

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIOGO DA MOTTA FERREIRA

PREPARO DE MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE EM JOELHO
SUÍNO POR APLICAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE ADJUVANTE COMPLETO DE
FREUND

CURITIBA

2021

DIOGO DA MOTTA FERREIRA

PREPARO DE MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEARTROSE EM JOELHO
SUÍNO POR APLICAÇÃO DE ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Munhoz da Cunha.

CURITIBA

2021

F383

Ferreira, Diogo da Motta

Preparo de modelo experimental de osteartrose em joelho suíno por aplicação de adjuvante completo de Freund [recurso eletrônico] / Diogo da Motta Ferreira. – Curitiba, 2021.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação Medicina (Clínica Cirúrgica), 2021.

Orientador: Luiz Antônio Munhoz da Cunha. Bibliografia: p. 66-71.

1. Artropatias. 2. Modelos animais. 3. Experimentação animal. 4. Joelho de quadrúpedes. 5. Adjuvantes imunológicos. 6. Adjuvante de Freund. 7. Injeções intra-articulares. 8. Inflamação. 9. Osteíte – patologia. 10. Osteoartrite do joelho–fisiopatologia. 11. Estatísticas não paramétricas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Cunha, Luiz Antônio Munhoz da. III. Título.

NLMC: WE 870

Catálogo na fonte elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFPR, Biblioteca de Ciências da Saúde – SD, com os dados fornecidos pelo autor.
Bibliotecário: Francisco José Cordeiro CRB9/1734.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA (CLÍNICA
CIRÚRGICA) - 40001016018P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA (CLÍNICA CIRÚRGICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **DIOGO DA MOTTA FERREIRA** intitulada: **PREPARO DE MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOARTROSE EM JOELHO SUÍNO POR APLICAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ ANTONIO MUNHOZ 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.

CURITIBA, 14 de Dezembro de 2021.

LUIZ ANTONIO MUNHOZ DA CUNHA
Presidente da Banca Examinadora

JOÃO LUÍZ VIEIRA DA SILVA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

MAURO BATISTA ALBANO
Avaliador Externo (55002534)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos derramadas sobre minha família e minha vida.

A meus pais, Célia Regina da Motta Ferreira e Charles Cavalcante Ferreira, que sempre me incentivaram a estudar.

À minha irmã, Danielle da Motta Ferreira Fialho, que sempre foi meu exemplo em crescimento profissional.

À minha esposa, Carolina Cassilha Stival, e ao meu filho, Vicente Stival Ferreira, pela confiança que depositam em mim.

À minha avó, Mercília Álvarez da Motta, uma grande incentivadora do crescimento.

Ao professor Luiz Antônio Munhoz da Cunha, por todo conhecimento compartilhado, pelo incentivo e pela acolhida durante o período.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica e a todos os professores e funcionários que o apoiam.

À Universidade Tuiuti do Paraná, pelo apoio logístico na execução do trabalho.

RESUMO

A doença articular degenerativa (osteoartrose) causa dor, restrição funcional e piora da qualidade de vida, sendo mais frequente em pacientes idosos. As abordagens terapêuticas na osteoartrose (artrite) têm por objetivo melhorar os sintomas dolorosos e recuperar a função das articulações comprometidas. Para prevenir e/ou tratar a artrite degenerativa, é muito importante conhecer sua fisiopatologia, o que torna fundamental o desenvolvimento de modelos experimentais da doença. Vários estudos demonstram que o uso intra-articular do adjuvante completo de Freud (ACF) pode produzir osteoartrose em articulações femorotibio Patelar e temporomandibular em diversas espécies. O presente trabalho tem por finalidade avaliar a intensidade das alterações histopatológicas osteoarticulares relacionadas à inflamação local; alterações sinoviais; alterações da cartilagem de revestimento e dos condrócitos, induzidas pelo ACF na articulação do joelho em suínos, em tempos diferentes após sua injeção. Para isso, utilizaram-se 24 suínos *Large White* com peso entre 25 e 50 quilogramas. Dezoito deles receberam 1 ml de ACF e seis deles receberam 1 mL de Cloreto de Sódio a 0,9% (NaCl 0,9%). Os animais que receberam ACF foram divididos em três grupos de seis animais cada, enquanto os animais que receberam NaCl 0,9% foram divididos em três grupos de animais cada. Os que receberam ACF passam a ser denominados de Grupo de Estudo (GE), sendo compostos por seis animais de acordo com o tempo de sacrifício: GE1 sacrificados com 7 dias, GE2 sacrificados com 21 dias e GE3 sacrificados com 35 dias. Os seis animais que receberam NaCl 0,9% passam a ser denominados de Grupo Controle (GC) e foram divididos em dois animais por grupo de acordo com o tempo de sacrifício: GC1 sacrificados com 7 dias; GC2 sacrificados com 21 dias e GC3 animais sacrificados com 35 dias. As alterações histopatológicas osteoarticulares relacionadas à inflamação, sinóvia; cartilagem de revestimento e condrócitos foram pontuadas e estabelecido um "escore". Os escores de cada uma das alterações histopatológicas são estudados estatisticamente pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para comparação entre cada grupo de estudo e seu respectivo grupo controle, Kruskal-Wallis, teste de Dunn e correção de Bonferroni para determinar a diferença dos achados entre os grupos de estudo. É possível determinar no presente estudo que a injeção de ACF produz alterações estatisticamente significativas no GE1, GE2 e GE3 quando comparados aos devidos GC, com relação à intensidade da inflamação; alterações sinoviais e de cartilagem. Não houve diferença estatística significativa nas alterações em condrócitos. O GE3 difere estatisticamente dos GE1 e GE2, apresentando alterações menos intensas em relação ao evento inflamatório e alterações sinoviais, mas apresenta maiores alterações em condrócitos. Pelo presente estudo, é possível determinar que o ACF produz alterações inflamatórias, sinoviais e de cartilagem em joelho de suínos no período de 7, 21 e 35 dias após sua injeção intra-articular, mas não são suficientes para caracterizar osteoartrose.

Palavras-chave: Artropatia. Modelo experimental animal. Avaliação histopatológica articular.

ABSTRACT

Degenerative joint disease (osteoarthritis) causes pain and functional restriction, as well as decreases one's quality of life, being more frequent in elderly patients. Therapeutic approaches to treat osteoarthritis aim to treat painful symptoms and recover function in the compromised joints. To prevent and/or treat degenerative arthritis, it's essential to understand its pathophysiology and develop some of the disease's experimental models. Many studies demonstrate that the intra-articular use of Freund's Complete Adjuvant (FCA) can cause osteoarthritis in femorotibiopatellar and temporomandibular joints in many species. This study aims to assess how intense osteoarticular histopathology alterations are in terms of local inflammation, synovial alterations, chondrocytes and coating cartilage alterations induced by FCA in pigs' knee joints in different periods of time after their injection. Twenty-four Large White pigs weighing 25 to 50kg were used for this experiment. Eighteen of them received an injection of 1ml of FCA and six of them received 1ml of 0.9% sodium chloride (NaCl 0.9%). Animals that received FCA were divided into three groups of six and those who received NaCl 0.9% were divided into three groups of two animals each. Those who received FCA were called Treatment Group (TG), and were composed of six animals grouped according to the time they were put down: TG1, put down after 7 days; TG2, put down after 21 days, and TG3, put down after 35 days. The six animals that received NaCl 0.9% were called Control Group (CG) and they were also divided into 2 animals per group according to the time they were put down: CG1, with animals put down after 7 days; CG2, with animals put down after 21 days, and CG3, with animals put down after 35 days. Osteoarticular alterations related to inflammation, synovia, coating cartilage, and chondrocytes were analyzed to establish a score. Scores for each histopathological alteration will be statistically analyzed by the Mann-Whitney U test to compare each group of the study and their respective control groups. Kruskal-Wallis, Dunn's, and Bonferroni correction test were applied to determine the difference between the treatment group findings. It is possible to determine from this study that FCA injection produces statistically significant changes in TG1, TG2, and TG3, when comparing CG's levels of inflammation intensity and synovial and cartilage alteration. There was no statistically significant difference for chondrocytes. TG3 is statistically different from TG1 and TG2, presenting less intense inflammatory and synovial alterations while presenting chondrocyte alterations. In this study, FCA produces inflammatory, synovial, and cartilage changes in pigs' knees over the periods of 7, 21, and 35 days after their intra-articular injection, but they are not sufficient to characterize osteoarthritis.

Keywords: Arthropathy. Animal experimental model. Joint histopathology assessment.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – PROCEDIMENTO ANESTÉSICO GERAL EM SUÍNOS PREVIAMENTE À ADMINISTRAÇÃO DO ACF	32
FIGURA 2 – ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DO ACF EM ARTICULAÇÃO DO JOELHO ESQUERDO DE SUÍNO	33
FIGURA 3 – ADMINSTRAÇÃO DE KCL 19,1% EM ACESSO DE VEIA MARGINAL AURICULAR EM SUÍNO.....	34
FIGURA 4 – PEÇA ANATÔMICA DE ARTICULAÇÃO DO JOELHO SUÍNO PREPARADA EM EXTENSÃO PREVIAMENTE À CONSERVAÇÃO COM FORMOL 10%	34
FIGURA 5 – PEÇA ANATÔMICA DE ARTICULAÇÃO FEMOROTIBIOPATELAR DE SUÍNO CONSERVADA EM FORMOL 10%.....	35
FIGURA 6 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ENCONTRADAS NAS AVALIAÇÕES DOS GRUPOS.....	39
FIGURA 7 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM SINÓVIA ENCONTRADAS NAS AVALIAÇÕES DOS GRUPOS.....	40
FIGURA 8 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM CARTILAGEM ENCONTRADAS NAS AVALIAÇÕES DOS GRUPOS.....	41
FIGURA 9 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM CONDRÓCITOS ENCONTRADAS NAS AVALIAÇÕES DOS GRUPOS.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 E SEUS RESPECTIVOS GRUPOS CONTROLE	45
GRÁFICO 2 – REPRESENTAÇÃO DA COMPARAÇÃO DO CRITÉRIO SINÓVIA ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 E SEUS RESPECTIVOS GRUPOS CONTROLE.....	48
GRÁFICO 3 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA COMPARAÇÃO DO CRITÉRIO CARTILAGEM ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 E SEUS RESPECTIVOS GRUPOS CONTROLE	52
GRÁFICO 4 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA COMPARAÇÃO DO CRITÉRIO CONDRÓCITOS ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 E SEUS RESPECTIVOS GRUPOS CONTROLE	55
GRÁFICO 5 – DISPERSÃO AO REDOR DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 NO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO	56
GRÁFICO 6 – DISPERSÃO AO REDOR DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 NO CRITÉRIO SINÓVIA.....	57
GRÁFICO 7 – DISPERSÃO AO REDOR DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 NO CRITÉRIO CARTILAGEM	57
GRÁFICO 8 – DISPERSÃO AO REDOR DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 NO CRITÉRIO CONDRÓCITOS.....	58

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE1 (A1 A A6) E GC1 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 1 E O GRUPO CONTROLE 1 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....42
- TABELA 2 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE2 (A1 A A6) E GC2 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 2 E O GRUPO CONTROLE 2 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....43
- TABELA 3 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE3 (A1 A A6) E GC3 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 3 E O GRUPO CONTROLE 3 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....44
- TABELA 4 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO SINÓVIA PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE1 (A1 A A6) E GC1 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 1 E O GRUPO CONTROLE 1 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....45
- TABELA 5 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO SINÓVIA PARA CADA UM DOS JOELHOS DOS ANIMAIS DO GE2 (A1 A A6) E GC2 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA

	COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 2 E O GRUPO CONTROLE 2 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....	46
TABELA 6 –	PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO SINÓVIA PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE3 (A1 A A6) E GC3 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR DE P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 3 E O GRUPO CONTROLE 3 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....	47
TABELA 7 –	PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CARTILAGEM PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE1 (A1 A A6) E GC1 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 1 E O GRUPO CONTROLE 1 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....	49
TABELA 8 –	PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CARTILAGEM PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE2 (A1 A A6) E GC2 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 2 E O GRUPO CONTROLE 2 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....	50
TABELA 9 –	PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CARTILAGEM PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE3 (A1 A A6) E GC3 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 3 E O GRUPO CONTROLE 3 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....	51
TABELA 10 –	PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CONDRÓCITOS PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE1 (A1 A A6) E GC1 (A1 E A2)	

	DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 1 E O GRUPO CONTROLE 1 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....	52
TABELA 11 –	PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CONDROCITOS PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE2 (A1 A A6) E GC2 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 2 E O GRUPO CONTROLE 2 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....	53
TABELA 12 –	PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CONDROCITOS PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE3 (A1 A A6) E GC3 (JA1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 3 E O GRUPO CONTROLE 3 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.....	54
TABELA 13 –	COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS E TESTE POST HOC DE DUNN....	55

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CRONOGRAMA DO EXPERIMENTO.....	31
QUADRO 2 – CRITÉRIOS COM RESPECTIVA PONTUAÇÃO DA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	36
QUADRO 3 – QUANTIDADE DE ANIMAIS QUE APRESENTARAM SINAIS SISTÊMICOS NAS PRIMEIRAS 72 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO ACF.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	–	Adjuvante Completo de Freund
g	–	Gramma
G1A1	–	Grupo 1 Animal 1
GAGS	–	Glicosaminoglicanas
GE1	–	Grupo de estudo 1
GE2	–	Grupo de estudo 2
GE3	–	Grupo de estudo 3
GC1	–	Grupo controle 1
GC2	–	Grupo controle 2
GC3	–	Grupo controle 3
IL	–	Interleucina
IGF-1	–	Insuline-like growth fator
kg	–	Quilograma
LTB4	–	Leucotrieno B4
MEC	–	Matriz Extracelular
MMP	–	Matrix Metalloproteinases
mg	–	Miligrama
NO	–	Óxido Nítrico
OA	–	Osteoartrose
PGE-2	–	Prostaglandina tipo E2
TGF- β	–	Transforming Growth Factor
TIMP	–	Fatores Tissulares de Inibição de Metaloproteases
TLR	–	Toll-like Receptor
TNF- α	–	Fator de Necrose Tumoral - α

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CONCEITOS GERAIS SOBRE A OSTEOARTROSE.....	18
2.2	ANATOMIA DA ARTICULAÇÃO FEMOROTIBIOPATELAR.....	20
2.2.1	Cápsula articular	22
2.2.2	Líquido sinovial	22
2.2.3	Cartilagem articular.....	22
2.3	FISIOPATOLOGIA DA OSTEOARTROSE	25
2.4	MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA OSTEOARTROSE	26
2.4.1	Acetato Sódico Monoiodado	28
2.4.2	Zymosan	28
2.4.3	Adjuvante Completo de Freund	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
3.2	PROTOCOLO ANESTÉSICO	32
3.3	ADMINISTRAÇÃO DO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND.....	32
3.4	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	33
3.5	PREPARO DAS PEÇAS ANATÔMICAS E LÂMINAS PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	34
3.6	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	35
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4	RESULTADOS	38
4.1	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ENCONTRADAS	38
4.2	PONTUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS	42
4.3	PONTUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES SINOVIAIS	45
4.4	PONTUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE CARTILAGEM.....	48
4.5	PONTUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES EM CONDRÓCITOS	52
4.6	ANÁLISE ENTRE GRUPOS	55
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Segundo a *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI), a osteoartrose (OA) ou osteoartrite é a forma de artrite mais comum. É uma doença que afeta todos os tecidos da articulação, incluindo cartilagem, osso, ligamentos e músculos. Qualquer articulação pode ser acometida, atingindo mais frequentemente joelhos, mãos e quadris.

A OA é uma doença degenerativa crônica que causa incapacidade funcional da articulação e, a não ser pela substituição da articulação por próteses específicas, não possui cura. Entretanto, existem tratamentos que reduzem a dor, melhoram a função articular e até retardam a evolução da doença (REZENDE et al., 2013).

No mundo, cerca de 250 milhões de pessoas são acometidas por tal doença, sendo que pessoas acima de 65 anos, mulheres e obesos, compõem as populações com maiores riscos de ocorrência (MORA et al., 2018).

Devido ao aumento da expectativa de vida e da obesidade, é possível esperar aumento dos casos na população nos próximos anos. Associando os casos existentes a essa expectativa do aumento de pacientes acometidos, demonstra-se a importância do estudo da fisiopatologia, progressão e possíveis tratamentos dessa enfermidade (MORA et al., 2018).

Para a realização de estudos com OA, são utilizados os modelos experimentais, *in vitro* e *in vivo*. Modelos *in vitro* bidimensionais de OA permitem uma análise acessível, de alto rendimento e com rigoroso controle experimental, mas não representam a realidade da fisiopatologia. Vários modelos *in vivo*, induzidos ou espontâneos, são capazes de reproduzir o início e a progressão da doença articular degenerativa, permitindo o estudo da fisiopatologia e também de possíveis tratamentos (SAMVELYAN et al., 2020).

A preparação de um modelo experimental de osteoartrose auxilia na avaliação de tratamentos da osteoartrose e no entendimento da evolução clínica da doença. Existem vários modelos experimentais de osteoartrose em animais que já são utilizados em estudos, como: ratos, cobaias, equinos, pequenos ruminantes e *minipig* (CHAPMAN, 2016), entretanto, poucos trabalhos utilizaram o suíno como modelo de OA. Novos protocolos têm sido propostos utilizando *minipigs* como modelo de osteoartrose reumática (TURGUT et al., 2013). Existem fatores que corroboram para a utilização do joelho da espécie suína para produção de modelo experimental de

osteoartrose nesta articulação, como o fato de esses animais serem produzidos comercialmente, além da semelhança na espessura da superfície condral comparada à do homem (HOCHBERG et al., 2012).

As principais técnicas para indução de OA em modelos experimentais são cirúrgicas. Essas metodologias, apesar de eficientes, aumentam o período experimental, demandam o uso de analgésicos e anti-inflamatórios nos primeiros dias após o procedimento cirúrgico e são cada mais criticadas por Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) (SAMVELYAN et al., 2019).

A aplicação de agentes indutores de OA não é recente, sendo conhecidos o uso de soluções como o acetato sódico monoiodado, o Zymosan, e o adjuvante completo de Freund (CHAPMAN, 2016), entretanto, o tempo entre a aplicação do agente indutor e o surgimento de lesões associadas à OA é um dado pouco estudado, apesar de que na maior parte das metodologias é adotado o período de 7 a 21 dias para indicar a existência de OA (a qual nem sempre é comprovada em avaliações imaginológicas) (SAMVELYAN et al., 2019).

O presente trabalho tem por finalidade avaliar a intensidade das alterações histopatológicas osteoarticulares, relacionadas à inflamação local; alterações sinoviais; alterações da cartilagem de revestimento e dos condrócitos, induzidas pelo ACF na articulação do joelho em suínos em três tempos diferentes após sua injeção 7, 21 e 35 dias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCEITOS GERAIS SOBRE A OSTEOARTROSE

A OA é definida como uma afecção degenerativa, caracterizada pelo defeito estrutural e conseqüente insuficiência da cartilagem articular, sendo esse efeito gerado por fatores mecânicos, genéticos, metabólicos, ósseos e hormonais, que promovem a desregulação entre a degradação e síntese da cartilagem articular e do osso subcondral (CAMANHO et al., 2011).

A manifestação da OA ocorre por alterações bioquímicas, moleculares, biomecânicas e morfológicas das células da matriz extracelular, que levam a lesões ulcerativas e perda da cartilagem articular, além de formação de osteófitos ou cistos subcondrais (CAMANHO et al., 2011).

O tratamento direto da OA, nos Estados Unidos, representa um custo de 60 bilhões de dólares/ano (SANTOS et al., 2014). Além disso, estima-se prevalência de 15% da doença mundialmente, sendo uma enfermidade de alto impacto social devido às limitações geradas ao portador (SANTOS et al., 2014).

Osteoartrose ou osteoartrite é a forma mais comum de artrite e uma das maiores causas de incapacitação da função articular. Essa doença articular degenerativa afeta mais de 250 milhões de pessoas no mundo, sendo mais frequente em pessoas com mais de 65 anos (MORA, et al., 2018).

O sinal clínico mais importante da OA é a dor que leva à restrição dos movimentos da articulação. Acredita-se que a dor é desencadeada por dois mecanismos, nociceptivo e neuropático, assim como excitabilidade anormal das vias aferentes da dor (SALAFFI et al., 2014). Portanto, o tratamento da OA é baseado no controle da dor, mas também em perda de peso, ganho de força, propriocepção, flexibilidade e amplitude de movimento, sendo que o tratamento medicamentoso utilizado tem por finalidade a melhora do processo patofisiológico, complementando medidas terapêuticas não medicamentosas supracitadas (REZENDE; GABI, 2009).

Segundo a Sociedade Brasileira de Reumatologia, no conjunto das doenças designadas como “reumatismos”, a osteoartrose é a mais frequente, sendo a causa de 30 a 40% das consultas ambulatoriais na especialidade. Essa lesão degenerativa articular é responsável por 7,5% de todos os afastamentos do trabalho, sendo a segunda doença entre as que justificam o auxílio-inicial e também a segunda em

prorrogação do auxílio-doença, com 10,5% dos casos. Além disso, é a quarta a determinar aposentadoria com 6,2% dos casos, segundo dados da Previdência Social no Brasil (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2019).

Qualquer articulação pode ser acometida, mas dentre as grandes articulações, a do joelho é a mais afetada, resultando em déficit funcional articular em 10% dos indivíduos acima de 65 anos e em 25% quando há casos de doença avançada (AMMAR et al., 2015). Apesar da epidemiologia mundial, não existem estudos epidemiológicos nacionais que elucidem a prevalência ou os gastos públicos do tratamento da osteoartrose (AMMAR et al., 2015).

O diagnóstico da OA é realizado pelo histórico e exame clínico do paciente, além de muitas vezes ser confirmado pela imagem radiográfica da articulação, mas exames laboratoriais podem ser utilizados para descartar outros diagnósticos (LESPASIO et al., 2017).

A osteoartrose pode ser classificada em dois grupos de acordo com sua etiologia: primária, também chamada de idiopática ou não traumática, e secundária, geralmente causada por trauma ou desalinhamento mecânico. A avaliação clínica e imaginológica podem ser utilizadas para estimar o prognóstico e a progressão da doença, sendo que essa é uma doença de baixo potencial curativo, devido à sua baixa vascularização e inervação (MORA et al., 2018).

A OA é uma condição progressiva e degenerativa, com improvável regressão e regeneração de estruturas danificadas. Sendo assim, as modalidades terapêuticas atuais visam controle de sintomas, a não ser que a severidade do dano articular demande intervenção cirúrgica (ROBINSON et al., 2016).

Diferentes entidades acadêmicas e profissionais, como a *Osteoarthritis Research Society International* (OARSI), *American College Of Rheumatology* (ACR) e *American Academy of Orthopedic Surgeons* (AAOS), desenvolveram *guidelines* para padronização e recomendação dos tratamentos disponíveis (MORA et al., 2018).

O objetivo do manejo terapêutico da OA é o controle da dor e melhorar a função articular e a qualidade de vida. Terapias não farmacológicas devem ser sempre utilizadas e priorizadas em relação a tratamentos farmacológicos (NELSON et al., 2014).

Dentro das indicações não farmacológicas, estão caminhadas, subida de escadas e ciclismo, que, se realizadas de forma adequada a cada paciente, podem reduzir a sensibilidade enquanto melhora a função articular. O ciclismo

particularmente pode ter maior benefício devido ao baixo impacto articular (ESSER; BAILEY, 2011).

Apesar de não haver conformidade quanto à indicação de algumas terapias, todas as entidades realçam a importância do controle do peso na doença articular do joelho (MORA et al., 2018).

O Colégio Americano de Reumatologia recomenda a perda de peso para pacientes que se encontram acima do peso ideal e participação em atividades aeróbicas e exercícios aquáticos. O tratamento medicamentoso, no entanto, é recomendado de acordo com o caso, podendo ser exemplificado pela indicação do uso de acetaminofeno, anti-inflamatórios não esteroidais (orais ou tópicos), Tramadol e aplicação intra-articular de corticoides. A mesma entidade não recomenda o uso de sulfato de condroitina e glucosaminoglicos (HOCHBERG et al., 2012).

O uso oral de anti-inflamatórios não esteroidais é indicado na ausência de comorbidades (OARSI e AAOS), mas a ACR indica essa terapêutica sob recomendação condicional a cada caso, no entanto, o uso dessa classe farmacológica de forma tópica é indicado por todas as entidades citadas. O uso de opioides é indicado, apenas Tramadol, pela AAOS. Não existe conformidade quanto à indicação de aplicação intra-articular de corticosteroides e viscosuplementação. A suplementação por nutracêuticos com glicosaminoglicos ou sulfato de condroitina não são indicados por essas entidades (MORA et al., 2018).

2.2 ANATOMIA DA ARTICULAÇÃO FEMOROTIBIOPATELAR

A articulação femorotibiopatelar ou articulação do joelho conecta três estruturas ósseas e além dessas é constituída por tecido conjuntivo fibroso, cartilaginoso e líquido sinovial.

As articulações sinoviais são compostas por cápsula articular, líquido sinovial, ligamentos, disco fibrocartilaginoso (não presente em todas) e, no caso da articulação do joelho, meniscos. A articulação do joelho, além de ser classificada como sinovial, também recebe a denominação de diartrose, pois permite uma movimentação ampla, embora em apenas um plano de movimento, sendo dotada de uma cavidade articular, que contém líquido sinovial (ABRAHAMSON, 2017). Além disso, essa articulação também é classificada como uma articulação composta, pois promove a conexão entre três estruturas ósseas (GETTY, 1986).

As superfícies ósseas distal do fêmur, proximal da tíbia e caudal da patela formam as superfícies articulares. Elas são constituídas de tecido ósseo denso, que difere histologicamente da substância compacta ordinária. Recobrimo as superfícies articulares, encontram-se as cartilagens articulares do tipo hialina. A espessura da cartilagem varia, sendo na superfície côncava mais espessa perifericamente, enquanto na superfície convexa a porção central tem maior espessura. A cartilagem articular é caracteristicamente avascular, lisa e com aspecto de tonalidade azulada a fresco. Essas estruturas reduzem a carga recebida nas superfícies articulares, bem como auxiliam na redução da fricção entre as superfícies durante movimento (GETTY, 1986).

A articulação é protegida por uma cápsula articular, formada por duas camadas, uma externa, composta por tecido fibroso, e uma interna, conhecida como membrana sinovial, cujas células constituintes são responsáveis pela produção do líquido sinovial. Essa cápsula articular é fechada, contendo um espaço livre em seu interior, que é preenchido com líquido sinovial (GETTY, 1986).

Os ligamentos são elementos constituintes da articulação, tendo como função impedir movimentos inadequados. No caso, a articulação do joelho é classificada como uma articulação gínglima, que promove uma amplitude de movimento em apenas um plano, semelhante à dobradiça (GETTY, 1986).

Em suínos, a cápsula femoropatelar é fortemente reforçada em ambos os lados por faixas que se ligam aos ligamentos colaterais (femorotibiais). A cavidade é contínua distalmente com aquela da junta femorotibial, formando, portanto, uma cavidade única femorotibiopatelar. A prega sinovial sagital estende-se a uma pequena distância do ligamento cruzado cranial. A bolsa suprapatelar estende-se cerca de 2 a 3 cm próximo da tróclea; a partir desta, uma bolsa estende-se por baixo do quadríceps femoral até cerca de 2,5 cm e comunica-se por meio de uma grande abertura arredondada com a cavidade. Há um forte ligamento patelar que tem uma bolsa sob sua parte distal. O tendão do bíceps femoral assume o lugar do ligamento patelar lateral. Um pequeno ligamento transverso liga a face cranial dos meniscos (SISSON, 1986).

2.2.1 Cápsula articular

A cápsula articular é formada por duas camadas. A camada externa, denominada fibrosa, composta por tecido conjuntivo fibroso denso, gerando resistência. A camada interna, também chamada de camada sinovial, é constituída por dois tipos celulares, um tipo celular semelhante ao fibroblasto e outro com aspecto e atividade semelhantes ao macrófago (ABRAHAMSON, 2017).

2.2.2 Líquido sinovial

O líquido sinovial preenche a cavidade articular, sendo incolor, transparente e viscoso. O líquido é um dialisado do plasma sanguíneo e contém alta concentração de ácido hialurônico, sintetizado pelas células da camada sinovial da cápsula articular. A função do líquido é a nutrição de células da cápsula articular, principalmente da camada sinovial, e da superfície articular, além de auxiliar na redução da carga recebida na articulação e reduzir a fricção entre as superfícies ósseas (MONTANARI, 2016).

2.2.3 Cartilagem articular

O tecido cartilaginoso é uma forma especializada de tecido conjuntivo de consistência rígida. A cartilagem articular tem duas funções principais: absorção de choque mecânico sob a articulação e facilitar o deslizamento das estruturas componentes da articulação (ABRAHAMSON, 2017).

2.2.3.1 Matriz Extracelular (MEC)

As funções da cartilagem são dependentes da estrutura da sua matriz extracelular (MEC), que é constituída por colágeno, elastina, proteínas associadas a glicosaminoglicanos, ácido hialurônico e outros tipos de glicoproteínas. A rigidez e a turgidez da MEC são produzidas pelas ligações eletroestáticas entre os glicosaminoglicanos sulfatados e o colágeno, além da grande quantidade de moléculas de água presa a esses glicosaminoglicanos (ABRAHAMSON, 2017).

O tecido cartilaginoso é avascular e, no caso das cartilagens hialinas, a sua nutrição é fornecida pelo líquido sinovial, presente na cavidade articular. Além disso, esse tecido é desprovido de vasos linfáticos e nervos (ABRAHAMSOHN, 2017).

A MEC da cartilagem hialina é formada por fibras de colágeno tipo II (cerca de 40% do peso seco da MEC) associada a proteoglicanos, água e glicoproteínas (MONTANARI, 2006).

A conectividade entre as moléculas que formam a MEC é fornecida pela condronectina, uma glicoproteína estrutural com alta capacidade de adesão. Essa macromolécula está ligada a condrócitos, fibrilas de colágeno tipo II e glicosaminoglicanas (MONTANARI, 2016).

Os glicosaminoglicanos, apesar de não representarem a maior parte dos componentes da MEC, têm importante papel estrutural na matriz. Essas moléculas associam-se a proteínas, por meio de ligações covalentes, formando uma estrutura molecular chamada de proteoglicanos. Os proteoglicanos consistem em uma haste central (ceme) da qual são irradiadas várias moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados (assemelhando-se a uma escova de limpeza de tubos de ensaio), como condroitina-4-sulfato, condroitina-6-sulfato e sulfato de queratina. O ácido hialurônico pode receber até 200 ligações covalentes com os proteoglicanos, formando um agregado molecular grande (chegando a 4 μm). Esse agregado molecular confere rigidez à cartilagem e liga-se a fibras colágenas formando a estrutura básica da MEC (ABRAHAMSOHN, 2017).

Os proteoglicanos, principalmente sua porção formada pelos glicosaminoglicanos, têm muitas moléculas de água associadas, que recebem a denominação de água de solvatação. Solvatação é um fenômeno químico no qual uma substância polar dissolve-se em outra substância polar, entretanto, nenhuma das moléculas envolvidas sofre alteração estrutural, daí entende-se que as moléculas do solvente “rodeiam” as do soluto. A água de solvatação atua como um sistema de absorção de choque mecânico, funcionalmente reduzindo o estresse mecânico na articulação (ABRAHAMSOHN, 2017).

Histologicamente, ao redor dos condrócitos, a MEC é ligeiramente distinta, formando um halo estreito ao redor das células. Essa zona foi denominada de matriz capsular, entretanto essa região não é formada por um invólucro protetor do condrócito, mas tem essa característica basófila, metacromática e de reação PAS

realçada pela grande concentração de glicosaminoglicanos contendo radicais sulfatos na região (MONTANARI, 2006).

2.2.3.2 Condrócitos

Os condrócitos periféricos apresentam um formato alongado, com o maior eixo paralelo à superfície. Já as células mais profundas são arredondadas e agrupadas (até oito células por grupo), sendo denominadas de grupos isógenos, por terem origem em um condroblasto comum (MONTANARI, 2006)

Essas células são as responsáveis pela secreção do colágeno, principal constituinte da cartilagem articular, sendo o colágeno tipo II o mais frequentemente secretado em situações normais. Além do colágeno, esse tipo celular também secreta proteoglicanos e glicoproteínas, como a condronectina, principal responsável pela adesão do tecido (ABRAHAMSOHN, 2017).

A produção e secreção dessas substâncias pelos condrócitos sofre influência hormonal. Tiroxina e testosterona induzem a produção e secreção de proteoglicanos, enquanto que cortisona e estradiol promovem o efeito oposto. O fígado produz somatomedina C, a partir da influência do hormônio do crescimento produzido pela hipófise, sendo essa a molécula que estimula a multiplicação dos condroblastos e aumenta sua capacidade secretória, promovendo o crescimento da cartilagem.

A nutrição dos condrócitos não ocorre por vasos sanguíneos, já que o tecido é avascular. A tensão de oxigênio exposta ao condrócito é baixa, sendo que a degradação de glicose ocorre principalmente por anaerobiose, gerando ácido láctico como produto final. Os nutrientes chegam aos condrócitos mais profundos por difusão (de vasos que irrigam a articulação), na matriz os nutrientes são distribuídos também por difusão na água de solvatação, mas são dependentes da força de bombeamento promovida pela compressão e descompressão da cartilagem (ABRAHAMSOHN, 2017).

A histogênese da cartilagem hialina inicia-se pelo mesênquima, que dá origem a um tecido com grande quantidade de células próximas umas das outras. Os condroblastos iniciam a produção de MEC, o que promove o afastamento das células, nesse momento, as células iniciam processos de mitose e diferenciação, formando os grupos isógenos (MONTANARI, 2006).

2.3 FISIOPATOLOGIA DA OSTEOARTROSE

A OA pode ocorrer por eventos mecânicos ou biológicos que desequilibram a relação normal entre a degradação e a síntese das células na matriz extracelular (MEC) da cartilagem e do osso subcondral. A doença pode ser desencadeada por múltiplos fatores, incluindo fatores genéticos, metabólicos e traumáticos, levando a alterações morfológicas, bioquímicas, moleculares e biomecânicas tanto das células quanto da matriz extracelular, as quais resultam em fibrilação, ulceração e perda da cartilagem articular, além de remodelação e esclerose do osso subcondral com formação de osteófitos (SANDELL; AIGNER, 2001).

O dano produzido pela OA ocorre em toda a articulação sinovial, englobando a cartilagem, líquido sinovial e osso subcondral (SANDELL; AIGNER, 2001). As células de cada um desses tecidos possuem diferentes formas de resposta à enfermidade, mas essas respostas podem resultar em degeneração articular (CAMPOS et al., 2013). As lesões articulares patológicas resultantes da OA são: degeneração da cartilagem e meniscos, calcificação da cartilagem, esclerose do osso subcondral, formação de osteófitos, inflamação do líquido sinovial e da gordura infrapatelar (ANDERSON; LOESER, 2010; RATNESWARAN et al., 2020).

Sandell e Aigner (2001) descrevem que a OA pode ser dividida em duas fases: uma biosintética, na qual as células que compõem as cartilagens articulares, os condrócitos, tentam realizar o reparo da matriz extracelular danificada; e uma fase degenerativa, na qual a atividade de enzimas produzidas pelos condrócitos promovem lise de matriz extracelular cartilaginosa, inibição da produção de matriz extracelular e aceleração da lesão ulcerativa na cartilagem.

Alterações que ocorrem na articulação durante o envelhecimento podem contribuir para a instalação da OA, por exemplo, um aumento no número de células que manifestam um fenótipo secretor senescente leva ao aumento da secreção de citocinas e de metaloproteinases de matriz (do inglês *matrix metalloproteinases* – MMPs) (CHOW; CHIN, 2020). Além disso, o envelhecimento reduz a produção de fatores de crescimento, bem como a capacidade de resposta a injúrias dos condrócitos, reduzindo a produção de matriz cartilaginosa e reparação do dano ocorrido (ANDERSON; LOESER, 2010).

A reação inflamatória articular bem como o envolvimento de células do sistema imunológico na fisiopatologia da OA já foram evidenciadas (SCANZELLO; GOLDRING, 2012). Substâncias inflamatórias, como citocinas e quimiocinas, são produzidas por condrócitos e sinoviócitos, células que compõem a superfície da membrana sinovial, em articulações de pacientes com OA. Além disso, fibroblastos também atuam como fonte de citocinas pró-inflamatórias e de enzimas degradadoras de matriz cartilaginosa quando a articulação apresenta o estado de OA (HOU et al., 2017). Além dos condrócitos, sinoviócitos e fibroblastos, é possível verificar que a gordura infrapatelar pode servir de fonte de substâncias pró-inflamatórias, já que esse tecido contém uma quantidade significativa de macrófagos e células T (IOAN-FACSINAY; KLOPPENBURG, 2013).

A produção de mediadores inflamatórios altera a rota de sinalização celular, expressão gênica e comportamento do tecido articular. Essa mudança na sinalização celular potencializa a produção de fatores inflamatórios, além de aumentar a atividade enzimática, promovendo alterações anatômicas, fisiológicas e funcionais da articulação (CHOW, 2020).

Scanzello e Goldring (2012) descrevem que a inflamação sinovial persistente tem grande papel nos sinais clínicos e progressão da alteração estrutural articular na OA, sendo que a sinovite tem sido correlacionada à severidade dos sinais, à velocidade da degeneração articular e à produção de osteófitos. A resposta do líquido sinovial à OA é complexa e variável, sendo que essa complexidade pode ser atribuída, em parte, a mudanças no padrão da doença conforme sua progressão.

2.4 MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA OSTEOARTROSE

Modelos experimentais são sistemas utilizados para simplificar fenômenos complexos (PRITZKER, 1994). Um modelo animal para estudo de doenças humanas pode ser definido como um grupo de animais que apresentam um processo biológico herdado, adquirido natural ou experimentalmente induzido, passível de investigação científica, que em um ou mais aspectos se assemelha à doença humana (SAMVELYAN, 2020).

As articulações do joelho de suínos e humanos compartilham de algumas semelhanças anatômicas e também no aspecto biomecânico, o que permite o uso da espécie suína na produção de um modelo de osteoartrose (RAMIREZ et al., 2016).

Em diversos estudos, o suíno vem sendo utilizado como modelo experimental de OA, além de ser também fonte de condrócitos articulares usados em pesquisas sobre a fisiopatologia da OA (SCHILICHTING et al., 2014). O tamanho da articulação, a carga recebida e a espessura da cartilagem da articulação do joelho suíno simulam as condições da articulação humana melhor do que modelos de pequenos animais, como ratos ou camundongos (HASLAUER et al., 2013).

Cruz e col. (2015) produzem fibrilações, fissuras, formação de agrupamento de condrócitos, diminuição do conteúdo de proteoglicanos e regulação positiva das proteínas associadas a OA MMP-3, MMP-13, procaspase-3 e IL-1, ou seja, lesões e marcadores semelhantes aos encontrados em OA em humanos. Para a realização dessa metodologia, o grupo de pesquisadores realiza meniscectomia em porcos vietnamitas miniatura, associando ao trauma cirúrgico um regime de exercício de baixo impacto diário. O tempo decorrido entre a indução da lesão e a avaliação da articulação foi de 28 dias (CRUZ et al., 2015).

A produção de modelos animais de OA pode ser realizada de três formas: modelo espontâneo, cirúrgico ou por administração de agente indutor.

O modelo espontâneo é caracterizado por não haver a indução de OA pelo pesquisador. Esse modelo é obtido pelo desenvolvimento da alteração articular por características individuais, genéticas e ambientais, em um curso de doença natural para a espécie. Suínos, cães, ovinos, equinos, ratos e cobaias podem desenvolver OA espontânea. A progressão da doença nesse modelo pode ser imprevisível ou sem possibilidade de pareamento com um controle adequado (LITTLE; ZAKI, 2012).

No modelo cirúrgico, é realizado um procedimento com o intuito de induzir trauma, desestabilizando a articulação em estudo. Dentre os procedimentos utilizados, destacam-se a transecção do ligamento cruzado e a lesão meniscal. Uma possível desvantagem desse tipo de modelo é o período pós-operatório, no qual pode ser necessária a utilização de fármacos para controle da dor, que pode variar entre 3 a 10 dias dependendo da metodologia adotada (RAMIREZ et al., 2015).

O modelo por administração de agente indutor resulta da aplicação intra-articular de substâncias que promovem atividade inflamatória ou traumatismo químico. A utilização desse tipo de modelo experimental de OA tem por vantagem permitir que pesquisadores com menor treinamento cirúrgico também estudem esse tipo de lesão (LITTLE; ZAKI, 2012).

Tanto no modelo experimental de OA cirúrgico, como no modelo por administração de agente indutor, é possível a obtenção de alterações articulares semelhantes à OA de humanos, como o desenvolvimento de osteófitos, danos às superfícies cartilaginosas, remodelagem óssea subcondral e comportamento associado à dor (CHAPMAN, 2016).

A indução por administração de agente indutor de OA em modelos animais pode ser realizada pela aplicação de diferentes substâncias, dentre as quais se destacam o acetato sódico monoiodado, o Zimozan e o adjuvante completo de Freund (CHAPMAN, 2016).

2.4.1 Acetato Sódico Monoiodado

A aplicação de acetato sódico monoiodado para a produção de osteoartrose em ratos e camundongos é frequente na literatura. A osteoartrose produzida nessa metodologia permite o estudo de alterações anatomopatológicas e também de estudo da dor articular. Guzman e col. (2003) relatam que um dia após aplicação é possível observar extensas áreas de lesões em condrócitos, que podem envolver toda a espessura da cartilagem. Após o dia 7 de aplicação, observou-se intensa inflamação sinovial e redução da matrix cartilaginosa, sendo que a lesão continuou a evoluir até o dia 56, embora tenha sido possível identificar proliferação de condrócitos a partir do dia 14 (GUZMAN et al., 2003).

Existe uma relação dose resposta quanto à produção da osteoartrose. Guingamp e col. (1997) discorrem que é possível obter diferentes níveis de osteoartrose dependendo da dose aplicada, sendo que quanto maior a dose utilizada maior o grau da osteoartrose, entretanto, nesse trabalho, não foi utilizado um sistema de avaliação específico para a análise histopatológica, dificultando uma abordagem mais direcionada a esse parâmetro.

2.4.2 Zymosan

O Zymosan é um polissacarídeo derivado da parede do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, uma substância capaz de induzir fenômenos inflamatórios sistêmicos, muito empregado no estudo de fármacos (RAMOS, 2000).

A administração de Zymosan intra-articular tem a capacidade de induzir inflamação com uma persistente proliferação de sinóvia e degradação da cartilagem, reproduzindo muitos achados da OA (RAMOS, 2000). Não ocorre supressão da atividade mitótica da medula óssea adjacente à inflamação e também há menor efeito em tecido ósseo a partir do periósteo, demonstrando que o modelo promove menos efeitos sistêmicos e menor dano ao tecido periarticular (SAMVELYAN, 2020).

A osteoartrite é estabelecida após quatro dias da administração intra-articular de Zymosan, quando utilizado em articulação temporomandibular em ratos (CHAVES et al., 2011). A utilização em articulação do joelho já foi descrita por outros autores, como Castano e col. (2007), que realizaram a administração intra-articular, mas utilizaram apenas a avaliação da circunferência da articulação como critério de detecção da inflamação articular. Apesar de ocorrer sinais clínicos de inflamação poucas horas após a administração do agente indutor, a OA é detectada por meio de avaliações radiográficas após um período mínimo de sete dias, embora seja possível observar sinais da doença em avaliação histológica já após 48 horas da injeção articular (RAMOS, 2000).

Apesar da reação inflamatória ser notória pelo edema gerado já poucas horas após a injeção intra-articular do Zymosan, a circunferência articular se aproxima da normalidade após cinco dias, mantendo, no entanto, a disfunção da articulação visualizada por claudicação (CASTANO et al., 2007).

2.4.3 Adjuvante Completo de Freund

A metodologia para a promoção de OA pela administração intra-articular de Adjuvante Completo de Freund já é conhecida, sendo os registros mais antigos datados da década de 1960, período no qual uma série de trabalhos conduzidos por Waksman, Pearson e Sharp descrevem as alterações clínicas e histológicas produzidas pela administração de ACF em vários tecidos, incluindo a articulação.

Clinicamente considera-se que a OA induzida pelo adjuvante fica bem estabelecida em torno de 16 dias após a administração, mas sinais podem ser observados a partir de sete dias (RAMOS, 2000).

Existem dois tipos de adjuvantes de Freund, o completo e o incompleto. O adjuvante incompleto consiste em uma mistura de surfactante e óleo mineral, geralmente Arlacel ou Drakeol, já o adjuvante completo, além da mistura mencionada,

ainda é composto por *Mycobacterium bovis* morto em uma concentração máxima de 1 mg/mL (MARTINEZ et al., 2017).

Cortes histológicos da região injetada com o adjuvante são caracterizados por reação inflamatória formada por leucócitos polimorfonucleares e linfócitos, com formação de *pannus*, um tecido conjuntivo de origem inflamatória granular com vascularização. Essa reação inflamatória evolui com erosão da cartilagem e do osso subcondral, levando posteriormente à anquilose (RAMOS, 2000).

Yuce e col. (2020) promovem OA em articulação temporomandibular de ratos Wistar para avaliar a capacidade protetora de agentes anti-inflamatórios administrados pela via intra-articular, entretanto, pela carência de dados, foi necessária a realização de uma análise prévia, para verificar a capacidade de o adjuvante promover OA. O mesmo estudo afirma que no sétimo dia após a aplicação foi possível detectar sinais clínicos relacionados à OA e na análise histopatológica foram demonstrados infiltrado leucocitário, hiperplasia de membrana sinovial, aumento da vascularização, edema e deformação do disco (YUCE et al., 2020).

A aplicação em articulação do joelho de ratos Wistar do ACF é capaz de produzir OA, em doses de 0,05 a 0,1 mg, em administração única (TORRES et al., 2009). Essa metodologia pode ser utilizada para avaliação de tratamentos da OA, entretanto, não existe consenso quanto ao início do tratamento ou tempo entre a administração do adjuvante e o sacrifício dos animais. Torres e col. (2009), por exemplo, realizam a administração do tratamento sete dias após a administração do adjuvante, já Helyes e col. (2004) indicam que a OA apresenta evolução por 21 dias após a aplicação, iniciando seus estudos após esse período e Gautam e col. aguardam 21 dias após a administração para iniciar uma terapia na OA induzida.

Em suínos, o estudo da OA produzida pela administração do adjuvante foi demonstrada por Murayama (2003) na articulação temporomandibular, pela injeção de 0,2 mL da solução do adjuvante completo. Nesse estudo, os animais foram sacrificados após 21 dias da aplicação e a avaliação histopatológica comprovou a indução da OA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado o estudo histológico das alterações osteoarticulares induzidas pela aplicação intra-articular de um agente indutor de OA (ACF) em joelho suíno. O ACF é uma solução de antígeno emulsionado em óleo mineral, composto por microbactérias inativadas e desidratadas.

Foram utilizados 24 suínos da raça Large White pesando entre 25 e 50 kg. Os animais foram divididos em 3 grupos com 6 animais cada, denominados grupo de estudo 1, 2, 3. Os outros 6 animais foram divididos em 3 grupos, denominados de grupo controle 1, 2 e 3. A aplicação intra-articular do ACF ocorreu em todos os animais dos grupos de estudo no dia 0 e os grupos controle receberam, no mesmo momento, NaCl 0,9%. Aos 7 dias após a aplicação intra-articular foram sacrificados os animais dos grupos estudo 1 controle 1. No dia 21 foram sacrificados os animais dos grupos de estudo 2 e controle 2. Por fim, no dia 35, foram sacrificados os animais dos grupos de estudo 3 e controle 3. Essa metodologia foi avaliada e aprovada pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Tuiuti do Paraná sob o protocolo 042/17. O cronograma do experimento está resumido no Quadro 1 a seguir:

QUADRO 1 – CRONOGRAMA DO EXPERIMENTO

Grupo	Dia 0	Dia 7	Dia 21	Dia 35
Grupo de estudo 1 (n=6)	Aplicação ACF	Sacrifício dos animais		
Grupo controle 1 (n=2)	Aplicação de NaCl 0,9%	Sacrifício dos animais		
Grupo de estudo 2 (n=6)	Aplicação ACF		Sacrifício dos animais	
Grupo controle 2 (n=2)	Aplicação de NaCl 0,9%		Sacrifício dos animais	
Grupo de estudo 3 (n=6)	Aplicação ACF			Sacrifício dos animais
Grupo controle 3 (n=2)	Aplicação de NaCl 0,9%			Sacrifício dos animais
Total de animais	24	8	8	8

FONTE: O autor (2021).

Durante o período experimental, os animais foram mantidos em baias do Hospital Fazenda Pé de Serra da Universidade Tuiuti do Paraná. As baias foram forradas com cama de maravalha e a oferta de água e alimento foi *ad libitum*. As baias têm dimensão de 10 m².

3.2 PROTOCOLO ANESTÉSICO

Para a administração de ACF nos animais dos grupos de estudo e de NaCl 0,9% nos animais dos grupos controle, foi realizada aplicação intramuscular de Xilazina 2% na dose de 1,5 mg/kg associada à Cetamina 10% 5 mg/kg. As medicações foram aplicadas em sala de preparo e só após o animal adotar decúbito lateral era conduzido à sala de procedimento.

Na sala de procedimento, a técnica anestésica foi complementada com uma máscara de isoflurano em dose efeito como demonstrado na Figura 1.

FIGURA 1 – PROCEDIMENTO ANESTÉSICO GERAL EM SUÍNOS PREVIAMENTE À ADMINISTRAÇÃO DO ACF



FONTE: O autor (2021).

3.3 ADMINISTRAÇÃO DO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND

Na sala de procedimento, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito. A articulação femorotibiopatelar esquerda foi preparada com aplicação tópica de álcool 70%, seguido de Clorexidina a 2% e novamente álcool 70%. Após a realização da antisepsia, os animais teste receberam aplicação intra-articular de ACF

em um volume total de 1 ou 1 mg de componente ativo. O mesmo procedimento foi adotado nos animais do grupo controle, que receberam solução de NaCl 0,9% no lugar do ACF.

O acesso para administração intra-articular foi identificado pela palpação do fêmur distal, tibia proximal e patela, sendo que a administração foi realizada com a articulação em flexão, na porção cranial articular, caudal ao ligamento patelar por acesso medial, como demonstrado na Figura 2.

FIGURA 2 – ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DO ACF EM ARTICULAÇÃO DO JOELHO ESQUERDO DE SUÍNO



FONTE: O autor (2021).

Após a administração intra-articular, os animais foram mantidos em baia de recuperação até que retornassem à estação.

3.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os grupos estudo e controle foram sacrificados em diferentes tempos após a administração intra-articular, sendo o GE1 e GC1 em 7 dias, GE2 e GC 2 em 21 e GE3 e GC3 em 35. O sacrifício dos animais foi realizado com a administração intravenosa de Propofol em dose efeito seguido de cloreto de potássio 19,1%, num volume total de 20 mL, como demonstrado na Figuras 3. Durante esse procedimento, os animais tiveram o eletrocardiograma monitorado com monitor multiparamétrico InMax Vet. Comprovou-se o óbito do animal por apresentação de apneia sustentada superior a 5 minutos e manutenção de assistolia, comprovada por onda isoelétrica pelo mesmo período de tempo.

FIGURA 3 – ADMINISTRAÇÃO DE KCL 19,1% EM ACESSO DE VEIA MARGINAL AURICULAR EM SUÍNO



FONTE: O autor (2021).

3.5 PREPARO DAS PEÇAS ANATÔMICAS E LÂMINAS PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Após o óbito dos animais, foi realizada a desarticulação da cabeça femoral de sua inserção acetabular e o membro esquerdo foi levado à sala de preparo de peças anatômicas. A articulação foi preparada por remoção de tecidos adjacentes à articulação e secção óssea distal em fêmur e proximal em tíbia. Durante o processo de preparo da peça, a articulação não foi invadida.

A articulação foi mantida em extensão com o uso de arames antes da sua fixação em formol 10%, como demonstrado nas Figuras 4 e 5.

FIGURA 4 – PEÇA ANATÔMICA DE ARTICULAÇÃO DO JOELHO SUÍNO PREPARADA EM EXTENSÃO PREVIAMENTE À CONSERVAÇÃO COM FORMOL 10%



FONTE: O autor (2021).

FIGURA 5 – PEÇA ANATÔMICA DE ARTICULAÇÃO FEMOROTIBIOPATELAR DE SUÍNO CONSERVADA EM FORMOL 10%



FONTE: O autor (2021).

As amostras de articulação do joelho foram mantidas em solução fixadora e descalcificante de formol 10% associada ao ácido fórmico 5% por 22 meses, a qual era trocada a cada 20 dias. Após completa descalcificação, as amostras foram submetidas ao processamento de rotina para histopatologia. Os cortes histológicos seriados de 5 μ m foram corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina (coloração universal) e Tricrômico de Mallory (coloração para tecido conjuntivo fibroso).

3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A avaliação histopatológica consistiu na observação e pontuação de lesões associadas à inflamação, sinóvia, cartilagem e condrócitos, seguindo a metodologia proposta por Ostegaard e col. (1997), como demonstrado no Quadro 2.

QUADRO 2 – CRITÉRIOS COM RESPECTIVA PONTUAÇÃO DA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Inflamação	
Abscessos	1
Neutrófilos	2
Linfócitos e plasmócitos	3
Células gigantes multinucleadas	4
Neovasos jovem/maduro	5
Tecido conjuntivo fibroso jovem/maduro	6
Total	21
Sinóvia	
Edema	1
Hipertrofia vilosa	2
Hipertrofia/hiperplasia de sinoviócitos	3
Sinoviócitos vacuolizados	4
Sinóvia recobrimdo cartilagem	5
Ausência de sinóvia	6
<i>Pannus</i> (fibrovascular)	7
Total	28
Cartilagem	
Edema	1
Erosão	2
Fibrilação	3
Úlcera superficial	4
Úlcera profunda	5
Ausência de cartilagem	6
Hipercelularidade (superficial/intermediária)	7
Hipercelularidade (média/profunda)	8
Perda da basofilia	9
Flap	10
Total	55
Condrócitos	
Grupos isógenos superficial/intermediário	1
Grupos isógenos médio/profundo	2
Condrócito colunar	3
Total	6

FONTE: Modificado de Ostergaard et al. (1997).

A avaliação é dividida em quatro critérios, sendo eles inflamação, sinóvia, cartilagem e condrocitos. No critério inflamação, seis parâmetros, que totalizavam 21 pontos, foram avaliados: presença de abscesso, infiltração de neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, presença de células gigante multinucleada, formação de

neovascularização (jovem ou maduro), presença de tecido conjuntivo fibroso (jovem ou maduro).

Na sinóvia, sete parâmetros foram avaliados, com máximo de 28 pontos: presença de edema, hipertrofia vilosa, hipertrofia ou hiperplasia de sinoviócitos, vacuolização de sinoviócitos, presença de sinóvia recobrando cartilagem, ausência de sinóvia e presença de *pannus*.

Com relação à cartilagem, dez parâmetros foram avaliados: produção de edema, presença de erosão da cartilagem, fibrilação, presença de lesão ulcerativa (dividida em superficial e profunda), regiões de ausência de cartilagem, hiper celularidade (dividida em superficial, intermediária, média e profunda), perda de basofilia e presença de flap. O somatório das lesões observadas na cartilagem poderia chegar ao total de 55.

Na avaliação de condrócitos, foi avaliada a presença de grupos isógenos ou cluster, sendo dividido em 1 a 2 por campo, 3 a 4 por campo, 5 ou mais por campo e presença de condrócitos colunares, podendo chegar a um total de 10.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os aplicativos PAST 4.04 e IBM SPSS Statistics 25 para os estudos estatísticos. Os gráficos foram gerados com os aplicativos Power Bi Desktop, Excel, PAST 4.04 e IBM SPSS Statistics 25.

A avaliação comparativa entre os grupos de estudo 1, 2 e 3 e seus respectivos controles foi realizada por meio de teste não paramétrico de Mann-Whitney, considerando a significância de 5%.

Para verificação da influência das aplicações intra-articulares entre as distribuições dos índices de inflamação, sinóvia, cartilagem e condrócitos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Em seguida, empregado o teste *post hoc* de Dunn e a correção de Bonferroni.

4 RESULTADOS

Na avaliação 8 horas após a administração intra-articular do ACF, todos os animais teste apresentaram claudicação, o que não foi observado nos animais dos grupos controle.

Outros sinais clínicos apresentados em alguns animais dos grupos de estudo 1, 2 e 3 foram diarreia e tosse, sendo a quantidade de animais que apresentaram tais sinais representada no Quadro 3.

QUADRO 3 – QUANTIDADE DE ANIMAIS QUE APRESENTARAM SINAIS SISTÊMICOS NAS PRIMEIRAS 72 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO ACF

GRUPO	TOSSE	DIARREIA
GRUPO 1 (N=6)	2	6
GRUPO 2 (N=6)	3	6
GRUPO 3 (N=6)	3	6
CONTROLE	0	0

FONTE: O autor (2021).

A tosse e a diarreia persistiram por um período de 72 horas, enquanto que a claudicação foi um sinal persistente em todos os animais dos grupos de estudo 1, 2 e 3 até o momento do sacrifício. Não foram registradas essas alterações nos animais dos grupos controle.

Não houve alteração da ingesta alimentar ou hídrica em nenhum dos grupos.

4.1 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ENCONTRADAS

Na avaliação histopatológica dos tecidos articulares do joelho esquerdo dos animais dos grupos de estudo 1, 2 e 3 foram constatadas várias alterações inflamatórias, sinoviais e de cartilagem, mas as alterações dos condrócitos foram menos frequentes.

A Figura 6 apresenta as alterações histopatológicas encontradas com maior frequência na avaliação dos grupos de estudo 1, 2 e 3 no que diz respeito à inflamação.

FIGURA 6 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS ENCONTRADAS NAS AVALIAÇÕES DOS GRUPOS

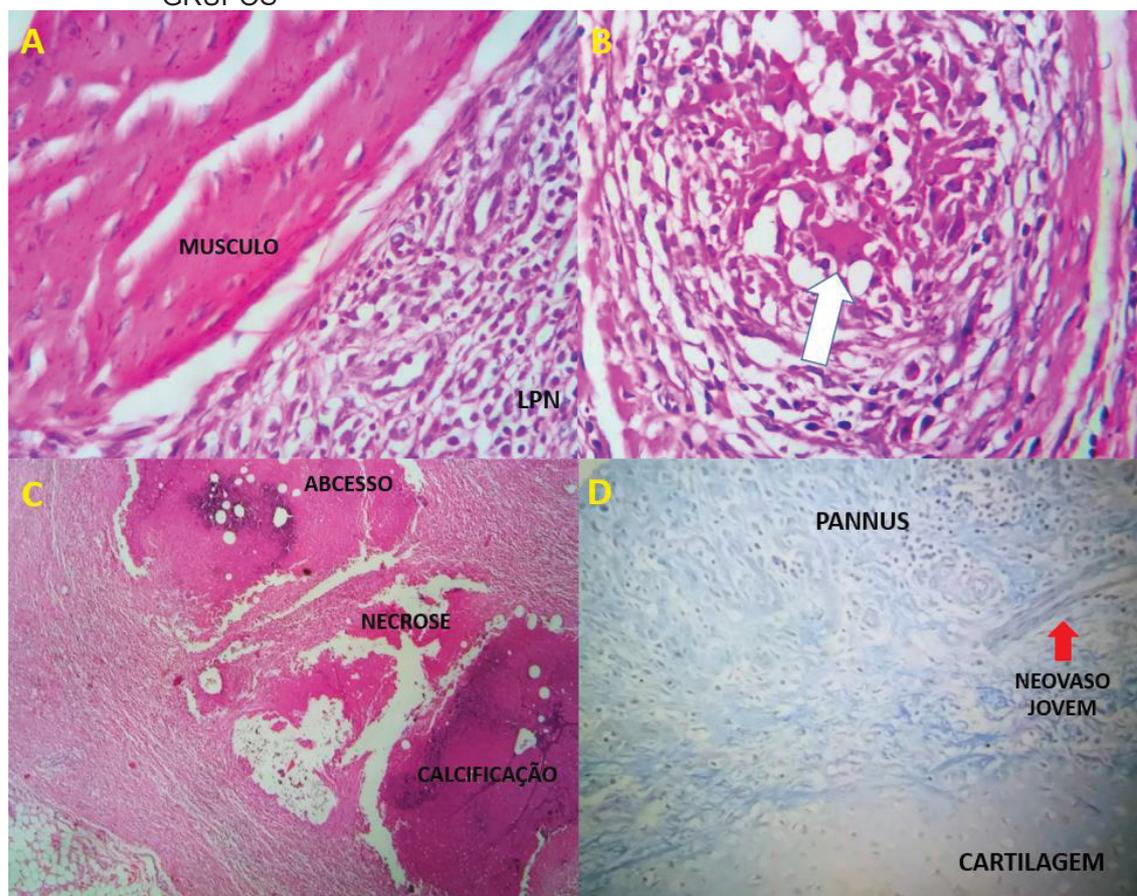


Figura 6. Alterações histopatológicas encontradas na avaliação de lâminas de articulação do joelho de suínos da raça Large White inoculada com ACF. A. Lâmina produzida a partir da amostra do animal G1JA1, observa-se presença de miosite subaguda, infiltração linfoplasmocitária e neutrofílica (LPN) – coloração HE, objetiva de 10x. B. Animal G1JA3, nota-se abscesso com presença de célula gigante multinucleada (seta branca) – coloração HE, objetiva de 40x. C. Animal G1JA5, há presença de sinovite abscedante com necrose e calcificação – coloração HE, objetiva de 4x. D. Animal G2JA6, presença de reação inflamatória recidivante e *pannus* fibrovascular com presença de neovascularização jovem (seta vermelha) – coloração Mallory, objetiva de 10x.

Dentre as alterações sinoviais possíveis, as mais frequentes foram o *pannus*, a hipertrofia vilosa e hiperplasia de sinoviócitos.

A Figura 7 a seguir demonstra alterações comuns encontradas na avaliação do critério sinóvia, como a hipertrofia vilosa e o *pannus*.

FIGURA 7 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM SINÓVIA ENCONTRADAS NAS AVALIAÇÕES DOS GRUPOS

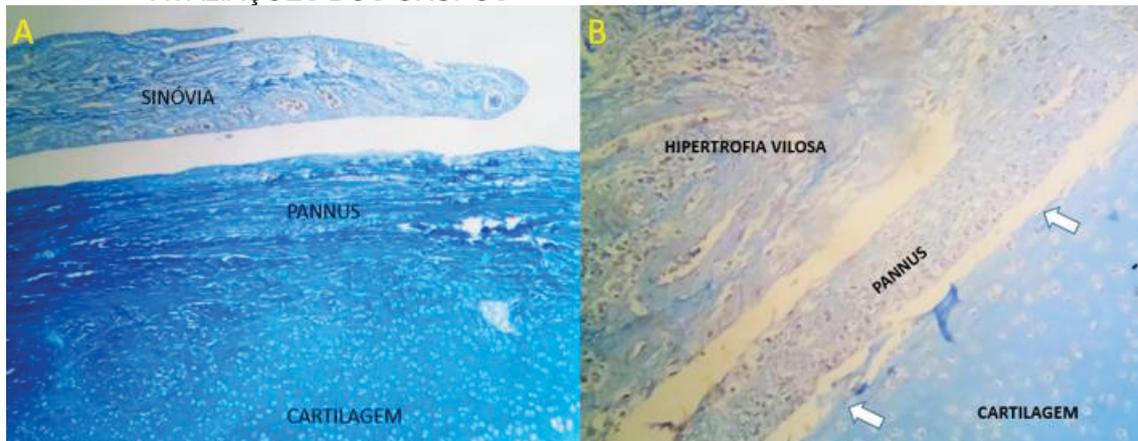


Figura 7. A. Lâmina produzida a partir da peça anatômica animal G1JA3, observa-se hipertrofia vilosa da sinóvia e presença de *pannus* recobrimo a cartilagem – coloração Mallory, objetiva de 4 x. B. Lâmina produzida a partir da amostra do animal G2JA4, é possível observar hipertrofia vilosa da sinóvia com presença de *pannus*, existe ainda fibrilação da cartilagem (setas brancas) – coloração Mallory, objetiva de 10x.

As alterações pontuadas no critério cartilagem mais presentes foram edema, fibrilação, erosão e hiper celularidade. Foi possível observar *flap* em um animal, mas alterações mais importantes na cartilagem não ocorreram. A formação ulcerativa foi superficial, sem exposição de osso subcondral.

A Figura 8 exemplifica as alterações encontradas na avaliação histopatológica das amostras de articulação do joelho dos suínos estudados.

FIGURA 8 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM CARTILAGEM ENCONTRADAS NAS AVALIAÇÕES DOS GRUPOS

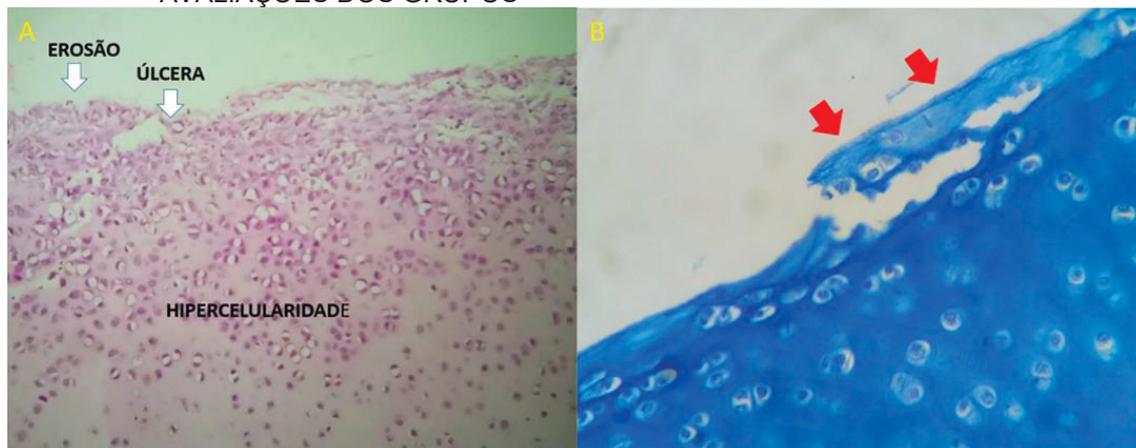


Figura 8. Fotografia de lâminas histológicas obtidas nas avaliações dos grupos em estudo. A. Animal G2JA2, presença de úlcera e erosão destacadas pelas setas brancas, nota-se hipercelularidade da cartilagem – coloração HE, objetiva de 10x. B. Animal G3JA1, é possível observar *flap* da cartilagem destacada pelas setas vermelhas – coloração Mallory, objetiva de 40x.

As alterações em condrócitos foram as menos frequentes, limitando-se à observação de grupos isógenos de condrócitos de 1 a 2 por campo e ocorrência de condrócitos colunares.

A Figura 9 representa os grupos isógenos observados na pontuação do critério condrócitos.

FIGURA 9 – ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM CONDRÓCITOS ENCONTRADAS NAS AVALIAÇÕES DOS GRUPOS

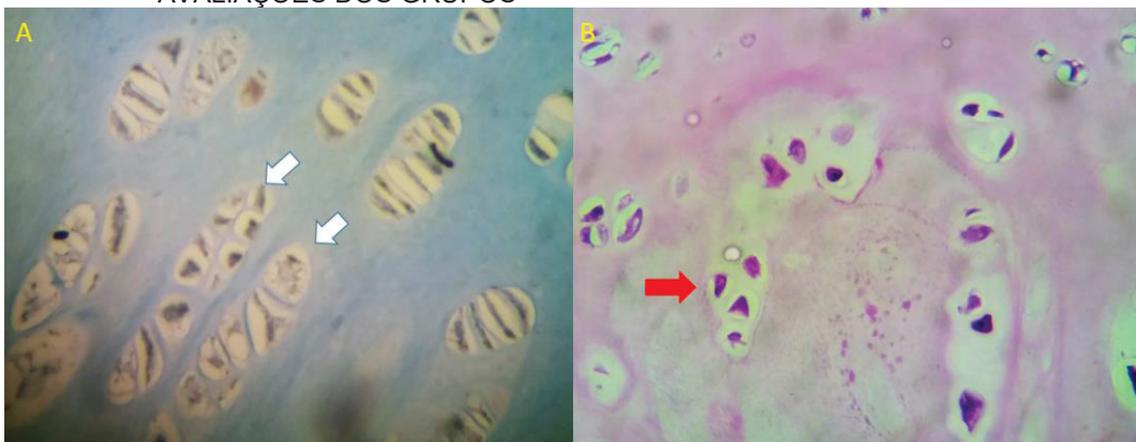


Figura 9. Lâminas histopatológicas obtidas das amostras dos animais em estudo para avaliação de grupos isógenos de condrócitos. A. Animal G3JA2, é possível observar condrócitos isógenos em arranjo colunar, destacado pelas setas brancas – coloração Mallory, objetiva de 40x. B. Animal G2JA4, presença de condrócitos em grupos isógenos, destacado pela seta vermelha.

4.2 PONTUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS

O processo inflamatório foi avaliado pela observação de seis parâmetros: abscesso, neovascularização, presença de tecido fibroso, presença de neutrófilos, presença de linfócitos e presença de células gigantes multinucleadas.

A Tabela 1 demonstra a avaliação das alterações, com a devida pontuação obtida, no critério inflamação, dos tecidos articulares obtidos dos joelhos esquerdos dos seis animais do grupo de estudo 1 e nos 2 animais do grupo controle 1, assim como a devida análise estatística. O peso médio dos animais do GE1 e GC1 foi de $35,8 \pm 2,8$ kg.

TABELA 1 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE1 (A1 A A6) E GC1 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 1 E O GRUPO CONTROLE 1 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY

Alterações	GE1A1	GE1A2	GE1A3	GE1A4	GE1A5	GE1A6	GC1A1	GC1A2
Abscesso	1	1	1	1	1	1	0	0
Neovaso	2	2	2	2	2	2	0	0
Fibrose	3	3	3	3	3	3	0	0
Neutrófilos	4	4	4	4	4	4	0	0
Linfócitos	5	5	5	5	5	5	0	0
Células Gigantes Multinucleadas	6	6	6	6	0	0	0	0
Somatório	21	21	21	21	15	15	0	0
Valor de p	0,03							

FONTE: O autor (2021).

Todos os joelhos esquerdos dos animais do grupo de estudo 1 apresentaram alterações dentro das categorias de avaliação do critério inflamação. Apenas as amostras do GE1 A5 e A6 não apresentaram células gigantes multinucleadas. Os joelhos obtidos dos animais do grupo controle 1 não apresentaram alterações nas avaliações histológicas.

A comparação entre os grupos de estudo 1 e controle 1 realizada por meio da análise não paramétrica de Mann-Whitney resultou em $U=0$, $p=0,03$. Portanto, existe diferença estatística significativa entre eles nos critérios avaliados em relação à inflamação.

A Tabela 2 demonstra a avaliação das alterações, com a devida pontuação obtida no critério inflamação, dos tecidos articulares obtidos dos joelhos esquerdos

dos 6 animais do grupo de estudo 2 e nos 2 animais do grupo controle 2, assim como a devida análise estatística. O peso médio dos animais do GE2 e GC2 foi de $37,7 \pm 4,8$ kg.

TABELA 2 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE2 (A1 A A6) E GC2 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 2 E O GRUPO CONTROLE 2 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY.

Alterações	GE2A1	GE2A2	GE2A3	GE2A4	GE2A5	GE2A6	GC2A1	GC2A2
Abcesso	1	1	1	1	1	1	0	0
Neovaso	2	2	2	2	2	2	0	0
Fibrose	3	3	3	3	3	3	0	0
Neutrófilos	4	4	4	4	4	4	0	0
Linfócitos	5	5	5	5	5	5	0	0
Células Gigantes Multinucleadas	6	6	6	6	6	6	0	0
Somatório	21	21	21	21	21	21	0	0
Valor de p	<0,01							

FONTE: O autor (2021).

Todos os joelhos esquerdos dos animais do grupo de estudo 2 apresentaram todas as alterações possíveis na avaliação histológica, enquanto que não foram encontradas alterações nos joelhos esquerdos dos animais do grupo controle 2. O grupo de estudo 2 difere significativamente do grupo controle 2 ($U=0$, $p=0,008$).

A Tabela 3 demonstra a avaliação das alterações, com a devida pontuação obtida no critério inflamação, dos tecidos articulares obtidos dos joelhos esquerdos dos 6 animais do grupo de estudo 3 e nos 2 animais do grupo controle 3, assim como a devida análise estatística. O peso médio dos animais do GE3 e GC3 foi de $45 \pm 4,3$ kg.

TABELA 3 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE3 (A1 A A6) E GC3 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 3 E O GRUPO CONTROLE 3 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY

Alterações	GE3A1	GE3A2	GE3A3	GE3A4	GE3A5	GE3A6	GC3A1	GC3A2
Abcesso	1	1	1	0	1	1	0	0
Neovaso	0	2	2	0	2	2	0	0
Fibrose	3	3	3	3	3	3	0	0
Neutrófilos	0	4	4	0	4	4	0	0
Linfócitos	5	5	0	5	5	5	0	0
Células Gigantes Multinucleadas	6	6	0	6	6	0	0	0
Somatório	14	20	9	14	20	14	0	0
Valor de p	0,04							

FONTE: O autor (2021).

Os joelhos esquerdos dos animais do GE3 apresentaram a maior dispersão de resultados das alterações inflamatórias, apesar de ainda assim serem frequentes. No GE3, 5 joelhos apresentaram abscesso (A1, A2, A3, A5 e A6), 4 possuíam neovascularização (A2, A3, A5 e A6), nos 6 havia presença de fibrose, em 4 presença de neutrófilos (A2, A3, A5 e A6), em 5 presença de linfócitos (A1, A2, A4, JA5 e A6) e em 4 presença de células gigantes multinucleadas (A1, A2, A4 e A5). Nenhuma alteração histológica do critério inflamação foi observada nos joelhos dos animais do grupo controle 3.

Na avaliação estatística pelo teste de Mann-Whitney, o grupo de estudo 3 ainda diferiu do grupo controle 3 ($U=0$, $p=0,04$).

O Gráfico 1 representa a comparação entre os grupos de estudo 1, 2 e 3 e seus respectivos grupos controle.

Vacuolização de sinoviócitos	0	0	0	0	0	0	0	0
Cobertura de cartilagem pela sinóvia	5	0	5	5	5	0	0	0
Ausência de sinóvia	0	0	0	0	0	0	0	0
Pannus	0	0	7	7	7	7	0	0
Somatório	11	6	18	18	18	13	3	3
Valor de p	0,04							

FONTE: O autor (2021).

Na avaliação histopatológica da sinóvia, foram observados edema, hipertrofia vilosa e hiperplasia de sinoviócitos em todos joelhos dos animais do grupo de estudo 1. Além disso, o grupo de estudo 1 ainda apresentou 4 animais com cobertura de cartilagem pela sinóvia (A1, A3, A4 e A5) e 4 com presença de *pannus* (A3, A4, A5 e A6). Porém, foram observados edema e hipertrofia vilosa nos joelhos dos 2 animais do grupo controle 1.

A análise estatística demonstra diferença significativa entre o GE1 e o GC1 ($U=0$, $p=0,04$).

A Tabela 5 demonstra a avaliação das alterações, com a devida pontuação obtida no critério sinóvia, dos tecidos articulares obtidos dos joelhos esquerdos dos 6 animais do grupo de estudo 2 e nos 2 animais do grupo controle 2, com a respectiva análise estatística.

TABELA 5 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO SCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO SINÓVIA PARA CADA UM DOS JOELHOS DOS ANIMAIS DO GE2 (A1 A A6) E GC2 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 2 E O GRUPO CONTROLE 2 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY

Alterações	GE2A1	GE2A2	GE2A3	GE2A4	GE2A5	GE2A6	GC2A1	GC2A2
Edema	0	1	1	1	0	0	0	0
Hipertrofia Vilosa	2	2	2	2	2	2	2	0
Hiperplasia de sinoviócitos	3	3	3	3	3	3	0	0
Vacuolização de sinoviócitos	4	4	0	4	4	4	0	0
Cobertura de cartilagem pela sinóvia	5	0	5	0	5	5	0	0

Ausência de sinóvia	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pannus</i>	7	7	7	7	7	7	0	0
Somatório	21	17	18	17	21	21	2	0
Valor de p	0,04							

FONTE: O autor (2021).

Na avaliação histológica dos joelhos esquerdos dos animais do grupo de estudo 2, foi possível observar edema nas amostras de A2, A3 e A3, vacuolização de sinoviócitos em todos os joelhos avaliados, exceto em A3, e cobertura da cartilagem pela sinóvia em 4 joelhos (A1, A3, A5 e A6). Todos os joelhos esquerdos dos 6 animais do grupo de estudo 2 apresentaram hipertrofia vilosa, hiperplasia de sinoviócitos e *pannus*. No grupo controle 2, apenas A1 apresentou hipertrofia vilosa, mas outras alterações não foram observadas.

A análise estatística demonstrou diferença significativa entre as medianas do GE2 e o GC2 (U=0, p=0,04).

A Tabela 6 demonstra a avaliação das alterações, com a devida pontuação obtida no critério sinóvia, dos tecidos articulares obtidos dos joelhos esquerdos dos 6 animais do grupo de estudo 3 e nos 2 animais do grupo controle 3, com a respectiva análise estatística.

TABELA 6 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO SCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO SINÓVIA PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE3 (A1 A A6) E GC3 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR DE P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 3 E O GRUPO CONTROLE 3 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY

Alterações	GE3A1	GE3A2	GE3A3	GE3A4	GE3A5	GE3A6	GC3A1	GC3A2
Edema	0	0	0	0	1	0	0	0
Hipertrofia Vilosa	2	0	2	0	2	2	0	0
Hiperplasia de sinoviócitos	3	0	0	0	3	0	0	0
Vacuolização de sinoviócitos	0	0	0	0	0	0	0	0
Cobertura de cartilagem pela sinóvia	0	0	5	0	5	5	0	0
Ausência de sinóvia	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pannus</i>	0	0	7	7	0	7	0	0

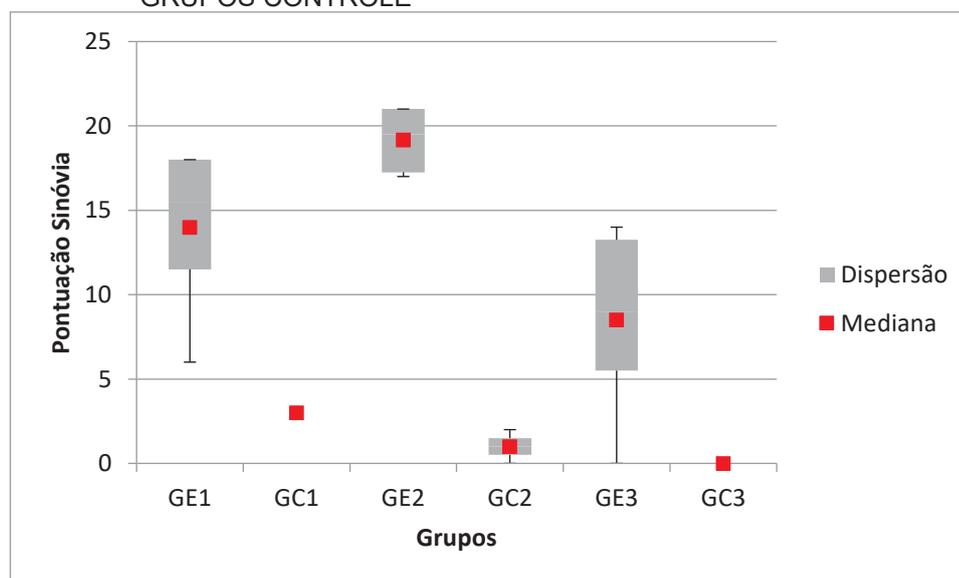
Somatório	5	0	14	7	11	14	0	0
Valor de p	0,08							

FONTE: O autor (2021).

Na avaliação histopatológica do joelho esquerdo dos animais do grupo de estudo 3, do critério sinóvia, foram observadas alterações em menor frequência. Apenas joelho (GE3JA5) apresentou edema, em 4 observou-se hipertrofia vilosa (GE3JA1, GE3JA3, GE3JA5 e GE3JA6), 2 hiperplasia de sinoviócitos (GE3JA1 e GE3JA5), 3 apresentaram cobertura da cartilagem pela sinóvia (GE3JA3, GE3JA5 e GE3JA6) e em outros 3 *pannus* (GE3JA3, GE3JA4 e GE3JA6). Não foram observadas vacuolização de sinoviócitos ou ausência de sinóvia nesse grupo. O grupo controle 3 não apresentou nenhuma alteração.

Não foi observada diferença estatística entre o GE3 e o GC3 (U=0, p=0,08).

GRÁFICO 2 – REPRESENTAÇÃO DA COMPARAÇÃO DO CRITÉRIO SINÓVIA ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 E SEUS RESPECTIVOS GRUPOS CONTROLE



FONTE: O autor (2021).

4.4 PONTUAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE CARTILAGEM

No critério cartilagem, foram considerados 10 parâmetros ou lesões possíveis: edema, erosão, fibrilação, úlcera (superficial e profunda), ausência de cartilagem, hiperplasia (moderada e intensa), perda de basofilia e presença de *flap*.

A Tabela 7 apresenta a avaliação e a pontuação do critério cartilagem no grupo estudo 1 e grupo controle 1. Também é apresentada a avaliação estatística realizada ao nível de significância de 5%.

TABELA 7 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CARTILAGEM PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE1 (A1 A A6) E GC1 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 1 E O GRUPO CONTROLE 1 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY

Alterações	GE1A1	GE1A2	GE1A3	GE1A4	GE1A5	GE1A6	GC1A1	GC1A2
Edema	1	1	1	1	1	1	1	1
Erosão	2	2	2	0	2	2	2	2
Fibrilação	0	0	0	0	0	0	0	0
Úlcera superficial	0	0	0	0	4	0	0	0
Úlcera profunda	0	0	0	0	0	0	0	0
Ausência de cartilagem	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiper celularidade Superficial	7	7	7	0	0	7	0	0
Hiper celularidade Profunda	8	0	0	0	0	0	0	0
Perda de Basofilia	9	9	9	9	9	9	0	0
<i>Flap</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
Somatório	27	19	19	10	16	19	3	3
Valor de p	0,04							

FONTE: O autor (2021).

Na avaliação histológica do joelho esquerdo dos animais do grupo de estudo 1, no critério cartilagem, foi possível observar edema em todas as amostras. Dos 6 joelhos esquerdos obtidos de animais do grupo estudo 1, 5 apresentaram erosão (A1, A2, A3, A5 e A6), apenas 1 apresentou úlcera superficial (A5), 4 apresentaram hiper celularidade (A1, A2, A3 e A6) e em todos havia perda de basofilia.

Em ambos os joelhos esquerdos obtidos de animais do grupo controle 1 foi possível observar edema e erosão. Apesar das lesões do grupo controle, existe diferença significativa na comparação entre o grupo de estudo 1 e o grupo controle 1 ($p=0,04$).

A Tabela 8 demonstra a avaliação das alterações, com a devida pontuação obtida no critério cartilagem, dos tecidos articulares obtidos dos joelhos esquerdos dos

6 animais do grupo de estudo 2 e dos 2 animais do grupo controle 2, assim como a devida análise estatística.

TABELA 8 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CARTILAGEM PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE2 (A1 A A6) E GC2 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 2 E O GRUPO CONTROLE 2 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY

Alterações	GE2A1	GE2A2	GE2A3	GE2A4	GE2A5	GE2A6	GC2A1	GC2A2
Edema	1	1	1	1	1	1	0	0
Erosão	2	2	2	2	2	0	0	0
Fibrilação	3	3	3	3	0	3	3	3
Úlcera superficial	0	4	4	4	0	0	0	0
Úlcera profunda	0	5	0	0	0	0	0	0
Ausência de cartilagem	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiper celularidade Superficial	0	0	7	7	7	7	0	0
Hiper celularidade Profunda	0	0	0	0	0	0	0	0
Perda de Basofilia	0	0	9	9	0	9	0	0
<i>Flap</i>	0	10	0	0	0	0	0	0
Somatório	6	25	26	26	10	20	3	3
Valor de p	0,042							

FONTE: O autor (2021).

A avaliação histológica dos tecidos obtidos do joelho esquerdo dos animais do grupo de estudo 2 demonstrou edema em todas as amostras e em 5 erosão (exceto JA6). Foram observados fibrilação em 5 amostras (A1, A2, A3, A4 e A6), úlcera superficial em 3 (A2, A3 e A4) e em 1 úlcera profunda (A2). A hiper celularidade foi constatada em 4 amostras (A3, A4, A5 e A6), perda de basofilia em 3 (A3, A4 e A6) e foi observado *flap* em 1 (A2).

No grupo controle 2, ambos os animais apresentaram fibrilação, mas outras alterações não foram observadas.

Ao nível de significância de 5% existe diferença estatística entre o grupo de estudo 2 e o grupo controle 2 (U=0, p=0,042).

A Tabela 9 demonstra a avaliação das alterações, com a devida pontuação obtida no critério cartilagem, dos tecidos articulares obtidos dos joelhos esquerdos dos

6 animais do grupo de estudo 1 e dos 2 animais do grupo controle 1, assim como a devida análise estatística.

TABELA 9 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CARTILAGEM PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE3 (A1 A A6) E GC3 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 3 E O GRUPO CONTROLE 3 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY

Alterações	GE3A1	GE3A2	GE3A3	GE3A4	GE3A5	GE3A6	GC3A1	GC3A2
Edema	1	0	0	1	1	0	0	0
Erosão	2	0	2	0	2	0	0	0
Fibrilação	3	0	0	3	0	3	3	3
Úlcera superficial	0	0	0	0	0	0	0	0
Úlcera profunda	0	0	0	0	0	0	0	0
Ausência de cartilagem	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiper celularidade Superficial	7	7	7	0	0	7	0	0
Hiper celularidade Profunda	8	0	8	0	0	0	0	0
Perda de Basofilia	0	0	0	0	9	0	0	0
<i>Flap</i>	10	0	0	0	10	0	0	0
Somatório	31	7	17	4	22	10	3	3
Valor de p	0,04							

FONTE: O autor (2021).

Foi possível observar edema na avaliação histológica do joelho esquerdo dos animais do grupo de estudo 3 em 3 amostras (A1, A4 e A5), erosão em 3 (A1, A3 e A5) e fibrilação também em 3 (A1, A4 e A6). Não foram observadas ulcerações. A hiper celularidade foi observada em 4 amostras (A1, A2, A3 e A6) e a perda de basofilia em apenas 1 (A5). Foi possível observar *flap* em duas amostras (A1 e A5).

No grupo controle 3, foram observadas fibrilação em ambos os animais. Não foram observadas outras lesões nesse critério no grupo.

A comparação entre os grupos permitiu encontrar uma diferença estatística significativa ao nível de 5% ($U=0$, $p=0,04$).

O Gráfico 3 representa a dispersão dos resultados pela mediana dos grupos de estudo 1, 2 e 3 e de seus respectivos grupos controles 1, 2 e 3.

Somatório	1	0	0	0	0	0	0	0
Valor de p	0,56							

FONTE: O autor (2021).

No grupo de estudo 1, apenas um animal apresentou grupos isógenos de condrócitos, entre 1 a 2 por campo. No grupo controle 1 não houve identificação de grupos isógenos.

Não há diferença significativa entre o grupo de estudo 1 e o grupo controle 1 ao nível de 5% ($U=0$, $p=0,56$).

A Tabela 11 demonstra a avaliação das alterações, com a devida pontuação obtida no critério condrócitos, dos tecidos articulares obtidos dos joelhos esquerdos dos 6 animais do grupo de estudo 2 e nos 2 animais do grupo controle 2, assim como a devida análise estatística.

TABELA 11 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CONDRÓCITOS PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE2 (A1 A A6) E GC2 (A1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 2 E O GRUPO CONTROLE 2 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY

Grupos isógenos	GE2A1	GE2A2	GE2A3	GE2A4	GE2A5	GE2A6	GC2A1	GC2A2
1 a 2 por campo	0	0	0	1	0	0	0	0
3 a 4 por campo	0	0	0	0	0	0	0	0
5 ou mais por campo	0	0	0	0	0	0	0	0
Condrócito colunar	0	0	0	0	0	0	0	0
Somatório	0	0	0	1	0	0	0	0
Valor de p	0,56							

FONTE: O autor (2021).

Apenas 1 joelho esquerdo do grupo de estudo 2 apresentou grupo isógeno, de 1 a 2 por campo (A4). Não foram observados grupos isógenos na avaliação histológica do grupo controle 2.

Não foi observada diferença estatística significativa na avaliação entre grupos ($U=0$, $p=0,56$).

A Tabela 12 demonstra a avaliação das alterações, com a devida pontuação obtida no critério condrócitos, dos tecidos articulares obtidos dos joelhos esquerdos

dos 6 animais do grupo de estudo 3 e nos 2 animais do grupo controle 3, assim como a devida análise estatística.

TABELA 12 – PONTUAÇÃO POR MEIO DO ESCORE DE OSTERGAARD DO CRITÉRIO CONDRÓCITOS PARA CADA UM DOS JOELHOS ESQUERDOS DOS ANIMAIS DO GE3 (A1 A A6) E GC3 (JA1 E A2) DE ACORDO COM A ANÁLISE HISTOLÓGICA. ESTÁ TAMBÉM EXPRESSO O VALOR P DA COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO DE ESTUDO 3 E O GRUPO CONTROLE 3 CALCULADO PELO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE MANN-WHITNEY

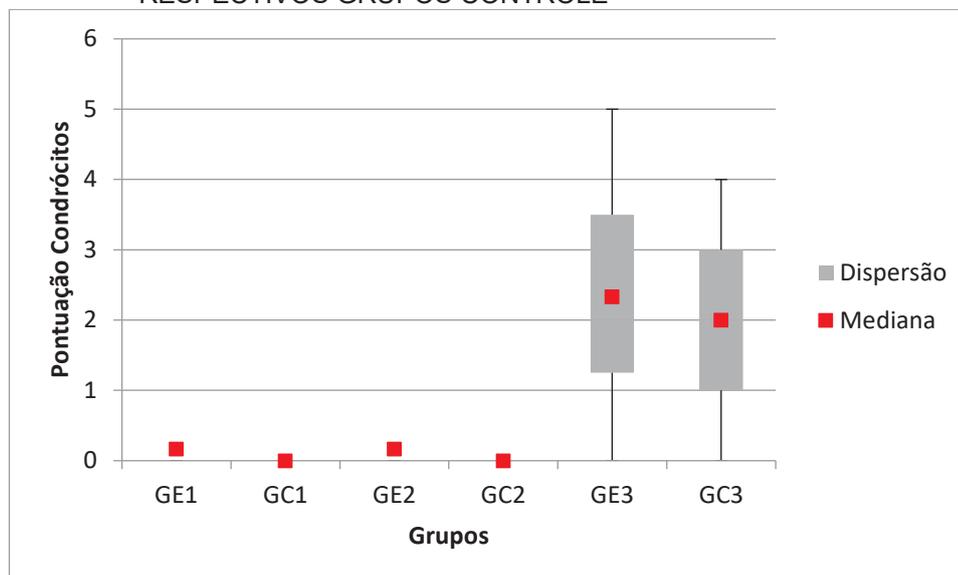
Grupos isógenos	GE3A1	GE3A2	GE3A3	GE3A4	GE3A5	GE3A6	GC3A1	GC3A2
1 a 2 por campo	1	1	0	0	0	0	0	0
3 a 4 por campo	0	0	0	2	0	2	0	0
5 ou mais por campo	0	0	0	0	0	0	0	0
Condrócito colunar	0	4	4	0	0	0	0	4
Somatório	1	5	4	2	0	2	0	0
Valor de p	0,73							

FONTE: O autor (2021).

A presença de grupos isógenos foi mais frequente e em maior proporção nos animais do grupo de estudo 3, sendo que 2 animais apresentaram de 1 a 2 grupos isógenos por campo (A1 e A2), 2 apresentaram de 3 a 4 (A4 e A6) e não foram observados grupos isógenos igual ou superior a 5. Nesse último grupo ainda, 2 animais apresentaram condrócitos colunares (A2 e A3), alteração também observada em 1 animal do grupo controle 3 (A2).

Não foi observada diferença estatística significativa entre o grupo de estudo 3 e o grupo controle 3 ($U=0$, $p=0,73$).

GRÁFICO 4 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA COMPARAÇÃO DO CRITÉRIO CONDRÓCITOS ENTRE OS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 E SEUS RESPECTIVOS GRUPOS CONTROLE



FONTE: O autor (2021).

4.6 ANÁLISE ENTRE GRUPOS

Para verificação da influência das aplicações intra-articulares entre as distribuições dos índices de inflamação, sinóvia, cartilagem e condrócitos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes, que indica se ocorreu diferença na distribuição da pontuação dada as articulações. Em seguida, empregado o teste *post hoc* de Dunn para verificar quais pares são diferentes. Para isso, foi utilizada a correção de Bonferroni. A Tabela 13 demonstra os resultados obtidos pela comparação entre grupos de todos os critérios:

TABELA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS DO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO PELO TESTE DE KRUSKAL-WALLIS E TESTE PÔST HOC DE DUNN.

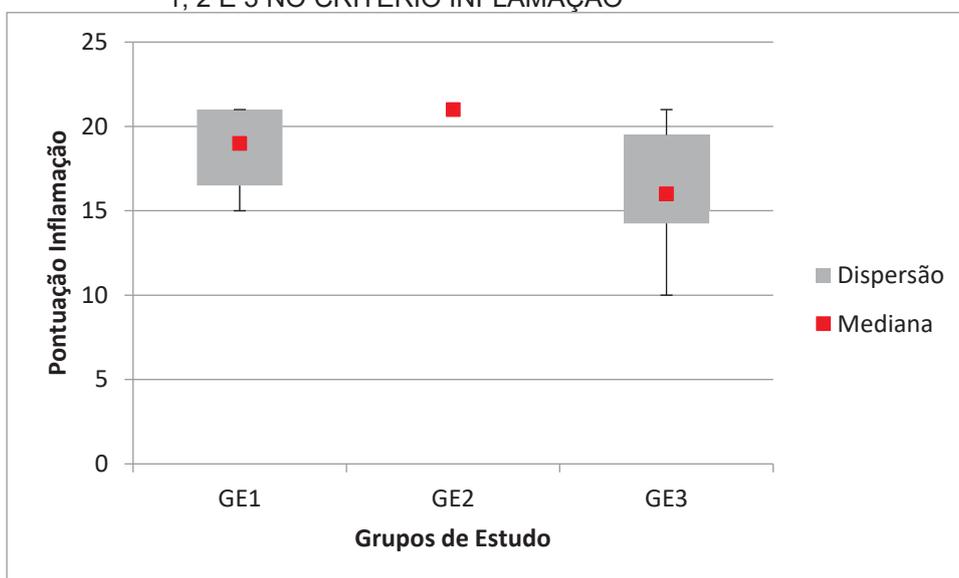
Teste	Inflamação	Sinóvia	Cartilagem	Condrócitos
Kruskal-Wallis	0,047	0,032	0,67	0,01
Dunn	Inflamação	Sinóvia	Cartilagem	Condrócitos
GE1-GE2	0,3	0,25	0,78	1
GE1-GE3	0,15	0,14	0,55	0,009
GE2-GE3	0,01	0,009	0,38	0,009

FONTE: O autor (2021).

O teste de Kruskal-Wallis compara dois ou mais grupos entre si e valores significativos de p indicam que pelo menos um dos grupos em comparação difere de um ou dos demais. A avaliação *post hoc* de Dunn é utilizada para determinar entre quais grupos ocorreu a diferença.

Com relação à avaliação da inflamação, é possível observar que apenas a comparação entre o grupo de estudo 2 e o grupo de estudo 3 demonstra diferença estatística significativa ($p=0,01$). O Gráfico 5 a seguir ilustra a dispersão ao redor das medianas de cada grupo de estudo.

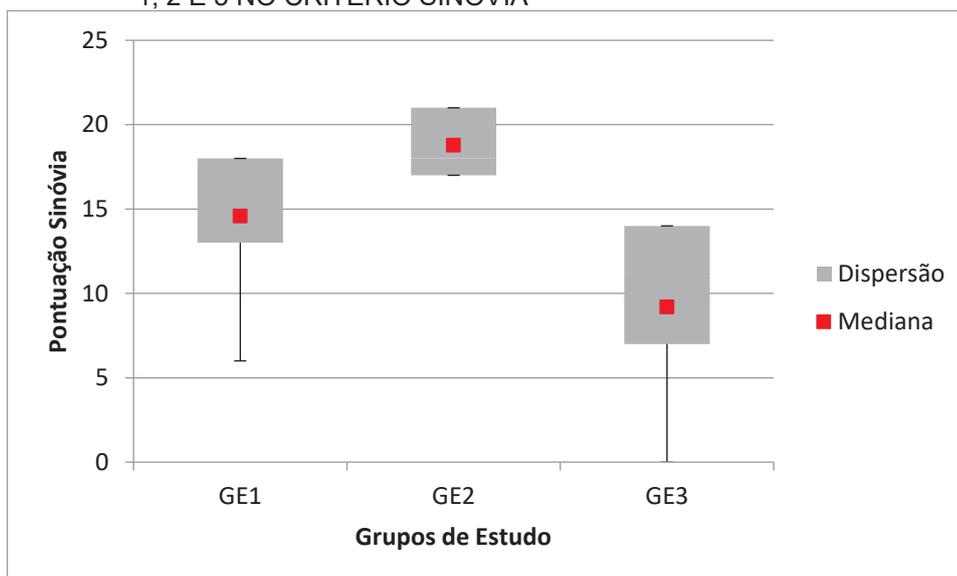
GRÁFICO 5 – DISPERSÃO AO REDOR DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 NO CRITÉRIO INFLAMAÇÃO



FONTE: O autor (2021).

Na avaliação do critério sinóvia, foi possível determinar diferença estatística significativa entre os grupos de estudo 2 e o grupo de estudo 3 ($p<0,01$). O Gráfico 6 demonstra a dispersão ao redor da mediana dos grupos de estudo 1, 2 e 3.

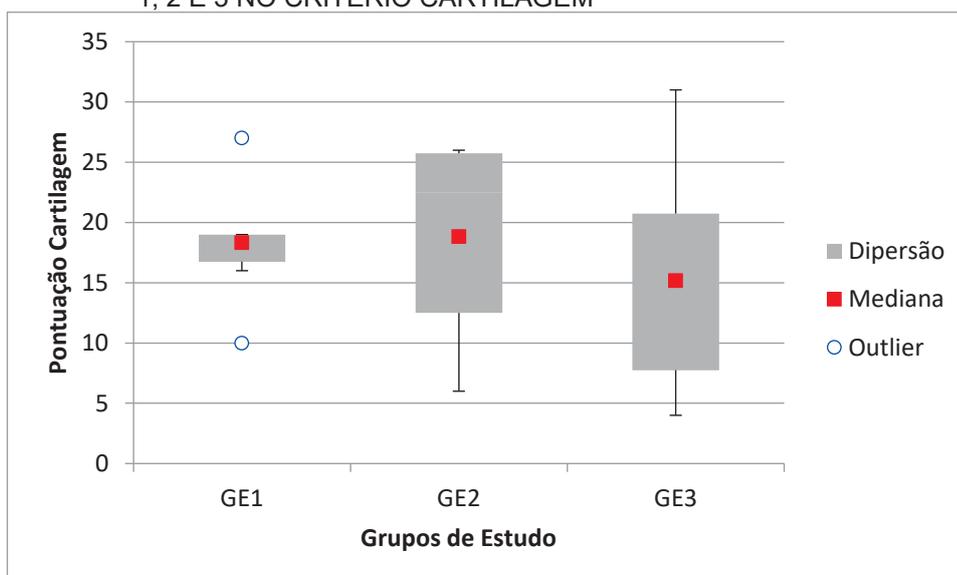
GRÁFICO 6 – DISPERSÃO AO REDOR DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 NO CRITÉRIO SINÓVIA



FONTE: O autor (2021).

A análise estatística da avaliação histológica da cartilagem não demonstrou diferença entre os 3 grupos de estudo. O Gráfico 7 representa a dispersão das avaliações ao redor da mediana dos grupos de estudo 1, 2 e 3.

GRÁFICO 7 – DISPERSÃO AO REDOR DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 NO CRITÉRIO CARTILAGEM

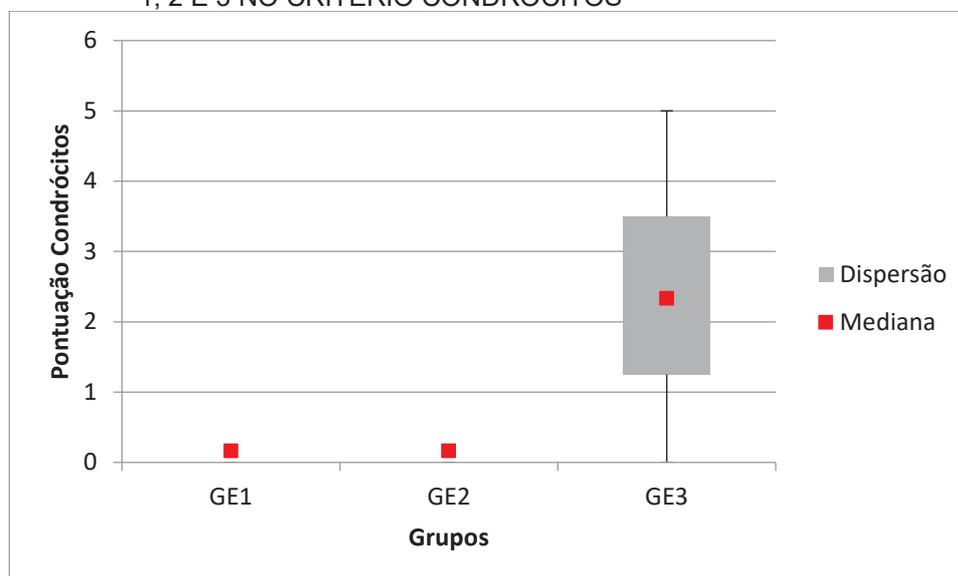


FONTE: O autor (2021).

Nessa avaliação existiram dois *outliers* no grupo de estudo 1, nas amostras G1A1 e G1A4. A primeira amostra obteve um valor superior às outras avaliações, enquanto que a segunda obteve um valor inferior.

No critério condrócitos, foi possível determinar diferença estatística significativa entre o GE1 e o GE3 ($p < 0,01$) e entre o GE2 e o GE3 ($p < 0,01$), indicando que o valor desse critério no grupo de estudo 3 é superior em relação aos demais grupos de estudo. O Gráfico 8 representa a dispersão ao redor das medianas dos valores obtidos pela análise histológica dos grupos de estudo 1, 2 e 3.

GRÁFICO 8 – DISPERSÃO AO REDOR DAS MEDIANAS DOS GRUPOS DE ESTUDO 1, 2 E 3 NO CRITÉRIO CONDRÓCITOS



FONTE: O autor (2021).

5 DISCUSSÃO

Existem vários modelos experimentais de osteoartrose que utilizam animais como ratos, cobaias, coelhos, equinos e pequenos ruminantes (CHAPMAN, 2016). A utilização de suínos, comercialmente disponíveis ou mesmo os porcos miniaturas, foi relatada por Vernon e col. (2014). Anatomicamente, o joelho suíno é semelhante ao humano, exceto pelo menisco que é mais largo e pelos ligamentos cruzados que são mais longos. Comparando-se a amplitude de movimento entre eles, nota-se que possuem flexão articular similar, mas diferem na extensão (PROFFEN et al., 2012). Apesar dessa diferença na extensão articular, é importante salientar que outras espécies, como bovinos, caprinos, ovinos, cães e coelhos apresentam a mesma condição (PROFFEN et al., 2012). A espessura da cartilagem do joelho suíno é similar ao humano, além disso, é possível criar experimentalmente defeitos que envolvam parte ou toda a espessura da cartilagem (McCOY, 2015).

A gestação de suínos produz muitos animais, o que permite a obtenção de vários indivíduos semelhantes para serem utilizados em pesquisas (RAMIREZ et al., 2016). A maturidade do tecido esquelético é alcançada entre 18 e 24 meses de vida, quando o suíno pode chegar a um peso aproximado, dependendo da raça, de 270 kg e 300 kg respectivamente para fêmeas e machos (McCOY, 2015).

Além disso, outro fator que pode corroborar para utilização do suíno como modelo animal é a produção comercial de alta tecnificação, que produz animais em ambiente com alto controle sanitário, objetivando o abate para produção de carne, não sendo necessário produzir um animal de laboratório para ser eutanasiado (HOCHBERG et al., 2012).

Além dos porcos de origem comercial, o uso de porco miniatura vem sendo descrito, pois nesses animais a maturidade do esqueleto é atingida aos 10 a 12 meses, com um peso entre 25 a 40 kg (McCOY, 2015; TURGUT, 2013).

A espécie suína foi selecionada para esse estudo devido à disponibilidade de produção desses animais no local de pesquisa (Universidade Tuiuti do Paraná).

O desafio logístico de usar o suíno como modelo experimental deve ser levado em consideração, pois são necessárias áreas muito maiores para a manutenção quando comparadas com as utilizadas para ratos ou coelhos. Além disso, o consumo alimentar da espécie é alto, sendo próximo de 2 kg de ração/dia numa idade entre 4 a 8 meses de vida (SAMVELYAN et al., 2020).

A avaliação da dor em suínos é um desafio, embora já existam há alguns anos escalas que avaliam a dor mediante expressões faciais. Novas metodologias tentam facilitar a avaliação de dor no suíno como a Escala Composta de Dor Aguda de Porcos UNESP-Botucatu. Nessa escala, são avaliados parâmetros comportamentais e fisiológicos que geram um escore associado à intensidade da dor do animal (LUNA et al., 2020).

A escala de dor proposta por Luna e col. (2020) envolve ainda a avaliação comportamental dos animais em seus recintos por gravação de vídeos, aumentando o tempo necessário para gerar um escore de dor. Portanto, o uso do suíno como modelo experimental de OA pode não ser uma opção prática quando o foco do estudo é a dor. Não foram realizadas análises de dor dos animais em nosso experimento, pois não existia o objetivo da avaliação de terapias de controle dela.

O protocolo anestésico proposto por Murayama (2003) com a associação de Cetamina na dose de 5 mg/kg e Xilazina 0,5 mg/kg demonstrou-se insuficiente para a aplicação intra-articular. Notou-se que ao acessar a articulação com agulha hipodérmica 25 mm x 0,8 mm no animal piloto, houve reação com movimentação do membro, o que aumenta a chance de lesão da superfície articular não intencional pela agulha. Para minimizar esse risco, foi adicionado ao protocolo o uso de manutenção anestésica com Isoflurano ofertado por meio de máscara associado a oxigênio a 100%.

O ACF é uma solução que consiste em uma mistura de surfactante e óleo mineral, geralmente Arlacel ou Drakeol associado a *Mycobacterium bovis* morto, em uma concentração máxima de 1 mg/mL (MARTINEZ et al., 2017).

A inflamação da articulação pode ser obtida por administração intradérmica ou intra-articular do ACF. Assim, na administração intradérmica, além das lesões articulares, há alterações sistêmicas enquanto que o uso intra-articular promove mais inflamação focal (DONALDSON; McQUEEN, 1993). O custo do ACF em comparação ao MIA e ao Zymosan é menor, apesar de ser uma substância que não possui produção nacional.

Existem poucos relatos sobre o volume de ACF necessário para induzir a alteração articular com ACF em joelho de suínos. No trabalho desenvolvido por Murayama (2003) é utilizada a dose de 0,5 mg na administração intra-articular temporomandibular de suínos adultos, promovendo inflamação que altera a capacidade mastigatória dos animais. Como a articulação do joelho de animais jovens

é maior do que a articulação temporomandibular de animais adultos, foi instituída a dose de 1 mg de ACF por aplicação intra-articular no presente estudo, embora não exista literatura que descreva essa dose na articulação do joelho de suínos comerciais.

Lee e col. (2016) utilizam o ACF associado a colágeno bovino tipo II para indução de artrite reumática em suínos miniatura. São avaliados dois grupos, um por aplicação intradérmica e outro por aplicação intra-articular, sendo que as lesões articulares foram mais importantes no grupo intradérmico. Esse trabalho avalia a degeneração cartilaginosa apenas pela espessura da cartilagem. Apesar da diferença entre os critérios de avaliação das alterações articulares, é possível inferir que a associação do colágeno tipo II ao ACF promoveu alteração articular mais significativa do que a observada em nosso estudo. O volume utilizado para a aplicação intra-articular por Lee e col. (2016) foi de 1 mL da mistura ACF + colágeno tipo II numa proporção de 1:1, ou seja, um volume de ACF de 0,5 mL.

É relatado que o ACF promove alterações articulares em outras espécies já após 7 dias da sua administração, alteração que se torna mais intensa e começa a ulcerar a cartilagem, podendo chegar ao osso subcondral nas semanas consecutivas (HELYES et al., 2004). Em nosso estudo, foram avaliadas as alterações produzidas pela administração intra-articular de ACF quanto à inflamação, sinovite, lesão cartilaginosa e reação dos condrócitos ao longo de três períodos diferentes: 7 dias, período que Helyes e col. (2004) e Yuce e col. (2020) indicam para a incidência de OA em ratos; 21 dias, período utilizado por Murayama (2003) e Lee e col. (2020) para a produção de alterações articulares; e 35 dias, um período superior aos mencionados por pesquisas semelhantes, a fim de determinar se apenas uma aplicação de ACF seria suficiente para induzir OA na espécie suína.

As alterações histológicas foram pontuadas segundo o critério de Ostegaard e col. (1997). O escore foi utilizado para comparação entre os GE e seus respectivos GC por meio do teste U, ou teste não paramétrico de Mann-Whitney, capaz de avaliar se existe diferença entre as medianas de dois grupos independentes. Já a avaliação entre os grupos GE1, GE2 e GE3 foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis.

O teste de Kruskal-Wallis é uma análise de variância não paramétrica comparativa para testar se as amostras se originam da mesma distribuição, independentemente de tamanhos iguais ou diferentes. Como neste trabalho foram utilizadas avaliações que não possuem distribuição normal (não paramétricos), faz-se

necessário que a análise estatística leve em consideração a distribuição dos valores obtidos ao redor de uma mediana, sugerindo sua concentração (resultados mais homogêneos) ou sua dispersão (resultados mais heterogêneos).

Um teste de Kruskal-Wallis com resultados significativos indica que ao menos um grupo domina as variâncias de resultados sobre outro grupo, mas esse teste não demonstra onde está a dominância sobre as variâncias ou para quantos pares de grupo ela ocorre, então, para essa identificação, foi realizado o teste de Dunn com a correção de Bonferroni, que auxilia na análise dos pares específicos de amostras para dominância variável. Esse teste de hipóteses é baseado na rejeição de uma hipótese nula caso a probabilidade dos dados observados acontecerem ao acaso (estritamente, sob hipóteses nulas) for baixa. Se várias hipóteses forem testadas, a chance de um evento raro aumenta e a probabilidade de rejeitar incorretamente uma hipótese nula aumenta. A correção de Bonferroni é realizada para compensar possível erro alfa, determinando se o valor obtido permaneceria o mesmo caso o número de testes fosse aumentado.

As alterações articulares mais importantes ocorreram nos primeiros 21 dias, quando o grupo sacrificado após 35 dias apresentou alterações menos intensas, apesar de maior incidência de reação dos condrócitos pela formação de clusters. Nota-se regressão, principalmente no aspecto inflamatório, das alterações articulares. Quanto à lesão esperada sobre a superfície cartilaginosa obtida nessa metodologia, pode-se descrevê-la como superficial, não sendo o suficiente para indicar que a osteoartrose foi produzida, fato que se opõe a estudos realizados em outras espécies (DONALDSON et al., 1993; GUPTA et al., 2009; TORRES et al., 2009; YUCE et al., 2020).

As alterações inflamatórias foram as mais notáveis, principalmente nos GE1 e GE2, reduzindo a intensidade no GE3. Sendo o adjuvante completo de Freund uma solução oleosa que contém *Mycobacterium bovis* morto, a injeção desse produto em qualquer tecido induz uma resposta inflamatória intensa, com grande presença de células de defesa, assim como descreve Martinez e col. (2017).

As alterações inflamatórias foram caracterizadas pela formação de abscessos, neovascularização, fibrose, infiltração neutrofílica e linfocitária e a visualização de células gigantes multinucleadas, ocorrendo nos três grupos de estudo. A intensidade da inflamação foi maior no GE2 e menos intensa no GE3, sendo que existe diferença estatística significativa entre o GE2 e o GE3. A administração intra-articular do ACF

promoveu alterações inflamatórias significativas na articulação já sete dias após sua administração. Embora não exista diferença estatística significativa entre os GE1 e GE2, aparentemente há intensificação do evento, sendo alcançado o ponto máximo nesse estudo após 21 dias. A inferioridade das alterações inflamatórias observadas entre o GE2 e GE3 é semelhante à descrição de Pearson (1963), que demonstra regressão da inflamação em ratos que receberam ACF após 50 dias da administração. Em nosso estudo, foi possível notar a redução do evento inflamatório em algum momento entre o dia 21 e o dia 35 após a administração do ACF. Donaldson e col. (1993) relatam que as alterações inflamatórias em ratos estão em progressão durante os 14 dias e Xu e col. (2017) afirmam que existe progressão do processo inflamatório articular 28 dias após a administração do ACF também em ratos.

Apesar de não utilizarem um critério de graduação da lesão inflamatória, Helyes e col. (2004) caracterizam a inflamação produzida 21 dias após a administração de ACF intra-articular por um denso infiltrado de células mononucleares, corroborando com o aspecto inflamatório encontrado nesse estudo. Os autores indicam que houve edema sinovial, *pannus* e pronunciada erosão da cartilagem. As alterações sinoviais encontradas no presente estudo se assemelham a essa descrição, mas as alterações cartilaginosas foram menos intensas.

As alterações sinoviais foram caracterizadas pelo edema, hipertrofia vilosa, hiperplasia de sinoviócitos e *pannus*, um tecido inflamatório sinovial em proliferação. O *pannus* é observado em outros estudos que utilizaram o ACF para a produção de inflamação articular (HELYES et al., 2004; TORRES et al., 2009; YUCE et al., 2020). Entretanto, a vacuolização de sinoviócitos e outras alterações sinoviais só ocorreram no GE2, sendo esse o grupo com maior escore de lesão nesse critério. Não houve diferença estatística entre o GE1 e o GE2, mas houve entre o GE2 e o GE3, novamente indicando redução da sinovite instalada em algum ponto entre o dia 21 e 35 após a administração do ACF.

Tanto as avaliações relacionadas à inflamação quanto as relacionadas à sinóvia demonstram um aspecto evolutivo ao longo dos primeiros 21 dias da inoculação do ACF, mas entre esse momento e o dia 35 há redução de ambos os processos, por isso o GE3 tem escores nas duas avaliações significativamente menor do que o GE2. O estudo realizado por Gauldie e col. (2004) consegue prolongar a progressão do processo inflamatório e da sinovite pela administração semanal do ACF ao longo de quatro semanas consecutivas, promovendo alterações mais intensas e

não ocorrendo redução do evento inflamatório. No estudo apresentado nessa dissertação, houve uma evolução semelhante, mas, como foi realizada apenas uma inoculação, o comportamento das alterações inflamatórias e sinoviais seguiu a evolução descrita por Pearson (1963). No entanto, não é possível afirmar que na espécie suína a inoculação de ACF semanal promoveria alterações cartilaginosas mais intensas, sendo necessário que novos estudos sejam realizados para apontar se existe essa tendência da evolução da lesão com novas aplicações.

Quanto à avaliação dos parâmetros associados à cartilagem, foi possível observar que, nos três grupos de estudo, ocorreu diferença estatística significativa na comparação com seus respectivos grupos controles. Apesar disso, as lesões apresentadas pela cartilagem foram superficiais e não geraram escores altos. O animal GE3A1 apresentou o maior escore dentre todos os animais em estudo, 31 (de 57 possíveis). Essas alterações de baixa intensidade são descritas por Gaudie e colaboradores (2004), que observaram que a erosão da cartilagem foi moderada após a administração semanal de ACF em articulação do joelho de ratos, mesmo que tenha sido observada a exposição de osso subcondral em alguns indivíduos.

As lesões ulcerativas na cartilagem, mais presentes no GE2, também são descritas desde as primeiras avaliações do adjuvante como elemento de indução de OA (WAKSMAN; PEARSON; SHARP, 1960) e também em trabalhos mais recentes (RAMOS, 2000; YUCE et al., 2020; HELYES et al., 2004; TORRES et al., 2009), entretanto, nos trabalhos mais recentes as lesões são descritas de forma mais severa.

Segundo Ramos e col. (2000), a erosão da cartilagem pode se aprofundar ao longo do tempo e promover exposição do osso subcondral, mas esse efeito não foi observado em nosso estudo. O GE 2 apresenta alterações de cartilagem mais homogêneas, enquanto que o GE3 apresenta uma dispersão maior do resultado, inclusive com a definição de dois *outliers*, o animal GE3A1 (pontuado em 31) e o animal GE3A4 (pontuado em 4). É possível inferir uma tendência de redução das lesões sobre a cartilagem, ou seja, foi produzida uma alteração superficial na cartilagem, que teve possibilidade de reparação ao longo do tempo. Um fato que pode estar associado a isso é a idade dos animais, que, sendo jovens, ainda estão em fase de desenvolvimento cartilaginoso.

A avaliação de condrócitos revelou ser mais significativa no GE3 e também foram observadas no GC3. O crescimento normal da cartilagem hialina está associado à divisão celular, formação de um tecido muito celular que inicia a secreção de matriz

extracelular, afastando os condroblastos e, por fim, as células afastadas começam a se multiplicar, podendo formar grupos isógenos, grupos celulares que se originaram do mesmo condroblasto (ABRAHAMSOHN, 2017).

A presença dos grupos isógenos observados nos animais do GC3 pode estar associada à imaturidade da articulação, visto que todos os animais do experimento ainda estavam em fase de crescimento. Nota-se o aparecimento de grupos isógenos, embora em pequena quantidade já nos GE1 e GE2, entretanto, não é possível determinar se essa alteração realmente foi produzida pela utilização do ACF.

Os condrócitos colunares podem ser utilizados como avaliadores da qualidade da regeneração articular, em virtude da maturação e reorganização dessas células (SAITO et al., 2009). O aparecimento dessa alteração associado à redução dos escores inflamatórios e associados à sinóvia pode indicar uma tentativa de reparação articular. O animal que apresentou tal alteração no GC3 (GC3A2) também apresentou fibrilação, não sendo possível descartar a possibilidade de lesão cartilaginosa pela agulha utilizada para a administração da solução de NaCl 0,9%, o que poderia ter causado a reação proliferativa dos condrócitos na superfície da cartilagem.

O modelo experimental proposto nesse trabalho promoveu inflamação articular e sinovite, sendo mais intensas nos primeiros 21 dias após a administração do ACF intra-articular. Apesar da produção de lesões na cartilagem, elas não foram intensas, marcadas principalmente por algumas áreas de erosão. Não foi possível produzir alterações nos condrócitos suficientes que comprovem a capacidade de produção de osteoartrose pela administração intra-articular de ACF em dose única.

6 CONCLUSÃO

Pelo presente estudo, é possível determinar que a administração intra-articular de ACF num volume de 1 mL produz alterações inflamatórias, sinoviais e de cartilagem em joelho de suínos no período de 7, 21 e 35 dias após sua administração. Essas alterações, no entanto, não são suficientes para caracterizar osteoartrose.

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P. Tecido Conjuntivo. In: ABRAHAMSOHN, P. **Junqueira & Carneiro Histologia Básica Texto e Atlas**. 13a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2017.

AIGNER, T.; COOK, J. L.; GERWIN, N.; GLASSON, S. S.; LAVERTY, S.; LITTLE, C. B.; MCILWRAITH, W.; KRAUS, V. B. Histopathology atlas of animal model systems e overview of guiding principles. **Osteoarthritis Research Society International**, v. 18 s2-s6, 2010. Disponível em: <[Histopathology atlas of animal model systems – overview of guiding principles - Osteoarthritis and Cartilage \(oarsijournal.com\)](https://oarsijournal.com/)>. Acesso em: 10/06/2020.

AMMAR, T. Y.; PEREIRA, T. A. P.; MISTURA, S. L. L.; KUHN, A.; SAGGIN, J. I.; LOPES JÚNIOR, O. V. Viscosuplementação no tratamento da osteoartrose do joelho: uma revisão de literature. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 50, n.5, p. 489-494, 2015.

ANDERSON, A. S.; LOESER, R. F. Why is osteoarthritis na aged-related disease? **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 1 p. 15-26, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.berh.2009.08.006>.

ATTUR MG, DAVE M, AKAMATSU M, KATOH M, AMIN AR. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. **Osteoarthritis Cartilage**. V.10,p.1-4, 2002.

BAIME; MJ. Glucosamine and chondroitin sulphate did not improve pain in osteoarthritis of the knee. **Evidence-Based Medicine**; v.11, n.4, p.115, 2006.

CAMPOS W. N. S.; SOUZA, M. A.; Thaís RUIZ, T.; PERES, T. P.; NÉSPOLI, P. B.; MARQUES, A. T. C.; COLODEL, E. M.; SOUZA, R. L de. Experimental osteoarthritis in rabbits: lesion progression. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 279-285, mar. 2013.

CASTANO, A. P. et al. Low-level laser therapy for zymosaninduced arthritis in rats: importance of illumination time. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 39, n. 6, p. 543-550, jl. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/lsm.20516>. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lsm.20516>>. Acesso em: 11/01/2021.

CHAPMAN, V. Modelos animais da dor da osteoartrose. **Associação Internacional para o Estudo da Dor**, 2016.

CHOW, Y. Y.; CHIN, K. Y. The role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis. **Hindawi: mediators of inflammation**, v. 2020, p. 19, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8293921>.

CAMANHO, G. L.; IMAMURA, M.; ARENDT-NIELSEN, L. Gênese da dor na osteoartrose. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, n. 1, p. 14-17, 2011.

CRUZ, R. et al. Meninsectomized miniature vietnamise pigs develop articular cartilage pathology resembling osteoarthritis. **Pathology – Research and Practice**, [s.l.], v. 211, n. 11, p. 829-838, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.07.012>.

CRUZ, R.; RAMÍREZ, C.; ROJAS O. I.; CASAS-MEJÍA O.; KOURI, J. B.; LÓPEZ M. A. V. The Pig as an Osteoarthritis Translational Research Model. **Journal of Osteoarthritis**, v. 1, n. 1, 2016.

DONALDSON, L. F.; SECKL, J. R.; MCQUEEN, D. S. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose (United Kingdom). **Journal of Neuroscience Methods**, v. 49, p. 5-10. (United Kingdom), 1993.

ESSER, S.; BAILEY, A. Effects of Exercise and Physical Activity on Knee Osteoarthritis: Pain Aspects of Arthritis. **Current Pain and Headache Report**, v. 15, p. 423-430, set. 2011.

EXPERIMENTAL MODEL OF ZYMOSAN-INDUCED ARTHRITIS IN THE RAT TEMPOROMANDIBULAR JOINT: role of nitric oxide and neutrophils. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Hindawi Publishing Corporation, v. 2011, dez. 2010.

IOAN-FACSINAY, A.; KLOPPENBURG, M. An emerging player in knee osteoarthritis: the infrapatellar pad. **Arthritis Research & Therapy**, 2013, 15:225.

GAULDIE, S. D.; MCQUEEN, D. S.; CLARKE, C. J.; CHESSELL, I. P. A robust model of adjuvant-induced chronic unilateral arthritis in two mouse strains. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, p. 281-291. Elsevier, UK, maio 2004.

GAUTAM, R. K.; GUPTA, G.; SHARMA, S.; HATWARE, K.; PATIL, K.; SHARMA, K.; GOYAL, S.; CHELLAPPAN, D. K.; DUA, K. Rosmarinic acid attenuates inflammation in experimentally induced arthritis in Wistar rats, using Freund's complete adjuvant. **International Journal oh Rheumatic Diseases**, ed. Wiley & Sons Australia, Ltd, p. 1247-1254, abr. 2019.

GETTY, R. Sindesmologia (Artrologia) Generalidades. In: GETTY, R. **Sisson/Grossman Anatomia dos Animais Domésticos**. 5ª Ed. Vol. 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1986. p. 33-38.

GUINGAMP, C.; GEGOUT-POTTLE, P.; PHILIPPE, L.; TERLAIN, B.; NETTER, P.; GILLET, P. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology and biochemical. **Arthritis & Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1670-1679, 1997.

GUPTA, S. R.; NIRMALA, S. A.; PATILA R. Y.; ASAN, G. S. Anti-arthritic activity of various extracts of *Sida rhombifolia* aerial parts. **Natural Product Research**, v. 23, n. 8, 20, p. 689-695, maio 2009.

GUZMAN, R. E.; EVANS, M. G.; BOVE, S.; MORENKO, B.; KILGORE, K. Mono-iodoacetate-Induced Histologic Changes in Subchondral Bone and Articular Cartilage

of Rat Femorotibial Joints: An Animal Model of Osteoarthritis. **Toxicology Pathology**, v. 31, p. 619-624, 2003.

HASLAUER, C. M.; ELSAID, K. A.; FLEMING, B. C.; PROFFEN, B. L. et al. Loss of Extracellular Matrix from Articular Cartilage is Mediated by the Synovium and Ligament after Anterior Cruciate Ligament Injury. **National Institute of Health**, v. 21, n. 12, p. 1950-1957, dez. 2013.

HELYES, Z.; SZABÓ, Á.; NÉMETH, J.; JAKAB, B.; PINTÉR, E.; BÁNVÖLGYI, A.; KERESKAI, L.; KÉRI, G.; SZOLCSÁNYI, J. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 5, p. 1677-1685, 2004.

HOCHBERG, M. C.; ALTMAN, R. D.; APRIL, K. T.; BENKHALTI, M.; GUYATT, G.; MCGOWAN, J.; TOWHEED, T.; WELCH, V.; WELLS, G.; TUGWELL, P. American College of Rheumatology 2012 Recommendations for the Use of Nonpharmacologic and Pharmacologic Therapies in Osteoarthritis of the Hand, Hip, and Knee. **Arthritis Care & Research. American College of Rheumatology**, v. 64, n. 4, p. 465-474, abr. 2012.

LESPASIO, M. J.; PIUZZI, N. P.; HUSNI, E.; MUSCHLER, G. F.; GUARINO, A. J.; MONT, M. A. Knee Osteoarthritis: A Primer. **The Permanente Journal/Perm J.**, v. 21, p. 16-183, 2017.

LEE, W. J.; KIM, J. Y.; WU, T. P.; PARK, L. S. The establishment of a porcine rheumatoid arthritis model: Collagen induced arthritis minipig model. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 132, p. 41-47, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphs.2016.04.012>.

LITTLE, C. B.; ZAKI, S. What constitutes an “animal model of osteoarthritis”- the need for consensus? **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 4, apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.01.017>.

LUNA, S. P. L.; ARAÚJO, A. L. de; NETO, P. I. da N.; BRONDANI, J. T.; OLIVEIRA, F. A. de; AZEREDO, L. M. dos S. et al. Validation of the UNESP-Botucatu pig composite acute pain scale (UPAPS). **PIOs One**, v. 15, n. 6, jun. 2020.

MARTÍNEZ, C. E.; GUTIÉRREZ, S. L.G.; MÉNDEZ, M de los M. H.; CASSANI, J.; VALDIVIA, A. T.; CASTELLANOS, L. M. O.; ENRÍQUEZ, R. G. Heliopsis longipes: anti-arthritic activity evaluated in a Freund's adjuvant-induced model in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Elsevier Ed. v. 27, cap. 2, p. 214-219, out. 2016.

MCCOY, A. M. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 5, p. 803-818, 2015.

MONTANARI, T. **Histologia Texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. 3. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 2016.

MORA, J. C.; PRZKORA, R.; ALMEIDA, Y. C. Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. **Journal of Pain Research**, Londres, v. 11, p. 2189-2196, 2018.

MURAYAMA, R. A. **Contribuição ao estudo da osteoartrite secundária da articulação temporomandibular**: estudo clínico – radiográfico retrospectivo em pacientes e modelo experimental em suínos. 2003. 185 f. Tese (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araçatuba, 2003.

NELSON, A. E.; ALLEN, K. D.; GOLIGHTLY, Y. M.; GOODE, A. P.; Joanne M. JORDAN, J. M. A systematic review of recommendations and guidelines for the management of osteoarthritis: The Chronic Osteoarthritis Management Initiative of the U.S. Bone and Joint Initiative. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 2014, Carolina do Norte.

OLIVEIRA, J. P. F.; BADIAL, P. R.; CUNHA, P. H. J.; BORDON. A. P., ARAUJO, J. P. JUNIOR; DIVERS, T. J.; WINAND, N. J.; BORGES, A. S. Freund's adjuvant-induced inflammation: clinical findings and its effect on hepcidin mRNA expression in horses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 51-56, jan. 2014.

OSTERGAARD, K.; PETERSEN, J.; ANDERSEN, C. B.; BENDTZEN, K.; DONALD, M. S. Histologic/Histochemical Grading System For Osteoarthritic Articular Cartilage: Reproducibility and Validity. **Arthritis & Rheumatism**, American College of Rheumatology, v. 40, n. 10, p. 1766-1771, out. 1997.

PEARSON, C. M. Experimental Joint Disease: observations on adjuvant-induced arthritis. Great Britain, **J. Chron. Dis.**, v. 16, p. 863-874, nov. 1963.

PRITZKER, K. P. H. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 53, p. 406-420, 1994.

PROFFEN, B. L.; MCELFRISH, M.; BRADEN C. F.; B., C.; MURRAY, M. M. A Comparative Anatomical Study Of The Human Knee And Six Animal Species, 2011. **The Knee**, v. 19, p. 493-499, USA, 2012.

RAMOS, A. M. O. **Artrite experimental induzida por Zymosan**: caracterização citológica, histopatológica e imuno-histoquímica da sinóvia e estudos histoquímico e bioquímico dos glicoconjugados da matriz condroide. 127f. Tese (Doutorado em Patologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000.

REZENDE, M. U.; CAMPOS, G. C.; PAILO, A. F. Conceitos atuais em osteoartrite. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 120-2. Disponível em: <<http://www.scielo.br/aob>>. Acesso em: 11/01/2021.

ROBINSON, W. H.; LEPUS, C. M.; WANG, Q.; RAGHU, H.; MAO, R.; LINDSTROM, T. M.; SOKOLOVE, J. Low-Grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, United States of America, Department of Veterans, v. 12, n. 10, p. 580-592, out. 2016.

SAITO, M.; TAKAHASHI, K.A.; ARAI, Y.; INOUE, A.; SAKAO, K.; TONOMURA, H.; HONJO, K.; NAKAGAWA, S.; INOUE, H.; TABATA, Y.; KUBO, T. Intraarticular administration of platelet-rich plasma with biodegradable gelatin hydrogel microspheres prevents osteoarthritis progression in the rabbit knee, **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 27, p. 201-207, 2009.

SALAFFI, F.; CIAPETTI, A.; CAROTTI, M.; GASPARINI, S.; GUTIERREZ, M. Disease Activity in Psoriatic Arthritis: Comparison of the Discriminative Capacity and Construct Validity of Six Composite Indices in a Real World. **Biomed Research International**, 2014.

SAMVELYAN, H. J.; HUGHES, D.; STEVENS, C. et al. Models of Osteoarthritis: relevance and new insights. **Calcif Tissue Int**, v. 109, p. 243-256, feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00670-x>.

SANDELL, L. J.; AIGNER, T. Articular cartilage and changes in arthritis an introduction: Cell biology of osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 3, p. 107-113, 2001. Disponível em: <<http://arthritis-research.com/content/3/2/107>>. Acesso em: 11/01/2021.

SANTOS, A.L.G.; DEMANGE, M.K.; PRADO, M.P.; FERNANDES, T.D.; GIGLIO, P.N.; HINTERMANN, B. Lesão Cartilaginosa e Osteoartrose do Tornozelo: Revisão de Literatura e Algoritmo de Tratamento. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 49, n.6, p. 565-572, 2014.

SCANZELLO, C.R.; GOLDRING, S.R.; The Role of Synovitis in Osteoarthritis Pathogenesis. **Bone**, v. 51, p. 249-257, 2012.

SCHLICHTING, N.; DEHNE, T.; MANS, K.; ENDRES, M. et al. Suitability of Porcine Chondrocyte Micromass Culture to Model Osteoarthritis in Vitro. **American Chemical Society**, v. 11, p. 2092-2105, 2014. Disponível em: <pubs.acs.org/molecularpharmaceutics>. Acesso em: 14/01/2021

SILVA JR; F.S. Osteoartrite experimental em ratos: efeito do sulfato de condroitina e sulfato de glucosamina sobre a incapacitação articular e a lesão na cartilagem. **[tese]-Universidade de São Paulo**; 84p. 2007.

SISSON, S. Sindesmologia sUÍNA. In: GETTY, R. **Sisson/Grossman Anatomia dos Animais Domésticos**. 5ª Ed. Vol. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1986. p. 1174-1175.

TORRES, M.G.; KWASNIEVWSKI, F.H.; SACLIENTE, L.G.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Arthritis Induced by Adjuvant in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats: Endogenous Glucocorticoid Effects on Inflammatory Response. **Inflammation**, v. 32, n. 1, p. 20-26.

VERNON, L.; ABADIN, A.; WILENSKY, D.; HUANG, C.; KAPLAN, L. Subphysiological Compressive Loading Reduces Apoptosis Following Acute Impact Injury in a Porcine

Cartilage Model. **Orthopaedic Surgery**, v. 6, n. 1. fev. 2014. DOI: 10.1177/1941738113504379.

VERHAGEN, A.P., FERREIRA, M., REIJNEVELD-VAN DE VENDEL, E.A.E., TEIRLINCK, C.H., RUNHAAR, J., VAN MIDDELKOOP, M., HERMSEN, J. DE GROOT, I.B. et al., [Do we need another trial on exercise in patients with knee osteoarthritis?: No new trials on exercise in knee OA.](#) **Osteoarthritis and Cartilage**, v.27, n. 9, p.1266–1269, 2019.

XU, Q.; ZHOU, Y.; ZHANG, R.; SUN, Z.; CHENG, L. Antiarthritic Activity of Qi-Wu Rheumatism Granule (a Chinese Herbal Compound) on Complete Freund's Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.

YUCE, P.; HOSGOR, H.; RENCBER, S. F.; YAZIR, Y. Effects of Intra-Articular Resveratrol Injections on Cartilage Destruction and Synovial Inflammation in Experimental Temporomandibular Joint Osteoarthritis. **American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, 1.e1-1.e12, set. 2020.