tel: (44) 3211-8529 - E-mail: ppgca.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 219050

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 219050

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Solimar Dutra da Silveira, filho de Dirlei Ivete Sampaio Dutra da Silveira e Oscar Ramos da Silveira, nasceu na cidade de Salto do Lontra – PR, no dia 02 de julho de 1995.

Iniciou em fevereiro de 2014 o curso de graduação em Medicina Veterinária, na Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Campus Toledo, obtendo o título de Médico Veterinário em fevereiro de 2019.

Em março de 2019, iniciou no Programa de Residência Multiprofissional na área de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, concluindo em fevereiro de 2021.

Em março de 2021, ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* Ciência Animal, na Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida.

A minha esposa Denise de Moraes Silveira, por todo incentivo, compreensão e dedicação ao longo de todo o período de mestrado.

Aos meus pais Dirlei Ivete e Oscar, por me incentivarem desde a época da graduação em continuar meus estudos e poder um dia me tornar professor.

Aos meus irmãos Tiago e Bruno, por serem meu impulso de dedicação e me fazerem lutar por um mundo melhor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Olicies da Cunha, por todos os ensinamentos, conselhos e anos de amizade que se estendem desde a época de estágio, posterior residência e agora mestrado.

Aos meus queridos colegas de trabalho e minha equipe sensacional de estagiários da Univel: Prof. Paulo, Prof.<sup>a</sup> Ju Druzi, Prof.<sup>a</sup> Ju Sipp, Prof.<sup>a</sup> Lu Wolfran, Prof.<sup>a</sup> Carol, Prof.<sup>a</sup> Greice, Prof. Edvaldo, Fernanda, Mayara, Marcela, Braian e Gabriel. Sem vocês esse projeto não teria ocorrido, obrigado!

Ao Centro Universitário Univel pela disponibilidade de uso de toda estrutura durante a execução do projeto, além disso, por ser meu lar e meu orgulho diário de fazer parte dessa instituição que me acolheu e me tornou professor. Eternamente grato!

A Universidade Federal do Paraná por ter me acolhido desde a época de residência e agora no mestrado, permitindo dar sequência ao meu sonho da docência. É imenso o orgulho em fazer parte desta instituição.

## RESUMO

A osteoartrite refere-se a uma combinação de eventos patológicos envolvendo articulações sinoviais, caracterizados por degeneração progressiva de cartilagens, remodelamento óssea subcondral e sinovite. Por se tratar de uma doença de origem multifatorial, crônica e progressiva, seu tratamento busca por meio de fármacos e terapias não cirúrgicas o controle de dor, a manutenção da função e amplitude de movimentos articulares, além do retardo na progressão das lesões cartilagueas e dos tecidos anexos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade condrorregeneradora de Sulfato de Condroitina A com Glucosamina, Diacereína e Polissulfato de Pentosano Sódico em osteoartrite induzida por aplicação de Monoiodoacetato de Sódio em ratos Wistar. No total, foram estudados 40 animais da espécie *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar albino), independente do sexo, com cinco semanas de idade e peso médio inicial de  $98 \pm 12$  gramas. A indução das lesões articulares foi realizada por aplicação única do fármaco na articulação femorotibiopatelar direita, após anestesia geral e radiografia do membro para descarte de alterações prévias. Decorrido 14 dias da indução, os animais foram reavaliados radiograficamente e categorizados em quatro diferentes grupos para início da fase terapêutica: GC (grupo controle), GCG (Sulfato de Condroitina A e Glucosamina na dose de 400 e 500mg/kg a cada 24 horas), GD (Diacereína na dose de 50mg/kg a cada 24 horas), ambos por 21 dias consecutivos e GPPS (Pentosano Polissulfato Sódico na dose de 20 µg/g por semana). Ao término dos 21 dias propostos de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia, com posterior coleta de fragmento articular e análise histopatológica para determinação da presença ou ausência de lesões indicativas de OA. A partir disso, os achados dos exames histológicos foram compilados, seguido pela determinação do grau de lesão articular com base em recomendações da Sociedade Internacional de Pesquisa em Osteoartrite (OARSI) e tratamento estatístico dos dados. Considerando o potencial de lesão articular, a aplicação do indutor utilizado no estudo foi eficientemente capaz de estimular lesões histológicas características de OA. Entretanto, com relação aos tratamentos, a ação terapêutica dos fármacos administrados por um período de três semanas consecutivas não foi estatisticamente significativa em promover condrorregeneração detectável a nível histopatológica.

Palavras-chave: Artropatia. Condroprotetores. Doença articular degenerativa. Osteoartrose.

## ABSTRACT

Osteoarthritis refers to a combination of pathological events involving synovial joints, characterized by progressive cartilage degeneration, subchondral bone remodeling, and synovitis. Since it is a disease of multifactorial, chronic and progressive origin, its treatment seeks, by means of drugs and non-surgical therapies, to control pain, maintain function and range of joint movement, and delay the progression of cartilage lesions and adnexal tissues. Thus, the present study aimed to evaluate the chondrorregenerative capacity of Chondroitin Sulfate A with Glucosamine, Diacerein and Pentosan Polysulfate Sodium in osteoarthritis induced by application of Sodium Monoiodoacetate in Wistar rats. A total of 40 animals of the species *Rattus norvegicus* (Wistar albino lineage), independent of sex, with five weeks of age and mean initial weight of  $98 \pm 12$  grams, were studied. The induction of joint lesions was performed by a single application of the drug in the right femorotibiopatellar joint, after general anesthesia and radiography of the limb to rule out previous alterations. After 14 days of induction, the animals were reassessed radiographically and categorized into four different groups to start the therapeutic phase: CG (control group), GCG (Chondroitin Sulfate A and Glucosamine 400 and 500 mg/kg, every 24 hours), GD (Diacerein 50 mg/kg, every 24 hours), both for 21 consecutive days, and GPPS (Sodium Pentosan Polysulfate 20  $\mu$ g/g per week). At the end of the 21 days of treatment, the animals were euthanized, with subsequent collection of joint fragments for histopathological analysis to determine the presence or absence of lesions indicative of OA. From that, the histological findings were compiled, followed by determination of the degree of joint injury based on recommendations of the International Osteoarthritis Research Society (OARSI) and statistical treatment of the data. Considering the potential for joint injury, the application of the inducer used in the study was efficiently able to stimulate histological lesions characteristic of OA. However, with regard to the treatments, the therapeutic action of the drugs administered for a period of three consecutive weeks was not statistically significant in promoting histopathologically detectable chondroregeneration.

Keywords: Arthropathy. Chondroprotectors. Degenerative joint disease. Osteoarthritis.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - APLICAÇÃO INTRA-ARTICULAR (FEMOROTIBIOPATELAR DIREITA) DE MONOIODOACETATO DE SÓDIO PARA ESTÍMULO INFLAMATÓRIO E DESENVOLVIMENTO DE OA EM RATO WISTAR.....	24
FIGURA 2 - ADMINISTRAÇÃO DE SUSPENSÃO FARMACOLÓGICA POR VIA ORAL EM RATO WISTAR SOB TRATAMENTO EXPERIMENTAL PARA OA .....	26
FIGURA 3 - PROCEDIMENTO DE ARTROTOMIA FEMOROTIBIOPATELAR DIREITA E COLETA DE CARTILAGEM ARTICULAR (SETA PRETA) PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A INDUÇÃO DE OA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL .....	27
FIGURA 4 - AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE ARTICULAÇÕES FEMOROTIBIOPATELARES DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A INDUÇÃO QUÍMICA DE OA, EM INCIDÊNCIA CRÂNIO-CAUDAL. OBSERVA-SE EVIDENTE DIMINUIÇÃO DE ESPAÇO ARTICULAR, CALCIFICAÇÃO DE LIGAMENTO PATELAR E OSTEÓFITOS NO MEMBRO PÉLVICO DIREITO, O QUE CARACTERIZA OSTEOARTRITE (SETA BRANCA). .....	31
FIGURA 5 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE CARTILAGEM ARTICULAR DE RATO WISTAR SUBMETIDO A INDUÇÃO DE OA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM SULFATO DE CONDROITINA E GLUCOSAMINA. OBSERVA-SE POR MICROSCOPIA ÓPTICA LÂMINA CORADA COM HE EM AUMENTO DE 40X, INDICANDO PRESENÇA DE FIBRILAÇÃO E EROSÕES SUPERFICIAIS LOCALIZADAS AO LONGO DA CARTILAGEM HIALINA (SETAS PRETAS) .....	33
FIGURA 6 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE CARTILAGEM ARTICULAR DE RATO WISTAR SUBMETIDO A INDUÇÃO DE OA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM SULFATO DE CONDROITINA E GLUCOSAMINA. OBSERVA-SE POR MICROSCOPIA ÓPTICA LÂMINA CORADA COM HE EM AUMENTO DE 40X, INDICANDO PRESENÇA EVIDENTE DE PROLIFERAÇÃO DE CONDRÓCITOS (SETAS PRETAS) .....	34
FIGURA 7 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE CARTILAGEM ARTICULAR DE RATO WISTAR SUBMETIDO A INDUÇÃO DE OA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM PENTOSANO POLISSULFATO SÓDICO. OBSERVA-SE POR MICROSCOPIA ÓPTICA LÂMINA CORADA COM HE EM AUMENTO DE 40X, INDICANDO PRESENÇA DE CONDRÓCITOS COM NÚCLEO PICNÓTICOS, INDICATIVO DE NECROSE CELULAR (SETAS PRETAS). .....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - REPRESENTAÇÃO DE GRADUAÇÃO DE OA (0 – 6) EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A INDUÇÃO DA DOENÇA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
--	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA QUANTO AO GRAU DE OA, SEGUNDO OS PRINCÍPIOS DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE PESQUISA EM OSTEOARTRITE (OARSI) .....	28
TABELA 2 - VARIÁVEIS CATEGÓRICAS OBTIDAS POR MEIO DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM RATOS WISTAR COM OA E TRATADOS COM DIFERENTES FÁRMACOS MODIFICADORES DE OSTEOARTRITE.....	32
TABELA 3 - GRADUAÇÃO DE OA EM RATOS APÓS ANÁLISE DE VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS E DETERMINAÇÃO DE ESCORE LESIONAL.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AINES	- Anti-Inflamatório Não Esteroidal
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
DAD	- Doença Articular Degenerativa
DMOAs	- Drogas Modificadores de Osteoartrite
GAGs	- Glicosaminoglicanos
GC	- Grupo Controle
GCG	- Grupo Sulfato de Condroitina A com Glucosamina
GD	- Grupo Diacereína
GPPS	- Grupo Polissulfato de Pentosano Sódico
IL	- Interleucina
MIA	- Monoiodoacetato de Sódio
NaCl	- Cloreto de sódio
O <sub>2</sub>	- Oxigênio
OA	- Osteoartrite
PPS	- Polissulfato de Pentosano Sódico
TNF	- Fator de Necrose Tumoral

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 OSTEOARTRITE.....	16
1.1.1 Sinais clínicos.....	17
1.1.2 Diagnóstico.....	18
1.1.3 Tratamento .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>22</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 APROVAÇÕES.....	23
4.2 ANIMAIS.....	23
4.3 INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE .....	23
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	24
4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	26
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OSTEOARTRITE

Podemos conceituar como articulação uma estrutura anatômica composta por cartilagem, osso subcondral, cápsula articular, fluído sinovial e ligamentos associados. Sua função e higidez correlaciona-se diretamente à saúde de inúmeras outras estruturas e órgãos, incluindo os tecidos musculares, ósseos e tendíneos (KÖNIG e LIEBICH, 2016; SCHULZ, HAYASHI e FOSSUM, 2018).

A osteoartrite (OA), osteoartrose ou ainda denominada doença articular degenerativa (DAD) refere-se à combinação de eventos patológicos envolvendo articulações sinoviais, caracterizados por degeneração progressiva de cartilagens, remodelamento óssea subcondral e sinovite (SIMON e JACKSON, 2006; LAADHAR et al., 2007).

A cartilagem articular é um tecido constituído por células denominadas condrócitos, circundadas por matriz extracelular constituída por colágeno tipo II, ácido hialurônico, proteoglicanos, glicoproteínas e água. Durante o processo degenerativo, este tecido acaba sendo alvo para instauração de lesões devido suas particularidades anatômicas como ausência de rede capilar e suporte de nutrientes e oxigênio exclusivamente por difusão a partir do fluxo dinâmico do líquido sinovial e osso subcondral (PRITZKER et al., 2006). Como importância clínica, ressalta-se que a OA não se limita apenas a alterações em cartilagem articular, mas também incide em estruturas adjacentes como ligamentos, membrana sinovial, meniscos e músculos periarticulares (DeCAMP et al., 2015).

Trata-se de uma das principais afecções ortopédicas de todos os mamíferos, acometendo principalmente cães, equinos e o homem (BROOKS, 2002; RASERA et al., 2007; LEITE, 2011). Com isso, atribui-se o desenvolvimento da OA como resultado de eventos mecânicos e biológicos, incluindo predisposição genética, obesidade e consequente sobrecarga articular, enfermidades metabólicas, processos traumáticos e do desenvolvimento (degenerativo) (ANDERSON et al., 2018; LAMANI et al., 2019).

Ainda com base na origem da OA, ela pode ser classificada em primária, referenciando exclusivamente quadros degenerativos crônicos, e secundária quando desenvolvida em decorrência de condições pré-existentes. Em animais, relata-se uma

alta correlação entre rupturas ligamentares e tendinopatias com o desenvolvimento da OA secundária, estando a doença primária principalmente associada a pacientes de meia vida a idosos, sem histórico de comorbidades do sistema musculoesquelético (DeCAMP et al., 2015; SANDELL, 2012).

Com relação a fisiopatologia da OA primária, acredita-se que por estímulos mecânicos, crônicos e direcionados a uma zona focal articular, instaura-se um processo inflamatório com liberação de enzimas proteolíticas como interleucinas (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e catepsinas (YEATER et al., 2022). Em consequência, nota-se a presença de sinovite secundária, modificações das moléculas de matriz cartilaginosa, diminuição do número de condrócitos, menor retenção de água intra-articular e fibrilação (formação de fissuras) da matriz hialina (PRITZKER et al., 2006).

Da mesma forma, simultaneamente aos eventos supracitados, na tentativa de reparo da injúria articular instalada o organismo passa a mobilizar tecido regenerativo de forma desordenada para o local, o que acaba não sendo fisiologicamente significativo devido a presença de enzimas degradativas associada muitas vezes a instabilidade articular, tendo como consequência a evolução do quadro para erosão cartilágnea, esclerose subcondral, formação de osteófitos e entesófitos (GOLDRING e GOLDRING, 2010; LAADHAR et al., 2007).

### 1.1.1 Sinais clínicos

Em medicina veterinária a maior parte dos estudos relacionados a OA diz respeito a cães, sendo pouco descrita em gatos. Entre os principais sinais clínicos, incluem-se dor evidenciada por claudicação e sensibilidade à palpação, rigidez articular, deformidade e perda da função do membro (DeCAMP et al., 2015; SANDELL, 2012).

Os mecanismos atribuídos a dor são multifatoriais, estando relacionados a inflamação, degradação da cartilagem com exposição de inervação subcondral, sinovite e distensão do periósteo por osteófitos e da cápsula articular (CASTRO et al., 2006).

A rigidez articular relaciona-se principalmente a mobilização de tecido cicatricial desordenado e consequente fibrose intra e periarticular, culminando em menor amplitude de movimentação do membro e sobrecarga de articulações contralaterais (DeCAMP et al., 2015).

Com o agravamento do quadro observa-se menor uso do membro afetado, diminuição de força muscular em consequência de atrofia e evolução para perda da função mecânica parcial ou total, limitando as atividades diárias do animal e piora da qualidade de vida (SCHULZ et al., 2018).

### 1.1.2 Diagnóstico

Devido a OA primária apresentar caráter de desenvolvimento lento e crônico, raramente a enfermidade é identificada na fase inicial (MOSHER et al., 2013). Para diagnóstico, o histórico detalhado, avaliação física geral e ortopédica associado a exames complementares como radiografia, ultrassonografia, artroscopia, tomografia computadorizada e ressonância magnética permitem identificar alterações intra-articulares, confirmar a doença e excluir possíveis diagnósticos diferenciais (COPPIETERS et al., 2016; RASERA et al., 2007).

Avaliação radiográfica comumente utilizada em medicina veterinária permite a identificação de alterações ósseas intra-articulares, como áreas líticas ou proliferativas, ou ainda a verificação de outras anormalidades que possam estar relacionadas a processos que não sejam OA (RASERA et al., 2007).

Já a ultrassonografia é outra modalidade de diagnóstico para avaliação articular que permite com maior limitação a detecção de anormalidades em cartilagem (zonas erosivas e rompidas), inflamações e rupturas tendíneas, ligamentares e de meniscos (MARINO e LOUGHIN, 2010).

Modalidades avançadas e de maior acurácia para o diagnóstico da OA incluem a artroscopia, tomografia computadorizada e a ressonância magnética, métodos que permitem avaliação de injúrias tanto ósseas quanto de tecidos periarticulares não detectáveis de forma precoce em radiografia convencional (COPPIETERS et al., 2016).

### 1.1.3 Tratamento

Uma vez que a OA primária é uma doença degenerativa, crônica, de origem multifatorial e sem potencial de cura, seu tratamento busca através do uso de fármacos e terapias não cirúrgicas o controle de dor, a manutenção da função e amplitude de movimentos articulares, além do retardo na progressão das lesões cartilagueas e dos tecidos anexos (MILLIS e LEVINE, 2014; RYCHEL, 2010). Já nos casos de OA secundária, recomenda-se o diagnóstico e tratamento cirúrgico precoce da enfermidade base, visando minimizar as consequências do desenvolvimento da doença (DeCAMP et al., 2015).

O tratamento medicamentoso inclui a combinação de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) ou esteroidais com analgésicos, nutracêuticos e drogas modificadoras de osteoartrite (DMOAs) (CALAMIA et al., 2011; VAISHYA et al., 2016).

Fármacos conhecidos como condroprotetores são na verdade compostos nutracêuticos classificados como condromoduladores ou DMOAs devido sua capacidade de retardar ou diminuir a progressão de processos degenerativos envolvendo articulações e suas cartilagens. Esses medicamentos são caracterizados por sua ação lenta e três efeitos primordiais: suprir o aumento do metabolismo dos condrócitos e células sinoviais, inibir enzimas degenerativas presentes no líquido sinovial e matriz cartilaginosa, além de evitar a formação de microtrombos nos vasos que nutrem a articulação (BEALE, 2014; VAISHYA et al., 2016).

Sulfato de condroitina e glucosamina são os compostos nutracêuticos mais utilizados para tratamento de AO em animais (MILLIS e LEVINE, 2014). O sulfato de condroitina é um fármaco nutracêutico com ação anti-inflamatória, capaz de inibir diversas proteases e citocinas danosas à cartilagem articular, além de impedir a depleção de proteoglicanos da matriz, estimular a síntese de ácido hialurônico pelos sinoviócitos e atividade anabólica dos condrócitos (BISHNOI et al., 2016).

Já a glucosamina é uma substância natural presente no corpo dos animais, especialmente em cartilagens, atuando como um dos principais aminoácidos precursores de dissacarídeos dos glicosaminoglicanos (GAGs). Uma vez que os GAGs são os maiores componentes da cartilagem articular, a administração da

glucosamina permite uma redução na degradação de proteoglicanos, inibição da síntese e ação de mediadores inflamatórios (metaloproteinases), óxido nítrico e de prostaglandinas (VASILIADIS e TSIKOPOULOS, 2017).

Outro medicamento usualmente utilizado em processos de OA, a diacereína é uma antraquinona derivada da semente de abacate, com potencial ação inibitória sobre interleucinas responsáveis pela degradação cartilágnea (principalmente IL-1 $\beta$ ), evidenciando efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e anabólicos, estimulando a síntese de proteoglicanos, colágeno e ácido hialurônico (MENDES et al., 2022).

Ainda como alternativa, estudos vem demonstrando potencial ação modificadora de osteoartrite do polissulfato de pentosano sódico (PPS) (FROHBERGH et al., 2014). Este, tem como característica ser um fármaco semissintético, inicialmente utilizado como antitrombótico com posterior emprego na terapêutica de doenças osteoarticulares. Sua ação se dá pela capacidade de supressão de citocinas e fatores pró-coagulantes de leucócitos ativos, estimulação da síntese de ácido hialurônico, do metabolismo de células sinoviais e de condrócitos, tendo como consequência melhora na qualidade do líquido sinovial e integridade da cartilagem articular e osso subcondral (WIJEKOON et al., 2019).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito terapêutico no reparo de lesões osteoarticulares induzidas em ratos Wistar, dos seguintes fármacos:

- Pentosano Polissulfato Sódico;
- Diacereína;
- Sulfato de Condroitina A com Glucosamina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação farmacológica isolada de pentosano polissulfato sódico sobre o reparo de alterações secundárias a osteoartrite induzida por injeção de monoiodoacetato de sódio (MIA) em ratos Wistar.
- Avaliar a ação farmacológica isolada de diacereína sobre o reparo de alterações secundárias a osteoartrite induzida por injeção de monoiodoacetato de sódio (MIA) em ratos Wistar.
- Avaliar a ação farmacológica isolada de sulfato de condroitina A com glucosamina sobre o reparo de alterações secundárias a osteoartrite induzida por injeção de monoiodoacetato de sódio (MIA) em ratos Wistar.
- Comparar a ação farmacológica entre Pentosano polissulfato sódico, Diacereína e Sulfato de Condroitina A com Glucosamina sobre o reparo de alterações secundárias a osteoartrite induzida por injeção de monoiodoacetato de sódio (MIA) em ratos Wistar.
- Determinar um ou mais protocolos terapêuticos condrorregeneradores para osteoartrite em um modelo experimental mundialmente aceito e estudado.

### 3 JUSTIFICATIVA

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa progressiva, cuja característica clínica envolve modificações na cartilagem articular, remodelamento de osso subcondral, diminuição do espaço articular e formação de osteófitos, resultando em diminuição ou perda da função do membro afetado (GOLDRING e GOLDRING, 2010). Acredita-se que cerca de 20% da população canina mundial com idade acima de um ano seja afetada pela AO (JOHNSTON; MCLAUGHLIN e BUDSBERG, 2008).

Considerando que a enfermidade apresenta caráter lento e crônico, suas alterações após instaladas são irreversíveis e impactam negativamente na qualidade de vida dos pacientes, e ainda, os atuais tratamentos disponíveis demonstram controversas em sua real efetividade frente ao processo degenerativo (LOESER, 2013), justifica-se a realização da presente pesquisa pela necessidade de potenciais terapias que resultem em ação condroprotetora e condrorregeneradora, a fim de diminuir a progressão da doença, recuperação dos quadros já instalados e consequente bem-estar aos pacientes e tutores.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 APROVAÇÕES

A presente pesquisa deu seu início após submissão e aprovação junto ao Comitê Setorial de Pesquisa da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do local de execução do projeto (Centro Universitário Univel), sendo este responsável pela autorização sob protocolo nº 001/2022.

### 4.2 ANIMAIS

Para a realização do presente estudo foram utilizadas as dependências do Biotério Experimental de Roedores e Laboratório de Imaginologia Veterinária do Centro Universitário Univel (Campus Cascavel – PR).

No total foram estudados 40 ratos da espécie *Rattus norvegicus* (linhagem Wistar albino), independente do sexo, com cinco semanas de idade e peso médio inicial aproximado de  $98\pm 12$  gramas. Em duplas, os animais foram alocados no biotério em caixas de polipropileno forradas com maravalha, com alimentação (ração peletizada específica para roedores) e água *ad libitum*. A sala de experimentação apresentava controle de temperatura ( $22\pm 2^\circ\text{C}$ ), exaustores e temporizadores para controle de luminosidade, garantindo um ciclo natural claro/escuro de 12/12 horas.

### 4.3 INDUÇÃO DA OSTEOARTRITE

A indução da osteoartrite foi realizada por meio da aplicação intra-articular (articulação femorotibiopatelar direita) do composto monoiodoacetato de sódio (MIA) na dose de 1mg total diluído em 10  $\mu\text{l}$  de solução salina estéril (NaCl a 0,9%).

Inicialmente foi induzida anestesia de todos os animais com isoflurano diluído a 100% de oxigênio em sistema anestésico de circuito aberto, seguida pela manutenção com o mesmo fármaco. Após constatação de plano anestésico adequado, eles foram submetidos a avaliação radiográfica em projeção craniocaudal do membro

a ser estudado para constatação de ausência de doença articular prévia, seguido por tricotomia da região articular, antissepsia com clorexidina tópica a 2% e injeção do MIA com agulha hipodérmica 13x4,5mm, tendo como base anatômica para acesso intra-articular o ligamento patelar (Figura 1). A data do procedimento previamente descrita foi denominada dia zero (D0).

FIGURA 1 – APLICAÇÃO INTRA-ARTICULAR (FEMOROTIBIOPATELAR DIREITA) DE MONOIODOACETATO DE SÓDIO PARA ESTÍMULO INFLAMATÓRIO E DESENVOLVIMENTO DE OA EM RATO WISTAR.



FONTE: O autor (2022).

Após o procedimento, todos os animais receberam controle analgésico por meio de aplicação subcutânea de sulfato de morfina na dose de 3mg/kg a cada 8 horas, totalizando três administrações.

Decorrido 14 dias da indução de OA, os animais foram novamente submetidos a anestesia como previamente relatado, seguido por reavaliação radiográfica para confirmação do desenvolvimento de alterações osteoarticulares que condiziam com osteoartrite.

#### 4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após a indução de osteoartrite, os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos amostrais:

- Grupo Controle (GC, n=10): animais não receberam nenhum tratamento.
- Grupo Pentosano polissulfato sódico (GPPS, n=10): animais receberam três aplicações do fármaco Pentosano Polissulfato Sódico por via subcutânea com intervalos de sete dias entre cada administração. A dosagem utilizada foi de 20 µg/g diluída em solução fisiológica (NaCl 0,9%) até volume total de 0,1 ml.
- Grupo Diacereína (GD, n=10): animais receberam Diacereína na dosagem de 50mg/kg, por via oral a cada 24 horas, durante 21 dias consecutivos.
- Grupo Sulfato de Condroitina A e Glucosamina (GCG, n=10): animais receberam Sulfato de Condroitina A associada a Glucosamina na dosagem de 400 e 500mg/kg respectivamente, por via oral a cada 24 horas, durante 21 dias consecutivos.

Com intuito de promover menor interferência possível nos resultados do projeto, ao longo do estudo todos os pacientes receberam os mesmos estímulos físicos e sensoriais promovidos pela equipe pesquisadora e pelo ambiente experimental.

Os protocolos terapêuticos foram iniciados após 14 dias da indução da OA. Previamente a isso, os fármacos correspondentes aos grupos GD e GCG foram manipulados em suspensão líquida sabor doce de leite, totalizando um volume de 0,2 ml a ser administrado por animal, diariamente. Da mesma forma, para os grupos GC e GPPS foi realizada manipulação de uma suspensão saborizada sem acréscimo de medicamento, garantindo assim um manejo diário e igualitário de todos os roedores.

Uma vez que as dosagens dos fármacos manipulados foram calculadas em mg/kg, semanalmente todos os animais eram submetidos à pesagem, obtenção de escore médio, recálculo das dosagens e remanipulação dos princípios ativos, assegurando sempre um volume final de 0,2 ml total das suspensões de uso oral.

FIGURA 2 - ADMINISTRAÇÃO DE SUSPENSÃO FARMACOLÓGICA POR VIA ORAL EM RATO WISTAR SOB TRATAMENTO EXPERIMENTAL PARA OA.



FONTE: O autor (2022).

Da mesma forma, as aplicações do fármaco correspondente ao grupo GPPS semanalmente eram recalculadas com base no peso médio atualizado, atentando-se na diluição do medicamento em solução fisiológica (NaCl 0,9%) até o volume total de 0,1 ml. Frente a esse manejo, os demais grupos também receberam estímulo por injeção de solução fisiológica (0,1 ml) a cada sete dias, pela mesma via e local de administração.

#### 4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Após 35 dias da indução de osteoartrite e 21 dias de tratamento, todos os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de isoflurano diluído em O<sub>2</sub>, por via inalatória, seguido por coleta de fragmento cartilágneo da articulação femorotibiopatelar direita (Figura 3).

FIGURA 3 - PROCEDIMENTO DE ARTROTOMIA FEMOROTIBIOPATELAR DIREITA E COLETA DE CARTILAGEM ARTICULAR (SETA PRETA) PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A INDUÇÃO DE OA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL.



FONTE: O autor (2022).

Com as amostras cartilagueas já coletadas, todos os fragmentos foram fixados em formol 10% e enviados para análise histopatológica em laboratório de referência com profissional especializado na área de patologia animal.

Após diafanização em xilol e emblocamento dos fragmentos em parafina, os blocos foram submetidos a cortes histológicos de aproximadamente cinco micrômetros, montagem dos tecidos sobre lâminas de microscopia e coloração com hematoxilina-eosina (HE). A leitura das amostras ocorreu de forma cega por microscopia óptica em objetiva de 40x, vindo o avaliador a classificar os escores de inflamação (achados teciduais) com base nos parâmetros propostos por Pritzker et al. (2006), representados na Tabela 1.

TABELA 1 - CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA QUANTO AO GRAU DE OA, SEGUNDO OS PRINCÍPIOS DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE PESQUISA EM OSTEOARTRITE (OARS).

<b>Gradação lesional</b>	<b>Achados histopatológicos</b>
<b>Grau 0:</b> superfície intacta, estrutura da cartilagem morfológicamente intacta	Matriz: arquitetura normal Células: intactas, orientação apropriada
<b>Grau 1:</b> superfície intacta	Matriz: zona superficial intacta, edema e/ou fibrilação da superfície (abrasão), condensação de matriz focal superficial Células: morte, proliferação (clusters), hipertrofia em zona superficial
<b>Grau 2:</b> superfície descontínua	Matriz: achados condizentes com o grau 1, além de descontinuidade da matriz na zona superficial (fibrilação profunda) e desorientação das colunas dos condrócitos Células: morte, proliferação (clusters), hipertrofia
<b>Grau 3:</b> fissuras verticais (clefts)	Matriz: achados condizentes com o grau 1, além de fissuras verticais na zona média e fissuras ramificadas Células: morte, regeneração (clusters), hipertrofia de condrócitos adjacentes as fissuras
<b>Grau 4:</b> erosão	Matriz: perda de matriz da cartilagem, delimitação da camada superficial e formação de cistos na camada média Escavação: perda de matriz da zona superficial e zona média
<b>Grau 5:</b> desnudação	Superfície: esclerose óssea ou tecido de reparação, incluindo fibrocartilagem dentro da superfície desnudada Microfratura com reparação limitada à superfície óssea
<b>Grau 6:</b> deformação	Remodelamento ósseo, incluso microfraturas com fibrocartilagem e reparo ósseo estendendo-se acima da zona superficial

FONTE: Adaptada de Pritzker et al. (2006).

Diante das recomendações supracitadas, avaliou-se individualmente a presença ou ausência de cada critério histopatológico, ou seja, as variáveis categóricas pré-estabelecidas, seguido pela gradação final da OA de cada animal e seu respectivo grupo.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De posse dos resultados, utilizou-se o programa SPSS v. 20.0 (IBM SPSS Statistics, SPSS Inc., Chicago, EUA) para análise estatística. As variáveis categóricas utilizadas como critério de avaliação histopatológica foram descritas por frequências e percentuais, e o escore pela mediana, mínimo e máximo. Após, comparou-se estas variáveis categóricas pelo teste Exato de Fisher e o Teste Z com ajuste de proporções por Dunn Bonferroni, possibilitando assim a detecção de categorias com diferentes proporções. O escore de graduação histopatológica de OA foi confrontado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn Bonferroni para comparação entre as variáveis que demonstraram diferenças estatísticas. Foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para as análises estabelecidas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de modelos experimentais para pesquisas médicas possibilita padronização amostral e menores interferências nos resultados. Uma amostragem de 40 ratos da linhagem Wistar foi utilizada para o presente estudo, respeitando os princípios propostos da experimentação animal, que recomenda o uso do menor número possível de animais para pesquisas, seguindo as particularidades e preconizando o bem-estar de cada espécie (CAMPOS et al., 2016).

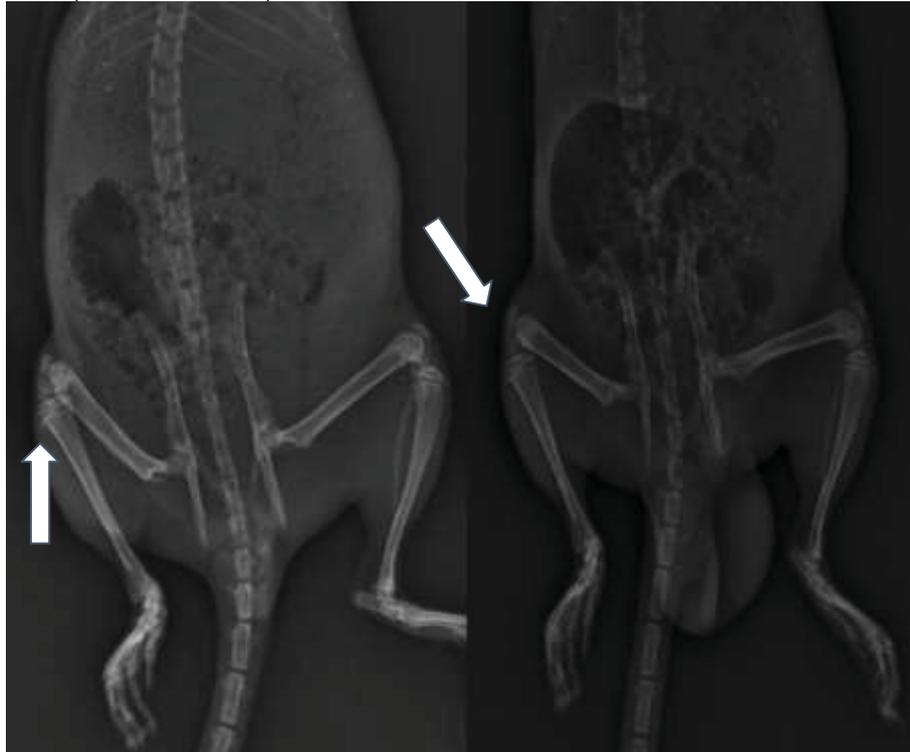
As limitações dos estudos sobre OA em humanos se dá pela inexistência de métodos objetivos e confiáveis para avaliação do curso da doença em estudos clínicos. Diante disso, modelos experimentais de indução de OA espontânea, induzidos geneticamente ou por procedimentos cirúrgico, ou ainda por injeção de substâncias químicas intra-articulares foram desenvolvidos com intuito de permitir a compreensão de aspectos fisiopatológicos da enfermidade e facultar o advento de novos fármacos e protocolos terapêuticos (ALVES-SIMÕES, 2022).

Para estudo dos efeitos das drogas modificadoras de osteoartrite foi necessária a indução de lesões características da doença, e para isto, foi utilizado o monoiodoacetato de sódio. O MIA é um potente inibidor metabólico de condrocitos que quando aplicado por via intra-articular resulta em lesões semelhantes a OA em humanos, levando a morte celular, degeneração cartilágnea com exposição do osso subcondral, formação de osteófitos, desestruturação em matriz extracelular e alterações nociceptivas (NAVEEN et al., 2014; PITCHER; SOUSA-VALENTE e MALCANGIO, 2016). No presente estudo, a aplicação de MIA foi realizada após anestesia geral e avaliação radiográfica, cujo objetivo era identificar e excluir animais que apresentassem indícios de OA ou qualquer outra enfermidade pré-existente envolvendo a articulação femorotibio Patelar direita. Vale ressaltar que na primeira análise não foram evidenciadas alterações radiográficas em nenhum animal, o que permitiu a sequência do estudo com todos os ratos propostos para a pesquisa.

Decorrido 14 dias da aplicação do indutor (MIA), o grupo experimental foi reavaliado radiograficamente, confirmando a presença de alterações compatíveis com OA em todos os animais do projeto, o que incluía diminuição do espaço articular, osteólise de osso subcondral, calcificação parcial do ligamento patelar e presença de

osteófitos marginais (Figura 4). Tais achados reafirmam o potencial de lesão articular ocasionado pelo fármaco MIA a curto prazo e corroboram a semelhança das alterações induzidas com a OA em humanos, assim como descrito por Pitcher; Sousa-Valente e Malcangio (2016).

FIGURA 4 - AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE ARTICULAÇÕES FEMOROTIBIOPATELARES DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS A INDUÇÃO QUÍMICA DE OA, EM INCIDÊNCIA CRÂNIO-CAUDAL. OBSERVA-SE EVIDENTE DIMINUIÇÃO DE ESPAÇO ARTICULAR, CALCIFICAÇÃO DE LIGAMENTO PATELAR E OSTEÓFITOS NO MEMBRO PÉLVICO DIREITO, O QUE CARACTERIZA OSTEOARTRITE (SETA BRANCA).



Fonte: O autor (2022).

A fase terapêutica do projeto correspondeu a 21 dias de tratamento, sendo que após esse período os animais foram submetidos a eutanásia e coleta de tecido cartilágneo para avaliação histopatológica. Os critérios utilizados para análise seguiram parâmetros pré-estabelecidos por Pritzker et al. (2006) para OA em ratos, onde analisou-se individualmente cada variável proposta segundo sua presença ou ausência nos cortes histológicos, seguido por atribuição de escore de graduação (0 a 6). Com isso, foram identificadas diversas alterações nos tecidos avaliados histopatologicamente. Na sequência os dados foram tabulados e tratados estatisticamente, como representado na tabela abaixo (Tabela 2):

TABELA 2 - VARIÁVEIS CATEGÓRICAS OBTIDAS POR MEIO DE ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM RATOS WISTAR COM OA E TRATADOS COM DIFERENTES FÁRMACOS MODIFICADORES DE OSTEOARTRITE.

Características	Número de animais				p
	GCG n=10	GD n=10	GPPS n=10	GC n=10	
Edema/fibração de superfície	5 (50%)	2 (20%)	7 (70%)	6 (60%)	0,196*
Condensação de matriz superficial	1 (10%)	-	3 (30%)	1 (60%)	0,357*
Necrose condrócitos	1 (10%) <sup>a</sup>	2 (20%) <sup>a,b,c</sup>	8 (80%) <sup>c</sup>	7 (70%) <sup>a,b,c</sup>	<b>0,002*</b>
Proliferação de condrócitos	8 (80%) <sup>a</sup>	1 (10%) <sup>b</sup>	6 (60%) <sup>a,b</sup>	5 (50%) <sup>a,b</sup>	<b>0,016*</b>
Descontinuidade superficial de matriz	4 (40%)	1 (10%)	6 (60%)	2 (20%)	0,105*
Desorientação de condrócitos	-	-	-	-	1,000*
Fissuras profundas/ramificadas	-	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)	0,558*
Erosão superficial a media	1 (10%)	1 (10%)	4 (40%)	1 (10%)	0,301*
Ulceração com esclerose óssea/tecido de granulação/fibrocartilagem	-	-	-	-	1,000*
Microfraturas	-	-	2 (20%)	1 (10%)	0,595*
Remodelamento ósseo/reparo acima da zona superficial	-	-	-	1 (10%)	0,999*

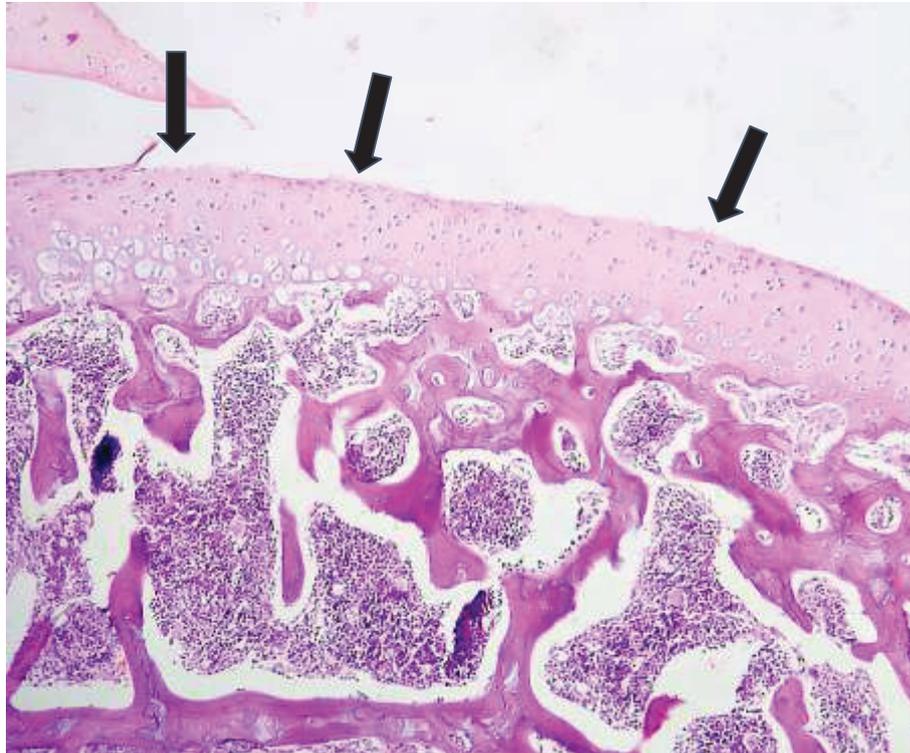
LEGENDA: n= número de animais. \*Teste Exato de Fisher.

Letras sobrescritas diferentes apontam resultados estatisticamente significativos.

FONTE: O autor (2022).

Edema e fibração são alterações que resultam em irregularidade da superfície articular, uma vez que a hiperidratação da cartilagem acaba por diluir proteoglicanos e estimular a separação das fibras de colágeno, tendo como resultado a presença de fibrilações (divisões) da superfície articular (MONONEN et al., 2012). No presente estudo, tanto edema quanto fibração (Figura 5) de superfície cartilaginosa foram observados em todos os grupos experimentais, contudo, ao comparar o potencial de atenuação de tais alterações pelos fármacos estudados pelo Teste Exato de Fisher, não se observou significância estatística, demonstrando que nenhuma terapia instituída foi efetiva no controle dessas alterações.

FIGURA 5 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE CARTILAGEM ARTICULAR DE RATO WISTAR SUBMETIDO A INDUÇÃO DE OA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM SULFATO DE CONDROITINA E GLUCOSAMINA. OBSERVA-SE POR MICROSCOPIA ÓPTICA LÂMINA CORADA COM HE EM AUMENTO DE 40X, INDICANDO PRESENÇA DE FIBRILAÇÃO E EROSÕES SUPERFICIAIS LOCALIZADAS AO LONGO DA CARTILAGEM HIALINA (SETAS PRETAS).



FONTE: O autor (2022).

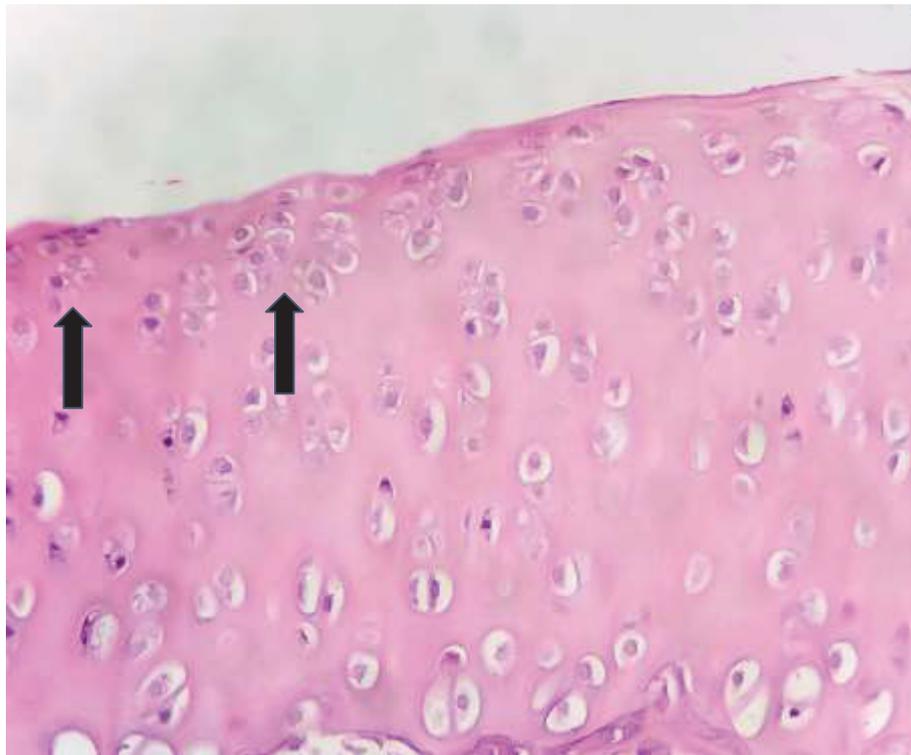
A condensação de matriz superficial foi uma alteração pouco evidente ao longo das análises histopatológicas, sendo observada apenas em um animal do GC, em três do GPPS e um do GC. Tal achado está intimamente relacionado ao processo de formação de cartilagem hialina e reparo de lesões da OA, uma vez que células mesenquimais indiferenciadas iniciam um processo de proliferação, condensação e posterior diferenciação em condroblastos e condrócitos, que por sua vez sintetizam matriz cartilaginosa (KOZHEMYAKINA; LASSAR e ZELZER, 2015).

Por análise de variância os protocolos terapêuticos não apresentaram diferença significativa quanto a condensação de matriz superficial. Este fato pode estar relacionado à idade dos ratos e à fase de reparação cartilaginosa em que se encontravam os animais do experimento no momento da eutanásia, assim como relatado por Lui et al. (2010). Esse estudo sugere que existem diferenças histopatológicas a depender da fase em que se encontra a OA, e também atribuíram o avanço da idade de ratos (a partir de três semanas de vida) a uma menor capacidade

de síntese e diferenciação de condrócitos (fase de repouso, proliferativa e termino-diferenciada), possibilitando correlacionar o momento da eutanásia dos animais do presente estudo (oito semanas de vida) com a fase de diferenciação celular e não mais a precursora, o que corrobora com a ínfima presença dos achados de condensação de matriz superficial.

A proliferação de condrócitos (Figura 6) foi uma importante variável durante análise histopatológica e estatisticamente significativa, demonstrando pelo Teste de Dunn Bonferroni que o grupo GCG foi superior quanto à capacidade de estimular a proliferação e maturação celular em condrócitos quando comparado ao GD, porém sem diferença estatística quando confrontado com os demais GPPS e GC.

FIGURA 6 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE CARTILAGEM ARTICULAR DE RATO WISTAR SUBMETIDO A INDUÇÃO DE OA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM SULFATO DE CONDRUITINA E GLUCOSAMINA. OBSERVA-SE POR MICROSCOPIA ÓPTICA LÂMINA CORADA COM HE EM AUMENTO DE 40X, INDICANDO PRESENÇA EVIDENTE DE PROLIFERAÇÃO DE CONDRÓCITOS (SETAS PRETAS).



FONTE: O autor (2022).

Estudos apontam a efetividade da diacereína como potente modulador inflamatório articular devido sua capacidade inibitória da IL-1 $\beta$  (ISLA et al., 2008; MARTEL-PELLETIER e PELLETIER, 2010). A ação do fármaco já foi pesquisada tanto

*in vitro* quanto *in situ*, demonstrando resultados satisfatórios na inibição da expressão de colagenase e atividade fibrinolítica no líquido sinovial, limitação de quimiotaxia de neutrófilos intra-articulares e redução de morte celular (PALLETIER et al., 2003; REZENDE et al., 2015).

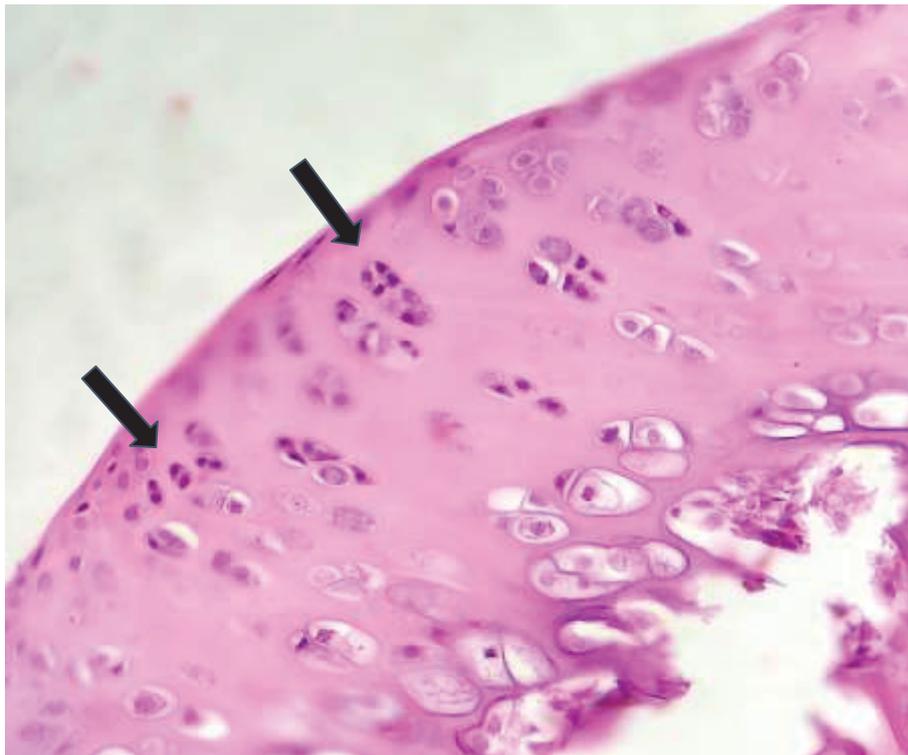
No presente estudo, a diacereína foi administrada na dose de 50mg/kg a cada 24 horas, durante 21 dias consecutivos, não sendo estatisticamente efetiva em comparação aos demais grupos na supressão ou estimulação dos parâmetros histológicos avaliados. Tal fato pode estar correlacionado principalmente pela duração do período terapêutico adotado, assim como descrito por Jain et al. (2015) onde após a indução de OA em ratos com aplicação de MIA e tratamento com diacereína, observaram ausência histopatológica de resposta condroprotetora e condrorregeneradora após duas semanas, presença de resposta leve após oito semanas e resultados efetivamente significativos somente após doze semanas do começo da terapia, atribuindo ao medicamento início de ação lenta. Frente a isso, sugere-se fortemente que a ineficiência da diacereína nos animais do presente estudo esteja relacionada ao curto período de tratamento instituído com o fármaco.

Necrose de condrócitos (Figura 7) foi um dos parâmetros estatisticamente significativos no presente estudo, sendo obtido como resultado uma menor taxa de morte celular no GCG (10%) em comparação com GPPS (80%). A degradação de cartilagem é uma das principais características da OA, evento intimamente dependente da perda de celularidade ou de condrócitos. Estudos identificaram uma forma de necrose programada relacionada a doenças osteoartíticas, intitulada por necroptose (HE et al., 2009; WANG et al., 2014). Observou-se uma alta correlação entre trauma mecânico articular, indução oxidativa secundária a inflamação e o processo necroptótico (CHENG et al., 2021).

A capacidade do Sulfato de Condroitina e da Glucosamina em retardar o desenvolvimento da OA foi relatada em vários estudos clínicos, atribuindo seus efeitos benéficos tanto pelo estímulo para produção de ácido hialurônico e consequente manutenção da produção e viscosidade do líquido sinovial (RAOUDI et al., 2009), quanto pelo seu potencial em excitar a síntese e metabolismo de condrócitos (LIPPIELLO, 2007). Na presente pesquisa, o menor percentual de necrose de condrócitos demonstrado pelo GCG em comparação ao GPPS pode relacionar-se ao

potencial de inibição de citocinas pró-inflamatórias e regulação do metabolismo cartilágneo pelos fármacos Sulfato de Condroitina com Glucosamina, assim como relatado por Terencio et al. (2016).

FIGURA 7 - AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE CARTILAGEM ARTICULAR DE RATO WISTAR SUBMETIDO A INDUÇÃO DE OA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL COM PENTOSANO POLISSULFATO SÓDICO. OBSERVA-SE POR MICROSCOPIA ÓPTICA LÂMINA CORADA COM HE EM AUMENTO DE 40X, INDICANDO PRESENÇA DE CONDRÓCITOS COM NÚCLEO PICNÓTICOS, INDICATIVO DE NECROSE CELULAR (SETAS PRETAS).



FONTE: O autor (2022).

No grupo tratado com Pentosano Polissulfato sódico se evidenciou um alto número de animais com presença de necrose de condrócitos (8/10), demonstrando uma possível inefetividade do protocolo terapêutico frente a morte deste tipo celular. Tais resultados diferem por exemplo do estudo de Miyata et al. (2010), onde os autores observaram potencial capacidade do fármaco em reduzir a incidência de osteonecrose induzida por esteroides da cabeça femoral de ratos. A ausência de correlação entre os achados da presente pesquisa com a literatura citada pode ser explicada pela diferença entre os intervalos de administração do medicamento, a idade dos animais ao início da fase experimental e a forma de indução da OA. Miyata et al. (2010) trabalharam com animais mais velhos (13 semanas de vida), intervalos menores entre

as aplicações do medicamento (a cada 24 horas) e utilizaram esteroides para causar OA, o que induz lesão oxidativa por estresse vascular, diferentemente do MIA que acaba por inibir o metabolismo de condrócitos, resultando em necrose celular (ALVES-SIMÕES, 2022).

Erosão de profundidade superficial a média em matriz cartilaginosa foi uma das alterações pouco evidenciadas ao longo das análises histológicas, sendo observada em apenas um animal dos grupos GCG (10%), GC (10%), GC (10%) e em quatro animais do GPPS (40%). Apesar desse parâmetro não ter sido estatisticamente significativo na comparação dos grupos, seu achado é descrito como um importante sinal da OA, estando presente nos quadros onde há perdas reversíveis de proteoglicanos e irreversíveis da rede de colágeno (STOLZ et al., 2009).

Entre os parâmetros histológicos propostos para avaliação, a desorientação de condrócitos, ulceração com esclerose óssea e presença de tecido de granulação/fibrocartilaginosa, não foram constatados nos tecidos analisados. Tais achados são descritos como alterações típicas do processo agravado de degeneração de matriz, caracterizado por perda de cartilagem remanescente e possível exposição de osso subcondral (OLSON e CARLSON, 2017). Com isso, a ausência desses achados no presente estudo é um forte indicativo que todos os grupos experimentais não apresentavam lesões articulares agravadas até momento da eutanásia.

Após análise das variáveis histopatológicas proposto por Pritzker et al. (2006), determinou-se a graduação da lesão articular de cada animal, com posterior obtenção de mediana (mínimo – máximo) dos grupos. Dessa forma, os escores foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido por Dunn Bonferroni para correlação entre os grupos, sendo considerado nível de significância de 5% para as análises (Tabela 3).

TABELA 3 - GRADUAÇÃO DE OA EM RATOS APÓS ANÁLISE DE VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS E DETERMINAÇÃO DE ESCORE LESIONAL.

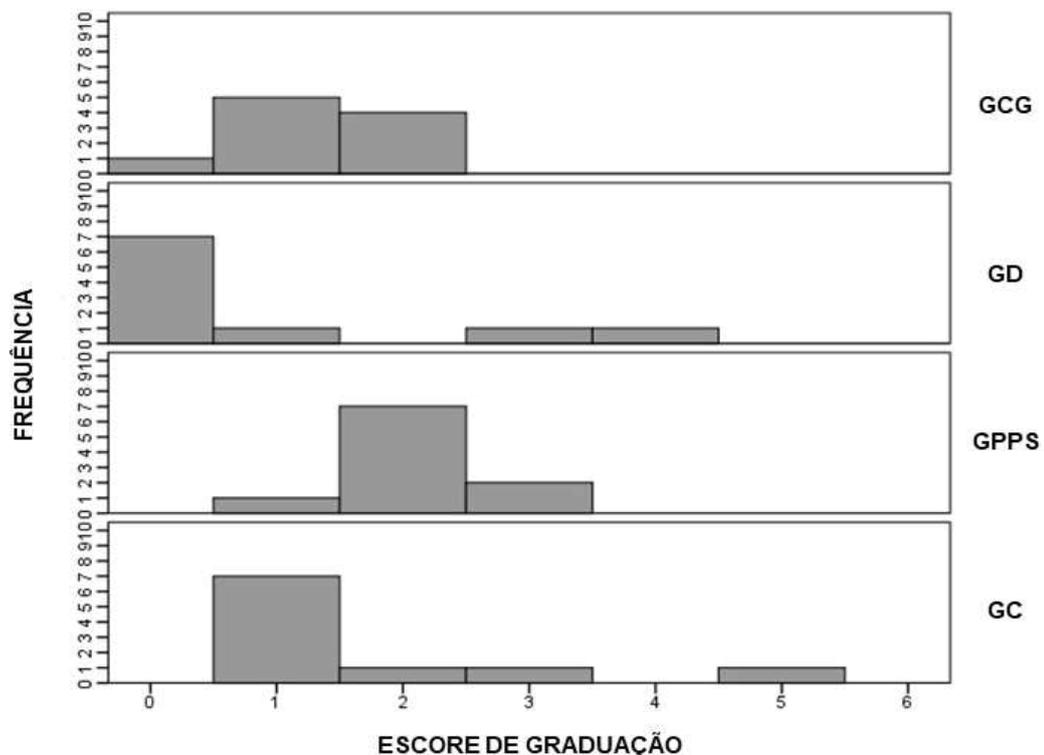
	Número de animais				<i>p</i>
	GCG n=10	GD n=10	GPPS n=10	GC n=10	
Grau, mediana (mín. - máx.)	1 (0-2) <sup>a,b</sup>	0 (0-4) <sup>a</sup>	2(1-3) <sup>b</sup>	1 (1-5) <sup>a,b</sup>	<b>0,012**</b>

LEGENDA: n= número de animais. Min.=mínimo. Máx.= máximo. \*\*Teste de Kruskal Wallis. Letras sobrescritas diferentes apontam resultados estatisticamente significativos.

FONTE: O autor (2022).

Pode-se observar que o GD apresentou significativamente menor escore de lesão articular em comparação ao GPPS, porém, não diferindo do GCG e GC. Quando analisados de forma isolada (cada animal), as graduações variaram desde escore 0 (obtidas no GCG e GD) até 5 (GC), como representado no Gráfico 1.

GRÁFICO 1 - REPRESENTAÇÃO DE GRADUAÇÃO DE OA (0 – 6) EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A INDUÇÃO DA DOENÇA E TRATAMENTO EXPERIMENTAL.



Legenda: O escore foi comparado pelo teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn Bonferroni para comparação entre os grupos. Nível de significância considerado foi de 5% para as comparações estabelecidas ( $p > 0,05$ ).

Fonte: O autor (2022).

Apesar da diferença significativa entre o GD e GPPS, tal resultado não permite determinar com precisão o potencial condroprotetor e/ou condrorregenerador da diacereína em relação aos demais, principalmente porque o grupo controle não evidenciou resultados estatisticamente diferentes dos grupos tratamento.

Ainda que a histopatologia seja ponderada como o método padrão-ouro para avaliação de lesões cartilagueas e determinação do grau de OA, o exame fornece dados não-paramétricos e sujeitos a influência subjetiva por parte dos avaliadores. Com isso, no intuito de estabelecer critérios mais objetivos e dados paramétricos, sugere-se novas pesquisas que associem avaliação histológica com quantificação de componentes de matriz cartilaginosa, como colágeno, proteoglicanos, ácido hialurônico e glicoproteínas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, a injeção única de monoiodoacetato de sódio na articulação femorotibiopatelar de ratos Wistar com cinco semanas de vida foi capaz de induzir lesões cartilagíneas características de OA. Em contrapartida, o tratamento dessas lesões por administração isolada de Sulfato de Condroitina A com Glucosamina, Diacereína e Pentosano Polissulfato de Sódio, durante três semanas consecutivas, não foi capaz de promover efeito condrorregenerador segundo critérios histopatológicos.

A fim de se obter evidências científicas mais concretas a respeito de terapias para osteoartrite, estudos com metodologia similar, porém adotando períodos superiores de tratamento se fazem necessários com intuito de determinar efeitos terapêuticos em lesões articulares características de OA.

## REFERÊNCIAS

- ALVES-SIMÕES, M. Rodent models of knee osteoarthritis for pain research. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 30, n. 6, p. 802-814, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35139423/>>. Acesso em: 03 ago. 2022. Doi: 10.1016/j.joca.2022.01.010
- ANDERSON, K. L. et al. Prevalence, duration and risk factors for appendicular osteoarthritis in a UK dog population under primary veterinary care. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29618832/>>. Acesso em: 01 ago. 2022. Doi: 10.1038/s41598-018-23940-z
- BEALE, B. S. Use of nutraceuticals and chondroprotectants in osteoarthritic dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 34, n. 1, p. 271-289, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15032132/>>. Acesso em: 25 jul. 2022. Doi: 10.1016/j.cvsm.2003.09.008
- BISHNOI, M. et al. Chondroitin sulphate: a focus on osteoarthritis. **Glycoconjugate journal**, v. 33, n. 5, p. 693-705, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10719-016-9665-3>>. Acesso em: 27 jul. 2022. Doi: 10.1007/s10719-016-9665-3
- BROOKS, P. M. Impact of osteoarthritis on individuals and society: how much disability? Social consequences and health economic implications. **Current opinion in rheumatology**, v. 14, n. 5, p. 573-577, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12192258/>>. Acesso em: 24 jul. 2022. Doi: 10.1097/00002281-200209000-00017
- CALAMIA, V. et al. Pharmacoproteomic study of three different chondroitin sulfate compounds on intracellular and extracellular human chondrocyte proteomes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 11, n. 11, p. 1097-1104, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22203690>>. Acesso em: 14 maio 2012. Doi: 10.1074/mcp.M111.013417
- CAMPOS, A. S. et al. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: introdução geral. In: BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Brasília, DF: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2016. p. 7-39.
- CASTRO, R. R. et al. A quantitative approach to measure joint pain in experimental Osteoarthritis – evidence of a role for nitric oxide. **Osteoarthritis and Cartilage**. v.14, p. 769-776. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458406000148>>. Acesso em: 28 jul. 2022. Doi: 10.1016/j.joca.2006.01.013.

CHENG, J. et al. RIP1 perturbation induces chondrocyte necroptosis and promotes osteoarthritis pathogenesis via targeting BMP7. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 1-18, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.638382/full>>. Acesso em: 07 ago. 2022. Doi: 10.3389/fcell.2021.638382

COPPIETERS, E.; SEGHERS, H.; VERHOEVEN, G. Arthroscopic, computed tomography, and radiographic findings in 25 dogs with lameness after arthroscopic treatment of medial coronoid disease. **Veterinary Surgery**, v. 45, n. 2, p. 246–253, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26767932/>>. Acesso em: 29 jul. 2022. Doi: 10.1111/vsu.12443

DECAMP, C. E. et al. Arthrology. In: **Brinker, Piermattei and Flo's Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair**. 5 ed. Missouri: Elsevier, 2015. cap. 6, p. 180-210.

FROHBERGH, M. et al. Dose responsive effects of subcutaneous pentosan polysulfate injection in mucopolysaccharidosis type VI rats and comparison to oral treatment. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. 1-12, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24964042/>>. Acesso em: 26 jul. 2022. Doi: 10.1371/journal.pone.0100882

GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R. Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 230-237, 2010. Disponível em: <<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x>>. Acesso em: 27 jul. 2022. Doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05240.x

HE, S. et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1100-1111, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19524512/>>. Acesso em: 07 ago. 2022. Doi: 10.1016/j.cell.2009.05.021

ISLA, N. G. et al. In vitro effects of diacerein on NO production by chondrocytes in response to proinflammatory mediators. **Bio-medical materials and engineering**, v. 18, n. s1, p. 99-104, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18334727/>>. Acesso em: 08 ago. 2022.

JAIN, A. et al. Diacerein protects against iodoacetate-induced osteoarthritis in the femorotibial joints of rats. **Journal of Biomedical Research**, v. 29, n. 5, p. 405-413, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26442595/>>. Acesso em: 09 ago. 2022. Doi: 10.7555/JBR.29.20130092

JOHNSTON, S. A.; MCLAUGHLIN, R. M.; BUDSBERG, S. C. Nonsurgical management of osteoarthritis in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 6, p. 1449-1470, 2008. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18954692/>>. Acesso em: 26 jul. 2022. Doi: 10.1016/j.cvsm.2008.08.001

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. Aparelho locomotor - Artrologia. In: LIEBICH, H. G.; FORSTENPOINTNER, G.; PÉREZ, W.; KÖNIG, H. E. **Anatomia dos Animais Domésticos: Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2021. cap. 1, p. 17-23.

KOZHEMYAKINA, E.; LASSAR, A. B.; ZELZER, E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. **Development**, v. 142, n. 5, p. 817-831, 2015. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/dev/article/142/5/817/47199/A-pathway-to-bone-signaling-molecules-and>>. Acesso em: 07 ago. 2022. Doi: 10.1242/dev.105536

LAADHAR, L. et al. Physiopathologie de l'arthrose. Du cartilage normal au cartilage arthrosique: facteurs de prédisposition et mécanismes inflammatoires. **Revista Medical International**. v. 28, n. 8, p. 531-536, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0248866307000513>>. Acesso em: 30 jul. 2022. Doi: 10.1016/j.revmed.2007.01.012

LAMANI, T. S. D. et al. Incidence of osteoarthritis in dogs – a clinical study of 64 patients. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 8, n. 3, p. 559–564, 2019. Disponível em: <<https://www.ijset.net/journal/2355.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2022.

LEITE, A. A. et al. Comorbidades em pacientes com osteoartrite: frequência e impacto na dor e na função física. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 2, p. 118-123, 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbr/a/grNxGK7tZK5w3HYBLLhv6H/?lang=pt&format=html>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

LIPPIELLO, L. Collagen synthesis in tenocytes, ligament cells and chondrocytes exposed to a combination of glucosamine HCl and chondroitin sulfate. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n. 2, p. 219-224, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17549239/>>. Acesso em: 07 ago. 2022. Doi: 10.1093/ecam/nel081

LOESER, R. F. Osteoarthritis year in review 2013: biology. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 10, p. 1436-1442, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779513/>>. Acesso em: 24 jul. 2022. Doi: 10.1016/j.joca.2013.05.020

LUI, J. C. K. et al. Spatial and temporal regulation of gene expression in the mammalian growth plate. **Bone**, v. 46, n. 5, p. 1380-1390, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3418671/>>. Acesso em: 12 ago. 2022. Doi: 10.1016/j.bone.2010.01.373

MARINO, D. J.; LOUGHIN, C. A. Diagnostic imaging of the canine stifle: a review. **Veterinary Surgery**, v. 39, n. 3, p. 284-295, 2010. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20522210/>>. Acesso em: 30 jul. 2022. Doi: 10.1111/j.1532-950X.2010.00678.x

MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P. Effects of diacerein at the molecular level in the osteoarthritis disease process. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 2, n. 2, p. 95-104, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383474/>>. Acesso em: 08 ago. 2022. Doi: 10.1177/1759720X09359104

MENDES, A. F. et al. Diacerhein and rhein prevent interleukin-1 $\beta$ -induced nuclear factor- $\kappa$ B activation by inhibiting the degradation of inhibitor  $\kappa$ B- $\alpha$ . **Pharmacology & toxicology**, v. 91, n. 1, p. 22-28, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12193257/>>. Acesso em: 02 ago. 2022. Doi: 10.1034/j.1600-0773.2002.910104.x

MILLIS, D. L.; LEVINE D. The role of chondroprotectants, nutraceuticals, and nutrition in rehabilitation. In: **Canine rehabilitation and physical therapy**. 2 ed. Philadelphia: Saunders, 2014. cap. 15, p. 254-304.

MONONEN, M. E. et al. Effect of superficial collagen patterns and fibrillation of femoral articular cartilage on knee joint mechanics—A 3D finite element analysis. **Journal of biomechanics**, v. 45, n. 3, p. 579-587, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021929011006853?via%3DiHub>>. Acesso em: 06 ago. 2022. Doi: 10.1016/j.jbiomech.2011.11.003

MOSHER, T. J. et al. Osteoarthritis year 2013 in review: imaging. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 21, n. 10, p. 1425-1435, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458413008959>>. Acesso em: 24 jul. 2022. Doi: 10.1016/j.joca.2013.07.010

MIYATA, N. et al. Pentosan reduces osteonecrosis of femoral head in SHRSP. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 32, n. 8, p. 511-516, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21091356/>>. Acesso em: 28 jul. 2022. Doi: 10.3109/10641963.2010.496511

NAVEEN, S. V. et al. Histology, glycosaminoglycan level and cartilage stiffness in monoiodoacetate-induced osteoarthritis: Comparative analysis with anterior cruciate ligament transection in rat model and human osteoarthritis. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 97-105, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3880996/>>. Acesso em: 03 ago. 2022. Doi: 10.7150/ijms.6964

OLSON, E. J.; CARLSON, C. S. Chapter, Bones, Joints, Tendons and Ligaments. In: ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Pathologic basis of veterinary disease**. 6 ed. St Louis: Elsevier, 2017. cap. 16, p. 937-1008.

PELLETIER, J. P. et al. Diacerein reduces the level of cartilage chondrocyte DNA fragmentation and death in experimental dog osteoarthritic cartilage at the same time

that it inhibits caspase-3 and inducible nitric oxide synthase. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 21, n. 2, p. 171-178, 2003. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12747270/>>. Acesso em: 08 ago. 2022.

PITCHER, T.; SOUSA-VALENTE, J.; MALCANGIO, M. The monoiodoacetate model of osteoarthritis pain in the mouse. **Journal of Visualized Experiments**, n. 111, p. 1-5, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27214709/>>. Acesso em: 03 ago. 2022. Doi: 10.3791/53746

PRITZKER, K. P. H. et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 14, n. 1, p. 13-29, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458405001974>>. Acesso em: 25 jul. 2022. Doi: 10.1016/j.joca.2005.07.014

RASERA, L. et al. Alterações radiográficas e ultra-sonográficas iniciais em osteoartrite experimental equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 3, p. 634- 640, 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/BqGLR9JBS8nj8yfgSnTgXsr/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 31 jul. 2022. Doi: 10.1590/S0102-09352007000300013

RAOUDI, M. D. et al. Chondroitin sulfate increases hyaluronan production by human synoviocytes through differential regulation of hyaluronan synthases: role of p38 and Akt. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 60, n. 3, p. 760-770, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19248106/>>. Acesso em: 07 ago. 2022. Doi: 10.1002/art.24302

REZENDE, M. U. et al. Experimental osteoarthritis model by means of medial meniscectomy in rats and effects of diacerein administration and hyaluronic acid injection. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 133, p. 4-12, 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/spmj/a/NKtfDNsKym8qYZgkTh7zTRC/abstract/?lang=em>>. Doi: 10.1590/1516-3180.2013.6730001

RYCHEL, J. K. Diagnosis and treatment of osteoarthritis. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 20-25, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20188335/>>. Acesso em: 26 jul. 2022. Doi: 10.1053/j.tcam.2009.10.005

SANDELL, L. J. Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 2, p. 77-89, 2012. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22231237/>>. Acesso em: 20 jul. 2022. Doi: 10.1038/nrrheum.2011.199

SCHULZ, K. S.; HAYASHI, K.; FOSSUM, T. W. Diseases of the Joints. In: FOSSUM, T. W. **Small animal surgery**. 5 ed. Philadelphia: Elsevier, 2018. cap. 34, p. 1134-1279.

SIMON, T. M.; JACKSON, D. W. Articular cartilage: injury pathways and treatment options. **Sports medicine and arthroscopy review**, v. 26, n. 1, p. 31-39, 2018.

Disponível em:

<<https://www.ingentaconnect.com/content/wk/smart/2018/00000026/00000001/art00006>>. Acesso em: 26 jul.2022. Doi: 10.1097/JSA.0000000000000182

STOLZ, M. et al. Early detection of aging cartilage and osteoarthritis in mice and patient samples using atomic force microscopy. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. 3, p. 186-192, 2009. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/19265849>>. Acesso em: 07 ago. 2022. Doi: 10.1038/nnano.2008.410

TERENCIO, M. C. et al. Chondroprotective effects of the combination chondroitin sulfate-glucosamine in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection in ovariectomised rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 79, p. 120-128, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27044820/>>. Acesso em: 07 ago. 2022. Doi: 10.1016/j.biopha.2016.02.005.

VAISHYA, R. et al. Non-operative management of osteoarthritis of the knee joint. **Journal of clinical orthopaedics and trauma**, v. 7, n. 3, p. 170-176, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4949406/>>. Acesso em: 01 ago. 2022. Doi: 10.1016/j.jcot.2016.05.005

VASILIADIS, H. S.; TSIKOPOULOS, K. Glucosamine and chondroitin for the treatment of osteoarthritis. **World Journal of Orthopedics**, v. 8, n. 1, p. 1, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28144573/>>. Acesso em: 26 jul. 2022. Doi: 10.5312/wjo.v8.i1.1

WANG, H. et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. **Molecular cell**, v. 54, n. 1, p. 133-146, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24703947/>>. Acesso em: 07 ago. 2022. Doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.003

WIJEKOON, H. M S. et al. Anti-arthritic effect of pentosan polysulfate in rats with collagen-induced arthritis. **Research in veterinary science**, v. 122, p. 179-185, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528818300481>>. Acesso em: 26 jul. 2022. Doi: 10.1016/j.rvsc.2018.11.028

YEATER, T. D. et al. Autonomic Nervous System Dysregulation and Osteoarthritis Pain: Mechanisms, Measurement, and Future Outlook. **Current Rheumatology Reports**, v. 24, p. 175-183, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35420372/>>. Acesso em: 01 ago. 2022. Doi: 10.1007/s11926-022-01071-9