



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

TESE DE DOUTORADO

**A crioterapia melhora a função da marcha e reduz a inflamação sinovial de
ratos com osteoartrite do joelho induzida por transecção do ligamento
cruzado anterior**

Germannna de medeiros barbosa

São Carlos

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**A crioterapia melhora a função da marcha e reduz a inflamação sinovial de
ratos com osteoartrite do joelho induzida por transecção do ligamento
cruzado anterior**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Fisioterapia da Universidade
Federal de São Carlos, como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Doutora em Fisioterapia.

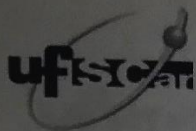
Discente: Germanna de Medeiros Barbosa

Orientadora: Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini

Co-orientadora: Dra. Paula Aiello Tomé de Souza Castro

São Carlos

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Germana de Medeiros Barbosa, realizada em 29/08/2019: -

Prof. Dra. Tania de Fatima Salvini
UFSCar

Prof. Dra. Stela Marcia Mattiello
UFSCar

Prof. Dra. Paula Regina Mendes da Silva Serrão
UFSCar

Prof. Dra. Elaine Minatel
UNICAMP

Prof. Dra. Elen Haruka Miyabara
USP

Esta pesquisa foi realizada com o apoio financeiro do **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) - processo 155211/2016-1, da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) - código financeiro 001 e da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) – processos 2015/26567-2 e 2016/24666-6).

Dedicatória

Dedico esta tese à minha família (de sangue e de coração), em especial ao meu amado paiho (*in memoriam*).

Epígrafe

“Onde quer que Deus tenha colocado você, essa é
a sua vocação. Não é o quanto fazemos, mas
quanto amor colocamos naquilo que fazemos.”

(Madre Teresa de Calcutá)

“Apenas não desista e siga tentando fazer o que
tem que ser feito. Onde há amor e inspiração,
não creio que possa dar errado.”

(Ella Fitzgerald)

Agradecimentos

“A gratidão é a memória do coração” (Chico Xavier)

A **Deus**, gratidão por cuidar tão bem de mim; por me ofertar saúde física e mental; pelas dificuldades que passei e pelas conquistas que alcancei. Peço que o Senhor me dê forças para que eu continue seguindo firme em busca do que almejo e sonho.

Ao meu painho (*in memoriam*), meu anjo protetor. Seis meses separaram a minha vinda para São Carlos e a sua partida repentina. Como foram difíceis esses anos sem a sua presença! Era um espaço que ninguém conseguia preencher. Quantas vezes eu quis ligar para receber os seus conselhos, para conversar sobre as minhas angústias, para contar das minhas conquistas – às vezes, a gente quer parecer forte “por fora”, mas, por dentro, há muita dúvida, medo, insegurança. Nenhuma folha cai de uma árvore em vão, e hoje eu percebo o quanto foi melhor assim, sobretudo para você. Agradeço-lhe por todo o seu esforço em vida para que eu chegasse até aqui. Essa conquista é nossa, painho!

A minha mainha, Fátima. Mãe, sei o quanto foram “pesados” esses anos todos “muito longe” de casa. Sei que não foi fácil ficar sozinha, sem painho – também não foi fácil para mim ficar longe de você. Hoje, estou aqui para agradecer por toda a sua atenção e dedicação. Você esteve comigo todo esse tempo, sempre me “socorreu” quando precisei e nunca mediu esforços para que não me faltasse nada. Essa conquista é nossa, mainha!

A minha irmã, Isabella. Acredito que a ausência de painho nos aproximou, e você sempre esteve comigo quando precisei, principalmente nas dificuldades. Agradeço-lhe por estar sempre do meu lado, apoiando, incentivando e orientando, fazendo o papel de “irmã mais velha”. Foi muito importante para mim! Também agradeço a **Júlio**, seu esposo e meu cunhado, por todo apoio, sobretudo nessa fase de transição que tenho vivido nos últimos dias.

A todos da **minha família (de pai e de mãe)**, em especial a **vovó Isaura** – que sempre rezou por mim e esteve preocupada com a minha alimentação (risos), enviando “trocadinhos” sempre que possível – e a minha **tia Dalila**, que falava todos os dias comigo por mensagens para saber se eu estava bem. Esse apoio foi essencial. Gratidão!

A **Telésforo e Rosa**, que foram verdadeiros pais para mim. Sem vocês, essa conquista simplesmente não poderia ter sido concretizada. Vocês me acolheram como filha e ofertaram para arcar com o que eu não conseguiria, sobretudo com a ausência de pai. Eterna gratidão!

A **Rafaella Cartaxo**, pela parceria e apoio incondicional ao longo desses anos. Sem você, tudo teria sido mais difícil, especialmente nos momentos mais críticos. Agradeço-lhe por sempre estar comigo e por não medir esforços para me ajudar.

À **amiga Tânia** e à **Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini**. À amiga, que sempre me ajudou, escutou e aconselhou, sobretudo quando mais precisei de “acolhimento” – nunca me esquecerei, Tânia, você foi uma verdadeira mãe nesse sentido para mim! À professora e orientadora, que levarei como exemplo para o resto da vida – se eu for metade do que você representa para a Fisioterapia no Brasil, estarei realizada. Tânia, não tenho como expressar o meu agradecimento com palavras, elas não bastariam. Você foi tudo isso, sim: amiga, professora, orientadora e, por vezes, “mãe”. Nunca terei como lhe agradecer pelo que fez por mim e por sua contribuição para a pessoa e profissional que me tornei. Não me esqueço de nenhuma conversa que tivemos, porque sempre foram marcantes. Eu sempre chegava “aperreada”, angustiada, com medo de muitas coisas não darem certo, e você, com seu jeito resolutivo, compreensivo, repleta de experiência, de vida vivida, retirava a carga que estava em minhas costas. Nunca fui para uma reunião com você da qual não saísse aliviada. Obrigada por isso. Espelhe-me no seu jeito generoso e amigo, e o levarei sempre comigo – quero ser assim com meus futuros alunos. Você me ensinou muito, “botou fé” em mim, principalmente nos momentos em que mais senti medo, como ao apresentar o meu projeto para a Kathleen Sluka ou ao conversar com o Brian Pietrosimone. Saiba que isso me fez ganhar asas e aumentou a minha confiança de uma maneira inexplicável. Gratidão pelos “puxões de orelha”, pelos conselhos, pela ajuda. Agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida. Saiba que pode sempre contar comigo.

À **Profa. Dra. Paula Rezende Camargo**, a Paulinha, que me proporcionou uma oportunidade incrível de trabalhar com ombro do atleta e me abriu as portas do seu laboratório para pesquisar. Paula, você não tem ideia do quanto eu sou grata a você, embora eu já tenha dito isso inúmeras vezes. Você me ajudou muito, e, como forma de gratidão, quero ajudar sempre que você precisar. Saiba que pode contar comigo.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), **Thiago Mattar** e **Fernando Cunha**, pela parceria. Sem vocês, dificilmente esses

estudos seriam concretizados. Gratidão, também, por colocarem pessoas tão boas para trabalhar junto comigo, como o **Fábio Oliveira** e o **Fernando Ramalho**.

À **Profa. Dra. Paula Aiello de Souza Castro**, por ter me acolhido e ajudado no início e no meio dessa jornada de doutorado. O seu apoio na construção do projeto e nas orientações foram muito importantes. Gratidão!

À banca, que foi escolhida com muito carinho e aceitou prontamente participar: **Paulinha Serrão, Stela, Elen e Elaine**, muito obrigada por fazerem parte desse momento tão especial na minha vida! Agradeço, também, aos membros suplentes, **Mariana Àvila, Josimaria Melo e Selma Matheus**, que da mesma forma aceitaram o meu convite.

Ao **Prof. Dr. Fábio Viadanna Serrão**, o Fabinho, que sempre foi uma das minhas inspirações como pesquisador e docente. Fabinho, gratidão pelo seu acolhimento, por cada ensinamento e por me deixar cursar estágio de docência em suas disciplinas (Ortopedia e Fisioterapia Esportiva). Foi um grande aprendizado! Você é um exemplo de inteligência e humildade que sempre levarei comigo. Nunca esquecerei daquele professor que tentava imitar o meu sotaque sempre que me encontrava pelos corredores (embora essa tentativa nunca tenha se aproximado do real; digamos que um “nordestinês” bem arranhado – risos).

Ao amigo e colega de laboratório **Jonathan Cunha**, meu grande parceiro de pesquisa. Jon, obrigada pela amizade e companheirismo ao longo desses anos. Você é um ser humano bondoso, de uma energia incrível. Gratidão por ter me ajudado sempre que precisei, sobretudo quando ficamos até altas horas no laboratório em tempos de coletas. Encontrei um amigo para a vida! Conte sempre comigo!

Ao meu grande amigo e colega de laboratório **Jean**. Como Deus foi bondoso em colocar você na minha vida! Sempre nos ajudamos, torcemos pelas conquistas e felicidade um do outro e criamos algo que sempre nos unirá: a amizade. Não se esqueça de que você poderá contar sempre comigo, e que estaremos juntos, mesmo na distância. Sentirei muitas saudades de você, meu amigo!

Ao meu amigo de longa data, **Glauko**, colega de laboratório. Trilhamos caminhos semelhantes (graduação, seleção brasileira de handebol de praia, mestrado, doutorado etc.) e sempre estivemos juntos, nos ajudando e sendo firmes nas parcerias. Espero que Deus o coloque de volta no meu caminho, para que possamos crescer juntos profissionalmente, especialmente pelas “bandas de lá de cima” do Brasil. Gratidão pela parceria de sempre!

Aos amigos da vida, a **Renata, Scheila, Murielle, Érika Valeska** e outros, por sempre me apoiarem, mesmo de longe. Aos meus amados times de voleibol, **Voleitão** (voleibol da UFSCar) e **Voleibol Country Club** – como foi incrível ter vocês ao longo desses anos! Guardarei cada um (a) no coração!

A todos os meus companheiros de laboratório – **Ana Elisa, Lucas, Angélica, Ivana, Maíra** – e aos **alunos de iniciação científica**, pelas discussões tão ricas e por sempre estarem dispostos a conversar e ajudar diante de dúvidas e problemas. Em especial, agradeço às alunas de iniciação científica **Lizandra, Bia** e **Andreza**, que me auxiliaram no período de coletas. A **Larissa, Danilo, Melina, Dayana, Lucas, Vander, Marcelo e Rafa**, parceiros do laboratório do Ombro, que sempre me acolheram tão bem. Muito obrigada! Em especial, agradeço a **Larissinha**, minha grande companheira e amiga ao longo desses anos. Quantas histórias construímos juntas! Saiba que sempre poderá contar comigo! Aproveito para agradecer aos parceiros de outros laboratórios: às meninas do LAFAR, **Bia e Gláucia**, com as quais ganhei mais proximidade; ao **Cris**, do LaPREM, uma pessoa incrível; à **Paty**, do LACAP, e à **Fernanda**, do LAFIPE, pela pronta disponibilidade em me ajudar.

A **Érika**, minha amiga e parceira de treinos, caronas, conversas, desabafos. Erikinha, gratidão por toda sua ajuda ao longo desses anos. Também agradeço a **Ana, Cíntia e Carla**, do Laboratório de Recursos Terapêuticos, por sempre se mostrarem disponíveis quando precisei.

A **Clarinha**, amiga querida, que nunca mediu esforços para me ajudar. Gratidão por todo apoio que recebi, e por ser essa pessoa tão “*vibe* boa”, que promove o bem só em estar por perto. Valeu pela força!

À **Profa. Dra. Mariana Ávila**, por ser tão amiga, torcer tanto por mim e nunca me negar ajuda. Mari, é tão bom saber que posso contar com você! Tão competente e, ao mesmo tempo, tão simples, humana. Gratidão por toda ajuda que você me deu, principalmente no final do doutorado. Sei que você torce por mim e pela minha felicidade. Quero que você saiba que pode sempre contar comigo. Aproveito, também, para agradecer à **Profa. Dra. Letícia Calixtre** que, assim como Mari, também me ajudou sempre que precisei. Lê, você é uma pessoa de quem eu quero sempre estar próxima. Obrigada por toda a ajuda!

Ao **Prof. Dr. Thiago Russo**, por nunca negar ensinamento ou qualquer ajuda. Thiago, obrigada por tudo! Muito do que eu aprendi, devo aos seus ensinamentos. Você é um professor e tanto!

À **Profa. Dra. Paula Serrão**, Paulinha, por ser uma pessoa tão boa, sempre disposta a ajudar ou esclarecer qualquer dúvida sempre que precisei.

Aos meus amigos do **I Ambulatório de Fisioterapia Esportiva (AMFE)** – **Ana Flávia, Adalberto, Glauko e Bruna**. Que experiência tivemos! O ano de 2018 foi um dos mais marcantes para mim. Gratidão por serem pessoas de fácil convívio e por acreditarem que tudo daria certo. Aprendemos muito, e levaremos cada pedacinho dessa construção para a vida. Não menos importante, aos **alunos do AMFE** – obrigada por me ensinarem tanto! Vida longa ao #teamAMFE!

À **Profa. Dra. Catarina Oliveira** e ao **Prof. Dr. Rodrigo Scattone**, por me acolherem tão bem nessa minha nova fase da vida. Estou muito feliz por estar perto de vocês!

A uma pessoa muito, muito especial: **Iolanda** (Iozinha, Iolinda), dona do melhor sorriso e do “bom dia, bom dia, bom dia” mais alegre que você pode um dia receber. Iô, que presente de Deus foi encontrá-la e tê-la na minha vida! Agradeço-lhe por todo o carinho dispensado para comigo, por sempre me ajudar quando precisei. Sei que a “aperreei” demais, mas só costumo fazer isso com as pessoas de quem eu gosto e que sinto serem parte de minha vida. Você é uma delas! Vou levá-la comigo para sempre, e espero tê-la em minha vida mesmo na distância. Linda e maravilhosa!

Ao **PPGFT da UFSCar** e à **UFSCar**, o meu muito obrigado pela oportunidade de estar e conviver com tantas pessoas e profissionais qualificados (docentes, discentes e funcionários). Foram anos incríveis de minha vida, em que o aprimoramento foi uma constante. Gostaria de agradecer, em especial, **às meninas da limpeza** (vida, vidinha, entre outras), que sempre tentavam manter o laboratório limpo para que trabalhássemos em boas condições. Agradeço, ainda, aos meninos da secretaria – **Emerson, Wagner** e aos **estagiários** que por lá passaram – pela disposição em me auxiliar em qualquer necessidade.

À **CAPES** e ao **CNPq**, pelo auxílio financeiro e incentivo à Educação em nosso país, me diante de tantas dificuldades. Sem esse apoio, seria impossível a realização deste doutorado.

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma a conquistar esse sonho, seja com palavras, gestos ou enviando boas energias. Posso não ter citado o nome ao longo desse texto de agradecimentos, porém o sentimento de gratidão é muito forte dentro de mim. Ninguém constrói nada sozinho e, se estou aqui hoje, é porque muita gente me ajudou a alcançar esse sonho. Gratidão! Gratidão! Gratidão!

Resumo

A osteoartrite do joelho (OAJ), a condição articular degenerativa mais frequente em adultos e idosos, é considerada uma das principais causas de dor e incapacidade funcional. Modelos animais de OAJ pós-traumática, como o de transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA), têm sido amplamente utilizados devido à sua semelhança com a OAJ em humanos. Por meio desses modelos, pode-se testar o efeito de intervenções fisioterapêuticas, a exemplo da crioterapia, assim como caracterizar aspectos relacionados à patogênese da OAJ. Nesse sentido, os objetivos desta tese foram: 1) avaliar os efeitos da crioterapia similar à utilizada na clínica sobre a função da marcha e a inflamação sinovial de ratos com OAJ induzida por TLCA; 2) comparar os sinais da OAJ 30 e 60 dias após a TLCA unilateral. Dor, função da marcha, inflamação sinovial e alterações histopatológicas na membrana sinovial foram analisadas, bem como a interação entre essas variáveis. Para isso, 64 ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*) foram divididos em dois estudos. No primeiro estudo, 32 ratos foram aleatorizados em quatro grupos de oito animais cada: Controle, OAJ (cirurgia de TLCA do joelho), OAJ + Crioterapia (cirurgia de TLCA do joelho e saco de gelo triturado) e OAJ + Placebo (cirurgia de TLCA do joelho e saco de areia). Sessenta dias após a cirurgia, os grupos OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo receberam as suas respectivas intervenções duas vezes por dia, durante 20 minutos cada, por um período de cinco dias consecutivos (do 61º ao 65º dia). O teste de marcha, a temperatura da pele, o limiar de resposta térmica e o diâmetro articular do joelho foram avaliados em todos os grupos antes da cirurgia de TLCA, antes (60º dia) e após (66º dia) o período de intervenção. O líquido sinovial (contagem de leucócitos e níveis de citocinas) e a membrana sinovial (análise histopatológica) foram coletados no 66º dia. Concluiu-se que a crioterapia similar à utilizada na clínica aumentou a área de impressão da pata e reduziu o número de leucócitos e citocinas inflamatórias no líquido sinovial de ratos com OAJ induzida por TLCA. Esses resultados sugerem que ela pode ser utilizada como tratamento não farmacológico e complementar para controlar a inflamação articular na OAJ de ratos. No segundo estudo, 32 ratos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de oito animais cada. Dois grupos foram submetidos a cirurgia unilateral para indução da OAJ e analisados após 30 (OAJ30) e 60 dias (OAJ60). Dois grupos Controle (sem cirurgia) também foram avaliados após os mesmos períodos de tempo (C30 e C60). Todos os grupos foram avaliados antes da TLCA, do teste menos estressante para o mais estressante (temperatura da pele, limiar de resposta mecânica, teste da marcha, limiar de resposta térmica e edema), e também 30 e 60 dias após a cirurgia. Após a eutanásia, o líquido sinovial (contagem de leucócitos e níveis de citocinas) e a membrana sinovial (análise histopatológica) foram coletados. Concluiu-se que 30 dias após a TLCA foram suficientes para induzir todos os sinais da OAJ em ratos, sugerindo que um período de tempo mais curto pode ser utilizado como modelo experimental.

Palavras-chave: Doenças Reumáticas. Mediadores da Inflamação. Modelo Animal. Terapia com Gelo. Reabilitação.

Abstract

Knee osteoarthritis (KOA), the most frequent degenerative articular disorder in adults and seniors, is considered one of the primary causes of pain and functional disability. Animal models of post-traumatic KOA, such as anterior cruciate ligament transection (ACLT), have been widely used because of their similarity to KOA in humans. Through these models, one can test the effect of physical therapy interventions, such as cryotherapy, as well as characterize aspects related to the pathogenesis of KOA. In this sense, the objectives of this thesis were: 1) to evaluate the effects of clinical-like cryotherapy on gait function and synovial inflammation in rats with KOA induced by ACLT; 2) To compare the unilateral signs of knee osteoarthritis (KOA) 30 and 60 days after anterior cruciate ligament transection (ACLT). Pain, gait function, synovial fluid inflammation and histopathological changes in the synovial membrane were analyzed, as well as the interaction between the variables. For this, 64 male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were divided in two studies. In the first study, 32 rats were randomly divided into four groups of 8 animals each: KOA (ACLT knee surgery), KOA+Cryotherapy (ACLT knee surgery and ice pack) and KOA+Placebo (ACLT knee surgery and sand pack). Sixty days after surgery, both the KOA+Cryotherapy and KOA+Placebo groups received their respective interventions twice a day, for 20 min each, over five consecutive days (from the 61st to 65th days). Gait test, skin temperature, thermal response threshold and joint swelling were assessed in all groups before ACLT surgery, and pre (60th day) and post (66th day) intervention protocols. Synovial fluid (account of leukocytes and cytokine levels) and synovial membrane (histopathological analysis) were collected on the 66th day. It was concluded that clinical-like cryotherapy improves the gait function and reduces the number of leukocytes and inflammatory cytokines in synovial fluid of rats with ACLT-induced KOA. These results suggest that it can be used as a non-pharmacological and complementary treatment to control joint inflammation in the chronic phase of KOA. In the second study, 32 male Wistar rats were randomly distributed into four groups of 8 animals each. Two control groups (without surgery) were also assessed after the same time periods (C30 and C60). All the groups were evaluated before ACLT from the least to most stressful tests (skin temperature, mechanical response threshold, gait test, thermal response threshold and joint swelling), as well as 30 and 60 days after surgery. After euthanasia, the synovial fluid and synovial membrane were collected. It was concluded that 30 days after ACLT is sufficient to induce all KOA signs in rats, suggesting that a shorter period of time can be used as an experimental model.

Key words: Rheumatic diseases. Inflammation Mediators. Animal Model. Ice Therapy. Rehabilitation

Lista de figuras

Manuscrito I

Página

Figura 1. Procedimentos experimentais. Os animais de ambos os grupos receberam duas intervenções de 20 min por dia, uma pela manhã e outra à tarde. 39

Figura 2. Área de impressão da pata (A), área de impressão da pata normalizada (B), comprimento da pata (C) largura da pata (D), largura do passo (E), comprimento do passo (F) e ângulo da pata (G) no início (0 dia), pré (60° dia) e pós (66° dia) protocolo de intervenção em todos os grupos. 46

Figura 3. Limiar de resposta térmica (A), temperatura da pele (B) e edema articular do joelho (C) no início (0 dia), pré (60° dia) e pós (66° dia) protocolo de intervenção em todos os grupos. 48

Figura 4. Número de células no líquido sinovial do joelho. Número total de leucócitos (A) e contagem diferencial de macrófagos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D). 50

Figura 5. Concentração de citocinas no líquido sinovial do joelho. (A) TNF- α ; (B) IL1- β ; (C) IL-6; (D) IL-17 e (E) IL-10. 52

Figura 6. Avaliação histopatológica da membrana sinovial. Fotomicrografias representativas de secções da membrana sinovial coradas com Hematoxilina e Eosina (H & E) e Sirius Red nos grupos controle, OAJ, OAJ + crioterapia e OAJ + Placebo (aumento de 200x) (A). Representação gráfica do Escore de Sinovite (B) e Fibrose (C) nos grupos Controle, OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo. 53

Manuscrito II

Figura 1. Procedimentos experimentais. Para cada período de tempo, os animais foram distribuídos aleatoriamente em controle (sem cirurgia) ou OAJ (osteoartrite de joelho após a TLCA), e foram analisados antes da TLCA e 30 ou 60 dias após a cirurgia. 68

Figura 2. Área de impressão da pata (A), comprimento da pata (B) largura da pata (C), largura do passo (D), comprimento do passo (E) e ângulo da pata (F) no início (0 dia), 30 e 60 dias após a cirurgia nos grupos Controle e OAJ. 73

- Figura 3.** Limiar de resposta mecânica (A) e térmica (B), diâmetro articular do joelho (C) e temperatura da pele (D) no início (0 dia), 30 e 60 dias após a cirurgia nos grupos Controle e OAJ. 72
- Figura 4.** Número de células no líquido sinovial do joelho. Número total de leucócitos (A) e contagem diferencial de macrófagos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D). 74
- Figura 5.** Concentração de citocinas no líquido sinovial do joelho. (A) TNF- α ; (B) IL1-p; (C) IL-6; (D) IL-17; (E) IL-10. 75
- Figura 6.** Avaliação histopatológica da membrana sinovial. Fotomicrografias representativas de secções da membrana sinovial coradas com Hematoxilina e Eosina (H & E) nos grupos Controle e OAJ (aumento de 200x) (A). Representação gráfica do escore de sinovite nos grupos controle e OAJ 30 e 60 dias após a cirurgia. 76

Lista de tabelas

Manuscrito II

Página

Tabela I. Coeficientes de correlação de *Pearson* (r) entre a área da pegada, limiar mecânico e térmico, diâmetro articular, temperatura cutânea, leucócitos e citocinas inflamatórias após 30 e 60 dias da cirurgia de TLCA.

77

Lista de abreviações e siglas

°C – Graus Célsius

µL- Microlitros

ABRAFITO - Associação Brasileira de Fisioterapia Traumato-Ortopédica

ABRAPG-Ft - Associação Brasileira de Pesquisa e Pós-Graduação em Fisioterapia

ANOVA – Análise de variância

C30- Controle 30 dias após a Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

C60- Controle 60 dias após a Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCI - Coeficiente de correlação intraclasse

cm – Centímetros

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPM – Erro padrão da medida

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

g- Gramas

H&E – Hematoxilina e eosina

kg – Quilos

IL-1β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina - 10

IL-17 – Interleucina -17

LCA – Ligamento cruzado anterior

mg – Miligramas

ml – Mililitros

mm – Milímetros

mM – Milimolar

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

nm- Nanômetro

OAJ – Osteoartrite do joelho

OAJ30 – Osteoartrite do joelho 30 dias após a Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

OAJ60 – Osteoartrite do joelho 60 dias após a Transecção do Ligamento Cruzado Anterior

PESCD - Programa de Estágio Supervisionado em Capacitação Docente

pg – Picogramas

PRICE - Proteção, Repouso, Gelo, Compressão e Elevação

r- Coeficiente de correlação de Pearson

rpm – Rotações por minuto

s- Segundos

SONAFE- Sociedade Nacional de Fisioterapia Esportiva e Atividade Física

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

UFSCAR - Universidade Federal de São Carlos

USP - Universidade de São Paulo

TLCA - Transecção do ligamento cruzado anterior

TNF- α - Fator de necrose tumoral – alfa

SUMÁRIO

Contextualização científica do projeto de doutorado	22
Objetivos e hipóteses da tese.....	27
Referências bibliográficas.....	28
Estudo I.....	34
Resumo.....	35
Introdução	36
Materiais e métodos	37
Resultados.....	44
Discussão.....	53
Conclusão.....	56
Referências bibliográficas.....	56
Estudo II	62
Resumo.....	63
Introdução	64
Materiais e métodos	65
Resultados.....	71
Discussão.....	78
Referências bibliográficas.....	80
Conclusões finais da tese.....	85
APÊNDICE I.....	86
ANEXO I	90
ANEXO II.....	92
ANEXO III	94

Prefácio

Projeto de pesquisa da tese

O projeto de pesquisa de doutorado foi realizado no Laboratório de Plasticidade Muscular da UFSCar, e elaborado sob orientação da Profa. Dra. Tânia de Fátima Salvini e coorientação da Dra. Paula Aiello Tomé de Sousa Castro. A equipe de colaboradores contou com a participação do Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha e do Prof. Dr. Fernando Queiroz Cunha, ambos do Departamento de Farmacologia (*Center for Research in Inflammatory Diseases*) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FMRP/USP); do Dr. Francisco Fábio de Oliveira (pós-doutorando da FMRP/USP); do Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho, do Departamento de Patologia e Medicina Legal (FMRP/USP); e do Prof. Dr. Thiago Luiz Russo, do Departamento de Fisioterapia da UFSCar. Fui bolsista de Doutorado Regular pelo CNPq (processo 155211/2016-1).

Dois estudos compõem a presente tese. O primeiro, *Clinical-like cryotherapy improves gait function and reduces synovial inflammation in rats with knee osteoarthritis*, foi submetido ao periódico *Scientific Reports* (Estudo I; Anexo I). Parte dos resultados foi também apresentada no I Congresso Internacional e no II Congresso Brasileiro da Associação Brasileira de Fisioterapia Traumato-Ortopédica (ABRAFITO) em Brasília/Brasil, e no *OARSI World Congress on Osteoarthritis* em Toronto/Canadá. O segundo, *Thirty days after anterior cruciate ligament transection is sufficient to induce pain, functional impairment and synovial inflammation related to knee osteoarthritis in rats*, foi submetido ao periódico *Inflammation Research* (Estudo II; Anexo II). Dados parciais desse estudo foram apresentados no II Congresso Internacional e no III Congresso Brasileiro da ABRAFITO em Minas Gerais/Brasil.

Cooperações em outros projetos de pesquisa durante o doutorado

Durante o doutorado, colaborei em estudos experimentais desenvolvidos em paralelo no laboratório, que resultaram, até o momento, na coautoria de dois artigos científicos: 1) *Clinical-like cryotherapy in acute arthritis of the knee improves inflammation signs, pain, joint swelling and motor performance in mice*, submetido ao periódico *Scientific Reports*; e 2) *Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats*, publicado no periódico *Scientific Reports* (APÊNDICE I). No mesmo período, colaborei em ensaios clínicos do laboratório que me permitiram manter o

contato com a prática clínica em fisioterapia. Um dos estudos, *Short-term cryotherapy and placebo improve pain and physical function in individuals with knee osteoarthritis – a randomized placebocontrolled trial*, já finalizado, foi submetido ao periódico *Journal of Physiotherapy* (APÊNDICE I). Outros dois projetos encontram-se em andamento: 1) *Efeito da laserterapia associada a um programa de exercícios terapêuticos na dor, na função e na qualidade de vida em indivíduos com osteoartrite do joelho*; e 2) *Efeito da crioterapia associada a um programa de exercícios terapêuticos na dor, na função e na qualidade de vida em indivíduos com osteoartrite do joelho*.

Também no período do doutorado, participei como colaboradora do projeto de pesquisa *Avaliação do complexo do ombro de tenistas amadores e profissionais*, do Laboratório de Avaliação e Intervenção do Complexo do Ombro do Departamento de Fisioterapia da UFSCar, tendo como orientadora a Profa. Dra. Paula Rezende Camargo. Esse projeto já se encontra finalizado, e os dados estão em análise para publicações posteriores dos artigos científicos. Até o momento, dois resumos foram apresentados e publicados em anais de congresso: *Relação da força dos músculos do ombro e quadril em tenistas profissionais – VIII Congresso Brasileiro e VI Congresso Internacional da Sociedade Nacional de Fisioterapia Esportiva (SONAFE) em Caldas Novas/Goiás (2017)*, e *Avaliação da amplitude de movimento, flexibilidade, força muscular, posicionamento escapular e clavicular de tenistas amadores adultos – II Congresso Internacional e III Congresso Brasileiro da ABRAFITO em Belo Horizonte/Minas Gerais (2019)*. Também em colaboração com a Profa. Paula, escrevi o capítulo de livro *Avaliação e reabilitação do ombro do atleta overhead nos esportes de praia*, publicado no Programa de Atualização em Fisioterapia Esportiva e Atividade Física, Ciclo 8, Volume 3, 2019 (ISBN 978-85-514-0765-3), em convênio com a SONAFE e a Artmed Panamericana Editora.

Atividades didáticas

Durante o doutorado, coorientei a aluna de graduação Lizandra Botaro Martinho no desenvolvimento de um projeto de Iniciação Científica, também apresentado como Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Fisioterapia da UFSCar. Parte do seu trabalho foi apresentada no Simpósio de Fisioterapia da UFSCar no ano de 2018.

Também no período do doutorado, participei do Programa de Estágio Supervisionado em Capacitação Docente (PESCD) nas disciplinas de Fisioterapia Traumatológica e de Fisioterapia Esportiva do Curso de Graduação em Fisioterapia da UFSCar; atuei como supervisora do I Ambulatório de Fisioterapia Esportiva da UFSCar (2018); ministrei aulas

como professora convidada em cursos de aperfeiçoamento da UFSCar; e fui banca examinadora de trabalhos de conclusão de curso de graduação.

Cooperações em outras atividades

- Membro da comissão organizadora do XI Fórum Nacional de Pesquisa e Pós-Graduação Stricto Sensu em Fisioterapia, realizado pela ABRAPG-Ft e UFSCar, em Campinas/São Paulo (2017);
- Membro da comissão organizadora do XXIV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar e do XIV Encontro de Alunos e Ex-Alunos em São Carlos/São Paulo (2017);
- Membro da comissão discente do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFSCar, no período de junho de 2017 a junho de 2018;
- Presidente do XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar e do XV Encontro de Alunos e Ex-Alunos (2018).

Contextualização científica do projeto de doutorado

Osteoartrite do joelho

A osteoartrite é a forma mais comum de artrite e destaca-se por ser a doença articular degenerativa mais frequente entre adultos e idosos no cenário mundial (NEOGI, 2013). Dentre as articulações que suportam o peso corporal, o joelho é a região mais acometida pela osteoartrite. Estima-se que mais de 250 milhões de pessoas no mundo, acima de 60 anos, apresentem osteoartrite de joelho (OAJ) (ZHANG et al., 2010). Diante do seu caráter progressivo, a OAJ tornou-se a 13ª causa de anos vividos com incapacidade, entre 310 doenças, no período de 10 anos (VOS et al., 2016). Com a crescente expectativa de vida e o envelhecimento da população mundial, um aumento de 40% na incidência da OAJ está previsto até o ano de 2025 (WOOLF; PFLEGER, 2003), acarretando alto impacto socioeconômico e para o sistema público de saúde.

Apesar de ser uma doença multifatorial e considerada o produto da interação entre fatores sistêmicos e locais (NEOGI; ZHANG, 2013), o início da OAJ precede o surgimento de sinais e sintomas (GLYN-JONES et al., 2015). Por muito tempo, foi denominada osteoartrose do joelho, sobretudo pelo caráter degenerativo da cartilagem articular (BERENBAUM, 2013). Nos últimos anos, porém, as pesquisas também se voltaram para a importância do processo inflamatório na OAJ (BERENBAUM, 2013; WENHAM; CONAGHAN, 2010), principalmente por este se iniciar bem antes das alterações radiográficas (DAGHESTANI; KRAUS, 2015; GLYN-JONES et al., 2015). Com isso, estudos têm enfatizado o papel de mediadores inflamatórios como possíveis marcadores bioquímicos, mas não específicos, para auxiliar no diagnóstico prévio e no prognóstico da doença (MABEY; HONSAWEK, 2015).

Sabe-se que a cartilagem articular é um tecido conjuntivo de lento remodelamento, sendo os condrócitos as únicas células presentes nessa estrutura (AIGNER; MCKENNA, 2002). Alterações no equilíbrio metabólico da cartilagem articular, geradas pela sobrecarga e outros fatores, estimulam a morte dos condrócitos, um dos eventos cruciais na patogênese da OAJ (HASHIMOTO et al., 1998). Esse desequilíbrio ativa tanto células sinoviais quanto sistêmicas, como os neutrófilos e os macrófagos (SWANN; SLAYTER; SILVER, 1981), que estimulam a produção de mediadores pró-inflamatórios no líquido sinovial. Dentre as principais citocinas, destacam-se a interleucina 1-beta (IL-1 β), a IL-6 e o fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α), por desempenharem um importante papel no aumento de enzimas catabólicas e outros fatores inflamatórios, que degradam a matriz extracelular (DAGHESTANI; KRAUS, 2015; GLYN-

JONES et al., 2015; LOESER et al., 2012). Mais recentemente, a IL-17 também foi identificada como um mediador crítico no recrutamento, migração e ativação de neutrófilos, além de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias (DELIGNE et al., 2015; HONORATI et al., 2006). Os produtos de degradação da cartilagem são, então, fagocitados pelas células presentes na sinóvia, resultando na sinovite (WENHAM; CONAGHAN, 2013). Essa interação favorece a produção de mais mediadores inflamatórios e a liberação de enzimas proteolíticas, gerando um círculo repetitivo no curso da doença (SWANN; SLAYTER; SILVER, 1981; WENHAM; CONAGHAN, 2013). As alterações na cartilagem são progressivas e frequentemente identificadas por sinais radiográficos (LOESER et al., 2012) e sintomatológicos, como a presença de dor, edema, instabilidade, rigidez articular e comprometimentos da função motora (SHARMA, 2016).

Osteoartrite do joelho induzida por transecção do ligamento cruzado anterior

O ligamento cruzado anterior (LCA) é uma das estruturas mais lesionadas durante a prática esportiva (CHEATHAM; JOHNSON, 2010), e sua ruptura ou reconstrução aumentam em até 3,89 vezes o risco de desenvolver OAJ. Estima-se que 68–80% dos indivíduos com lesão do LCA desenvolvam OAJ radiográfica em até 20 anos, independentemente da reconstrução ligamentar (VAN YPEREN et al., 2018). Diversos fatores de risco estão associados a essa alta incidência, incluindo danos no momento da lesão (MENDIAS et al., 2013), instabilidade mecânica contínua (CHAUDHARI; SCHMITT; ANDRIACCHI, 2018), fraqueza muscular do quadríceps (SEGAL; GLASS, 2011) e inflamação local extensa (SCANZELLO; GOLDRING, 2012).

Para melhor investigar as alterações associadas à OAJ, modelos animais de instabilidade tibiofemoral, como o de transecção do LCA (TLCA), têm sido utilizados, por induzirem alterações compatíveis com a OAJ pós-traumática de humanos (STOOP et al., 2001). Estudos prévios mostraram que, a partir de sete dias da TLCA, ocorre redução de condrócitos, degeneração do colágeno tipo II (NIELSEN et al., 2008; PICKARSKI et al., 2011; STOOP et al., 2001) e aumento de TNF- α sérico (DIAS et al., 2014). No entanto, essas alterações parecem ser oriundas do procedimento cirúrgico invasivo (DELFINO et al., 2013). Por outro lado, com 28 dias após a lesão, há evidências de um processo degenerativo instalado na cartilagem articular (HAMILTON et al., 2015; RUAN et al., 2013; TSAI et al., 2013), que tende a progredir ao longo do tempo (MCERLAIN et al., 2012; TSAI et al., 2013).

Além de ser utilizado para compreender os aspectos moleculares e morfológicos relacionados à cartilagem articular (HAMILTON et al., 2015; TSAI et al., 2013) e aos tecidos periarticulares (CUNHA et al., 2019; EGLOFF et al., 2014), há evidências de que o modelo de TLCA também pode ser empregado por induzir alterações nócicas (RUAN et al., 2013; TSAI et al., 2017), comprometimento funcional (HAMILTON et al., 2015; RUAN et al., 2013) e inflamação sinovial (EGLOFF et al., 2016), equivalentes à OAJ de humanos. Embora os aspectos inflamatórios e comportamentais sejam pouco explorados entre os estudos, mesmo aqueles que avaliaram os efeitos de intervenções terapêuticas, investigar esses desfechos ampliaria a caracterização do modelo animal de OAJ, aproximando-o da condição no humano.

A crioterapia na osteoartrite do joelho

De acordo com alguns dos principais guias de conduta e recomendações para o tratamento da OAJ (FERNANDES et al., 2013; HOCHBERG et al., 2012; T.E. et al., 2014), a abordagem padrão inicia-se por intervenções não farmacológicas, que são muitas vezes complementadas com tratamentos farmacológicos, para alívio dos sintomas e restabelecimento da função. No entanto, o uso contínuo de medicamentos pode resultar em efeitos adversos (FERNANDES et al., 2013; HAFEZI-NEJAD et al., 2016; MANDEGARAN; CONWAY; ELTON, 2013), o que favorece a busca por outros tratamentos. Em última instância, não havendo melhora do quadro clínico, a abordagem cirúrgica é indicada.

A crioterapia é considerada uma alternativa não farmacológica para controle da dor e melhora do quadro clínico (W. et al., 2008). É um recurso não invasivo, de baixo custo e de fácil aplicabilidade, que pode ser empregado de maneira isolada ou associada a outras terapias (HERRERA et al., 2010; HULME et al., 2009; KNIGHT, 1995). Já estão bem estabelecidos os efeitos benéficos da crioterapia para traumas agudos, como as lesões musculoesqueléticas (SIQUEIRA et al., 2016; VIEIRA RAMOS et al., 2016); após intervenções cirúrgicas em humanos, como a reconstrução do LCA, reduzindo a dor (JAWAD et al., 2017; MARTIMBIANCO et al., 2014); e na artroplastia do joelho, controlando o sangramento (JIANG, 2015). Entre os principais efeitos fisiológicos da crioterapia, destacam-se: a diminuição da temperatura superficial, intramuscular e intra-articular (KNIGHT, 1995; VIEIRA RAMOS et al., 2016); a redução do metabolismo celular (KNIGHT, 1995) e do controle de mediadores inflamatórios (VIEIRA RAMOS et al., 2016); menor hipóxia secundária e edema (DEAL et al., 2002; KNIGHT, 1995), além de redução na velocidade de condução nervosa, promovendo analgesia e melhora da função (HERRERA et al., 2010;

KNIGHT, 1995). Ademais, uma revisão sistemática prévia demonstrou que a crioterapia também pode regular importantes vias envolvidas na inflamação e na destruição articular em doenças reumáticas (GUILLOT et al., 2014b).

Alguns estudos demonstraram que a aplicação de crioterapia sobre uma articulação inflamada (35° – 36°) reduz a temperatura intra-articular para 30°C , mantendo-se a hipotermia local por 2–3 horas (GUILLOT et al., 2014b; OOSTERVELD et al., 1992). Outros também comprovaram a influência de baixas temperaturas na redução das concentrações de citocinas inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6, em pacientes com artrite reumatoide (JASTRZĄBEK et al., 2013; MA et al., 2015). De acordo com estudos já publicados, a crioterapia apresenta um efeito regulatório, ativando o sistema nervoso autônomo e os neurônios simpáticos eferentes. Esses neurônios liberam acetilcolina e noradrenalina, que se ligam aos seus receptores específicos. Essa interação ligante-receptor pode inibir vias que ativam citocinas pró-inflamatórias e reduzem o estresse oxidativo, controlando a inflamação (GUILLOT et al., 2014b). A liberação de noradrenalina também favorece a vasoconstrição da parede vascular, o que pode contribuir para a redução do metabolismo e do processo inflamatório. Além disso, a crioterapia pode regular importantes vias enzimáticas envolvidas na inflamação articular, sobretudo a partir da redução da temperatura intra-articular (BOCOBO et al., 1991; OOSTERVELD; RASKER, 1994a).

Com base na literatura científica atual, ainda não há estudos com evidências suficientes sobre os efeitos da crioterapia na OAJ (DEMOULIN; VANDERTHOMMEN, 2012; GUILLOT et al., 2014a; HULME et al., 2009). Foi demonstrado recentemente que, embora algumas diretrizes clínicas recomendem a crioterapia para o manejo dos sintomas da OAJ, não há evidências suficientes sobre seu uso para essa população (DANTAS et al., 2019). Em animais, os poucos estudos que constam na literatura são antigos e focados nas respostas imediatas da crioterapia sobre temperatura, inflamação e dor articular aguda em modelos de artrite (BOCOBO et al., 1991; DORWART; HANSELL; SCHUMACHER, 1974; FARRY et al., 1980; OOSTERVELD; RASKER, 1994b; SLUKA et al., 1999). Nesses estudos, a articulação mais analisada foi o joelho, com aplicação de crioterapia variando entre 15 e 30 minutos, até duas vezes ao dia, com diferentes protocolos utilizados (pacote de gelo triturado e imersão em água gelada). Dentre os principais resultados, destacam-se a diminuição da hiperalgesia secundária ao estímulo nocivo e da temperatura intra-articular ($\leq 1,7^{\circ}$), o que favorece a redução do número de células inflamatórias e da atividade enzimática (BOCOBO et al., 1991; DORWART; HANSELL; SCHUMACHER, 1974; OOSTERVELD; RASKER, 1994b). Uma recente investigação mostrou que a crioterapia local aplicada por 14 dias consecutivos tem

efeito anti-inflamatório local e sistemático na artrite induzida por adjuvante, especialmente por meio da inibição da via IL-6/IL-17, independente do TNF- α (GUILLOT et al., 2017). Embora esse seja um achado relevante, o estudo foi realizado em modelo animal de artrite reumatoide, com efeitos imunológicos potencialmente destrutivos nas articulações (OLIVER; BRAHN, 1996). Diante da carência de estudos que avaliem os efeitos da crioterapia na OAJ, a presente tese foi delineada para fornecer novas evidências científicas que possam fundamentar o seu uso na prática clínica.

Objetivos e hipóteses da tese

Estudo I: *Clinical-like cryotherapy improves gait function and reduces synovial inflammation in rats with knee osteoarthritis* (Anexo I – página 90).

- *Objetivo:* avaliar os efeitos da crioterapia similar à utilizada na clínica sobre a função da marcha e a inflamação sinovial de ratos com OAJ induzida por TLCA.
- *Hipótese:* a crioterapia melhoraria a função da marcha e reduziria os sinais inflamatórios dos animais com OAJ.

Estudo II: *Thirty days after anterior cruciate ligament transection is sufficient to induce pain, functional impairment and synovial inflammation related to knee osteoarthritis in rats* (Anexo II – página 92)

- *Objetivo:* comparar os sinais da OAJ 30 e 60 dias após a TLCA unilateral. Dor, função da marcha, inflamação sinovial e alterações histopatológicas na membrana sinovial foram analisadas, bem como a interação entre essas variáveis.
- *Hipótese:* trinta dias após a TLCA seriam suficientes para induzir a OAJ em ratos, com sinais inflamatórios semelhantes aos observados no grupo de 60 dias.

Referências bibliográficas

- AIGNER, T.; MCKENNA, L. Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 5–18, 2002.
- BERENBAUM, F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). **Osteoarthritis Cartilage**, v. 21, n. 1, p. 16-21, 2013.
- BOCOBO, C. et al. The effect of ice on intra-articular temperature in the knee of the dog. **American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 181–185, 1991.
- CHAUDHARI, A. M. W.; SCHMITT, L. C.; ANDRIACCHI, T. P. Effects of Alterations in Gait Mechanics on the Development of Osteoarthritis in the ACL-Deficient Knee. In: **ACL Injuries in the Female Athlete**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018. p. 153–166.
- CHEATHAM, S. A.; JOHNSON, D. L. Anatomic Revision ACL Reconstruction. **Sports Medicine and Arthroscopy Review**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 33–39, 2010.
- CUNHA, J. E. et al. Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. **Scientific reports**, [s. l.], v. 9, p. 6366, 2019.
- DAGHESTANI, H. N.; KRAUS, V. B. Inflammatory biomarkers in osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1890–1896, 2015.
- DANTAS, L. O. et al. The effects of cryotherapy on pain and function in individuals with knee osteoarthritis: a systematic review of randomized controlled trials. **Clinical Rehabilitation**, [s. l.], 2019.
- DEAL, D. N. et al. Ice reduces edema: A study of microvascular permeability in rats. **Journal of Bone and Joint Surgery - Series A**, [s. l.], v. 84, n. 9, p. 1573–1578, 2002.
- DELFINO, G. B. et al. Quadriceps Muscle Atrophy After Anterior Cruciate Ligament Transection Involves Increased mRNA Levels of Atrogin-1, Muscle Ring Finger 1, and Myostatin. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, [s. l.], v. 92, n. 5, p. 411–9, 2013.
- DELIGNE, C. et al. Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed

and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1843–1852, 2015.

DEMOULIN, C.; VANDERTHOMMEN, M. Cryotherapy in rheumatic diseases. **Joint, bone, spine : revue du rhumatisme**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 117–8, 2012.

DIAS, C. N. K. et al. Analysis of local and systemic TNF- α and IL1- β expression in the acute phase of knee osteoarthritis of rats. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 164-165, 2014.

DORWART, B. B.; HANSELL, J. R.; SCHUMACHER, H. R. Effects of cold and heat on urate crystal induced synovitis in the dog. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 563–571, 1974.

EGLOFF, C. et al. Effect of muscle weakness and joint inflammation on the onset and progression of osteoarthritis in the rabbit knee. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 22, n. 11, p. 1886–1893, 2014.

EGLOFF, C. et al. Joint instability leads to long-term alterations to knee synovium and osteoarthritis in a rabbit model. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 1054–1060, 2016.

FARRY, P. J. et al. Ice treatment of injured ligaments: An experimental model. **New Zealand Medical Journal**, [s. l.], v. 91, n. 651, p. 12–14, 1980.

FERNANDES, L. et al. EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 72, n. 7, p. 1125–35, 2013.

GLYN-JONES, S. et al. Osteoarthritis. **The Lancet**, [s. l.], v. 386, n. 9991, p. 376–387, 2015.

GUILLOT, X. et al. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. **Expert review of clinical immunology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 281–94, 2014. a.

GUILLOT, X. et al. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. **Expert Review of Clinical Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 281–294, 2014. b.

GUILLOT, X. et al. Local cryotherapy improves adjuvant-induced arthritis through down-regulation of IL-6 / IL-17 pathway but independently of TNF α . **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 7, 2017.

HAFEZI-NEJAD, N. et al. Long term use of analgesics and risk of osteoarthritis progressions

- and knee replacement: Propensity score matched cohort analysis of data from the Osteoarthritis Initiative. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 597–604, 2016.
- HAMILTON, C. B. et al. Weight-bearing asymmetry and vertical activity differences in a rat model of post-traumatic knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 1178–1185, 2015.
- HASHIMOTO, S. et al. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 1632–1638, 1998.
- HERRERA, E. et al. Motor and Sensory Nerve Conduction Are Affected Differently by Ice Pack, Ice Massage, and Cold Water Immersion. **Physical Therapy**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 581–591, 2010.
- HOCHBERG, M. C. et al. American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee. **Arthritis Care and Research**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 465–474, 2012.
- HONORATI, M. C. et al. Interleukin-17, a regulator of angiogenic factor release by synovial fibroblasts. **Osteoarthritis and cartilage**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 345–52, 2006.
- HULME, J. et al. Electromagnetic fields for the treatment of osteoarthritis (Review). **Cochrane database of systematic reviews Online**, Chichester, UK, n. 1, p. CD003523, 2009.
- JASTRZĄBEK, R. et al. Effects of different local cryotherapies on systemic levels of TNF- α , IL-6, and clinical parameters in active rheumatoid arthritis. **Rheumatology International**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 2053–2060, 2013.
- JAWAD, M. et al. Cryotherapy Treatment After Arthroscopic Knee Debridement and ACL Reconstruction: A Review. **Surgical technology international**, [s. l.], v. 30, p. 415–424, 2017.
- JIANG, S. N. W. Cryotherapy on postoperative rehabilitation of joint arthroplasty. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 3354–3361, 2015.
- KNIGHT, K. L. **Cryotherapy in Sport Injury Management**. [s.l: s.n.]. v. 1
- LOESER, R. F. et al. **Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ**, 2012.
- MA, B. et al. Effects of Whole-Body Cryotherapy in Comparison with Other Physical

- Modalities Used with Kinesitherapy in Rheumatoid Arthritis. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, 2015.
- MABEY, T.; HONSAWEK, S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. **World journal of orthopedics**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 95–105, 2015.
- MANDEGARAN, R.; CONWAY, C.; ELTON, C. Lower gastrointestinal adverse effects of NSAIDS: an extreme example of a common problem. **Case Reports**, [s. l.], v. 2013, n. feb201, p. bcr2012008274-bcr2012008274, 2013.
- MARTIMBIANCO, A. L. C. et al. Effectiveness and safety of cryotherapy after arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction. A systematic review of the literature. **Physical Therapy in Sport**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 261–268, 2014.
- MCERLAIN, D. D. et al. An in vivo investigation of the initiation and progression of subchondral cysts in a rodent model of secondary osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. R26, 2012.
- MENDIAS, C. L. et al. Changes in Circulating Biomarkers of Muscle Atrophy, Inflammation, and Cartilage Turnover in Patients Undergoing Anterior Cruciate Ligament Reconstruction and Rehabilitation. **The American Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1819–1826, 2013.
- NEOGI, T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis. **Osteoarthritis and cartilage**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 1145–53, 2013.
- NEOGI, T.; ZHANG, Y. Epidemiology of OA. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 1–19, 2013.
- NIELSEN, R. H. et al. Evaluation of cartilage damage by measuring collagen degradation products in joint extracts in a traumatic model of osteoarthritis. **Biomarkers**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 79–87, 2008.
- OLIVER, S. J.; BRAHN, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **The Journal of rheumatology. Supplement**, [s. l.], v. 44, p. 56–60, 1996.
- OOSTERVELD, F. G. J. et al. On the intraarticular and skin surface temperature of the knee. **Arthritis & Rheumatism** [s. l.], p. 146–151, [s.d.], 1992.
- OOSTERVELD, F. G. J.; RASKER, J. J. Effects of local heat and cold treatment on surface

and articular temperature of arthritic knees. **Arthritis & Rheumatism** [s. l.], v. 37, n. 11, p. 1578–1582, 1994. a.

OOSTERVELD, F. G. J.; RASKER, J. J. Treating arthritis with locally applied heat or cold. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 82–90, 1994. b.

PICKARSKI, M. et al. Molecular changes in articular cartilage and subchondral bone in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **BMC Musculoskeletal Disorders**. [s.l: s.n.], v. 12, p 197, 2011.

RUAN, M. Z. C. et al. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 1355–1364, 2013.

SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 249-257, 2012.

SEGAL, N. A.; GLASS, N. A. Is Quadriceps Muscle Weakness a Risk Factor for Incident or Progressive Knee Osteoarthritis? **The Physician and Sportsmedicine**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 44–50, 2011.

SHARMA, L. Osteoarthritis year in review 2015: clinical. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 36–48, 2016.

SIQUEIRA, A. F. et al. Multiple cryotherapy applications attenuate oxidative stress following skeletal muscle injury. **Redox Report**, [s. l.], p. 1–7, 2016.

SLUKA, K. A. et al. Reduction of pain-related behaviors with either cold or heat treatment in an animal model of acute arthritis. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 313–317, 1999.

STOOP, R. et al. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 308–315, 2001.

SWANN, D. A.; SLAYTER, H. S.; SILVER, F. H. The molecular structure of lubricating glycoprotein-I, the boundary lubricant for articular cartilage. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 256, n. 11, p. 5921–5925, 1981.

T.E., M. et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis.

Osteoarthritis and Cartilage, T.E. McAlindon, Department of Rheumatology, Tufts Medical Center, 800 Washington Street, Box 406, Boston, MA02111, United States, v. 22, n. 3, p. 363–388, 2014.

TSAI, H.-C. et al. Traumatic osteoarthritis-induced persistent mechanical hyperalgesia in a rat model of anterior cruciate ligament transection plus a medial meniscectomy. **Journal of Pain Research**, [s. l.], v. Volume 11, p. 41–50, 2017.

TSAI, P.-H. et al. Sequential Change in T2* Values of Cartilage, Meniscus, and Subchondral Bone Marrow in a Rat Model of Knee Osteoarthritis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. e76658, 2013.

VAN YPEREN, D. T. et al. Twenty-Year Follow-up Study Comparing Operative Versus Nonoperative Treatment of Anterior Cruciate Ligament Ruptures in High-Level Athletes. **The American Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1129–1136, 2018.

VIEIRA RAMOS, G. et al. Cryotherapy Reduces Inflammatory Response Without Altering Muscle Regeneration Process and Extracellular Matrix Remodeling of Rat Muscle. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, p. 18525, 2016.

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, [s.l.], v. 388, n. 10053, p. 1545-1602, 2016.

W., Z. et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. **Osteoarthritis and Cartilage**, G. Nuki, University of Edinburgh, Osteoarticular Research Group, The Queen's Medical Research Institute, 47 Little France Crescent, Edinburgh, EH16 4TJ, United Kingdom, v. 16, n. 2, p. 137–162, 2008.

WENHAM, C. Y. J.; CONAGHAN, P. G. The role of synovitis in osteoarthritis. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 349–59, 2010.

WENHAM, C. Y. J.; CONAGHAN, P. G. New horizons in osteoarthritis. **Age and Ageing**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 272–278, 2013.

WOOLF, A. D.; PFLEGER, B. **Burden of major musculoskeletal conditions**, 2003.

ZHANG, W. et al. Euler Evidence Based Recommendations for the Diagnosis of knee osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 483–9, 2010.

Estudo I**Crioterapia similar à utilizada na clínica melhora a descarga de peso entre as patas e reduz a inflamação sinovial de ratos com osteoartrite do joelho**

BARBOSA, G.M.; CUNHA, J.E.; CUNHA, T.M.; MARTINHO, L.B.; CASTRO, P.A.T.S.; OLIVEIRA, F.F.; CUNHA, F.; RAMALHO, F.S.; SALVINI, T.F.

Artigo em revisão no periódico *Scientific Reports* (Fator de impacto: 4,122)

Resumo

A crioterapia é um tratamento não farmacológico comumente usado para controlar a inflamação e melhorar a função após traumas agudos. Entretanto, não há achados definitivos sobre os seus efeitos nas doenças articulares crônicas, como a osteoartrite do joelho (OAJ). O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da crioterapia similar à utilizada na clínica sobre a função da marcha e a inflamação sinovial de ratos com OAJ induzida por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). Trinta e dois ratos *Wistar* machos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: Controle, OAJ (cirurgia de TLCA do joelho), OAJ + Crioterapia (cirurgia de TLCA do joelho e saco de gelo triturado) e OAJ + Placebo (cirurgia de TLCA do joelho e saco de areia). Sessenta dias após a cirurgia, os grupos OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo receberam suas respectivas intervenções duas vezes por dia, durante 20 minutos cada, por um período de cinco dias consecutivos (do 61º ao 65º dia). O teste de marcha, a temperatura da pele, o limiar de resposta térmica e o diâmetro do joelho foram avaliados em todos os grupos antes da cirurgia de TLCA, antes (60º dia) e após (66º dia) o período de intervenção. O líquido sinovial (contagem de leucócitos e níveis de citocinas) e a membrana sinovial (análise histopatológica) foram coletados no 66º dia. Após o período de intervenção (66º dia), apenas o grupo OAJ + Crioterapia aumentou a área de contato da pata ($p = 0,004$; 14%) em relação aos grupos OAJ e OAJ + Placebo, sem diferenças quando comparado ao grupo Controle. A crioterapia diminuiu o número de leucócitos ($p < 0,0001$; $\geq 95,0\%$) e os níveis de citocinas ($p < 0,0001$; $\geq 55\%$) no líquido sinovial em relação aos grupos OAJ e OAJ + Placebo. Não houve diferenças no escore sinovial e fibrose da membrana sinovial nos grupos OAJ. Concluímos que a crioterapia similar à utilizada na clínica melhora a descarga de peso entre as patas e reduz o número de leucócitos e citocinas inflamatórias no líquido sinovial de ratos com OAJ induzida por TLCA.

Palavras-chave: Doenças Reumáticas. Sinovite. Modalidades de Fisioterapia. Terapia com Gelo. Reabilitação.

Introdução

A osteoartrite do joelho (OAJ), condição articular degenerativa mais frequente em adultos e idosos, é considerada uma das principais causas de dor e incapacidade funcional (LITWIC et al., 2013; VOS et al., 2012, 2016). Uma série de fatores de risco está associada à OAJ (NEOGI; ZHANG, 2013). Sabe-se que a ruptura ou a reconstrução do ligamento cruzado anterior aumentam a probabilidade de progressão da OAJ (AJUIED et al., 2014). Modelos animais de instabilidade tibiofemoral, como a transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA), têm sido utilizados, por induzirem alterações similares à OAJ pós-traumática e crônica em humanos (KAPOOR et al., 2011; STOOP et al., 2001). Um estudo recente mostrou que a OAJ induzida por TLCA em ratos promove remodelação e atrofia da junção neuromuscular nos músculos quadríceps e tibial anterior, associada a sinais inflamatórios, alterações na marcha e alterações na expressão muscular gênica e proteica (CUNHA et al., 2019). Alterações bioquímicas e biomecânicas pós-traumáticas alteram o padrão metabólico dos condrócitos, que ativam respostas adaptativas, incluindo citocinas pró-inflamatórias (CUNHA et al., 2019; KAPOOR et al., 2011). Dentre essas citocinas, a interleucina (IL)-1 β , a IL-6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α destacam-se na fisiopatologia da OAJ, devido aos seus efeitos catabólicos e destrutivos na articulação (MABEY; HONSAWEK, 2015). Essas alterações são progressivas e frequentemente identificadas por sinais radiográficos e sintomatológicos (MABEY; HONSAWEK, 2015; RUANO; SITLER; DRIBAN, 2017).

O controle de citocinas pró-inflamatórias tem sido considerado uma abordagem terapêutica farmacológica no tratamento da OAJ (MALEMUD, 2010). Entretanto, assim como outras terapias farmacológicas, as drogas anticitocinas apresentam potencial efeito iatrogênico, favorecendo a busca por tratamentos complementares (FERNANDES et al., 2013). A crioterapia é um recurso não farmacológico, utilizado para controlar a inflamação e melhorar a condição clínica após traumas musculoesqueléticos agudos (BROSSEAU et al., 2003; DEMOULIN; VANDERTHOMMEN, 2012). Além disso, é de baixo custo, relativamente seguro e de fácil de uso (KNIGHT, 1995). No entanto, embora existam fortes evidências de seus efeitos benéficos no controle da dor e da inflamação após traumas agudos, pouco se sabe sobre o seu impacto na lesão articular crônica (BROSSEAU et al., 2003). Uma revisão recente mostrou que, embora algumas diretrizes clínicas recomendem a crioterapia para o manejo dos sintomas da OAJ, não há evidências suficientes sobre seu uso para essa população (DANTAS et al., 2019). Poucos estudos animais investigaram essa questão, com protocolos heterogêneos

(agentes físicos utilizados, tempo de aplicação e periodicidade), focados principalmente nas respostas imediatas da crioterapia em modelos animais de artrite do joelho (BOCOBO et al., 1991; DORWART; HANSELL; SCHUMACHER, 1974a; FARRY; BEALE; MACBETH, 1970; OOSTERVELD; RASKER, 1994b; SLUKA et al., 1999). Mais recentemente, foi demonstrado que a crioterapia local aplicada por 14 dias consecutivos tem efeito anti-inflamatório local e sistemático na artrite induzida por adjuvante, especialmente por meio da inibição da via IL-6/IL-17, independente do TNF- α (GUILLOT et al., 2017). Embora esse seja um achado relevante, o estudo foi realizado em modelo animal de artrite reumatoide, com efeitos imunológicos potencialmente destrutivos nas articulações (OLIVER; BRAHN, 1996), além de o protocolo de crioterapia não ter seguido as recomendações clínicas para condições musculoesqueléticas (BLEAKLEY et al., 2007; DANTAS et al., 2019). Não encontramos estudos prévios que avaliassem o efeito da crioterapia em modelo animal de OAJ com características similares às observadas em humanos. Um possível efeito benéfico da crioterapia no controle da inflamação crônica da OAJ em modelo animal poderia fornecer novas evidências científicas que fundamentassem o seu uso clínico. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da crioterapia similar à utilizada na clínica sobre a função da marcha e a inflamação sinovial de ratos com OAJ induzida por TLCA. Nossa hipótese foi de que a crioterapia melhoraria a função da marcha e reduziria os sinais inflamatórios dos animais.

Materiais e métodos

O protocolo experimental foi de acordo com o *National Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996). O Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos aprovou os procedimentos experimentais (número 7949291116/2017), e o estudo foi conduzido por profissionais capacitados, cegos para a identificação dos grupos experimentais. Um cálculo amostral a priori foi realizado usando o *G*Power* (versão 3.1; University of Trier, Trier, Alemanha) (BECK, 2013). Com base em um estudo piloto previamente realizado ($n = 10$), adotou-se $\alpha = 0,05$, poder $(1-\beta) = 0,95$, coeficiente de correlação $= 0,5$ e tamanho do efeito $= 0,37$. O teste de marcha e a migração de leucócitos foram utilizados para o cálculo. Para tanto, estimou-se que um total de 32 animais (oito por grupo) seria um tamanho amostral adequado.

Desenho experimental

Ratos *Wistar* machos com dois meses de idade (*Rattus norvegicus*, $n = 32$; 297 ± 25 g) foram estudados. Os animais foram alojados em condições isentas de patógenos a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (três por gaiola), sob um ciclo de luz reversa (12/12 claro/escuro), com livre acesso a ração padrão de rato e água. Um programa de computador (www.random.org) foi usado para dividir aleatoriamente os animais em quatro grupos ($n = 8$ por grupo): Controle (composto por animais *naive*, sem cirurgia ou intervenção); cirurgia de TLCA do joelho direito (OAJ, grupo não tratado); cirurgia de TLCA do joelho direito, submetido ao uso de sacos de gelo (OAJ + Crioterapia); e cirurgia de TLCA do joelho direito, submetido ao uso de sacos de areia (OAJ + Placebo). Os grupos foram analisados um dia antes e 60 dias após a cirurgia de TLCA, do teste menos estressante para o mais estressante: temperatura da pele, teste da marcha, limiar de resposta térmica e diâmetro articular do joelho. Em seguida, os grupos OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo foram submetidos às intervenções (bolsa de gelo ou areia) duas vezes ao dia, por 20 minutos cada, durante cinco dias consecutivos (do 61° ao 65° dia). Os quatro grupos foram, então, avaliados no 66° dia e, após a eutanásia, o líquido sinovial e a membrana sinovial foram coletados (Figura 1).

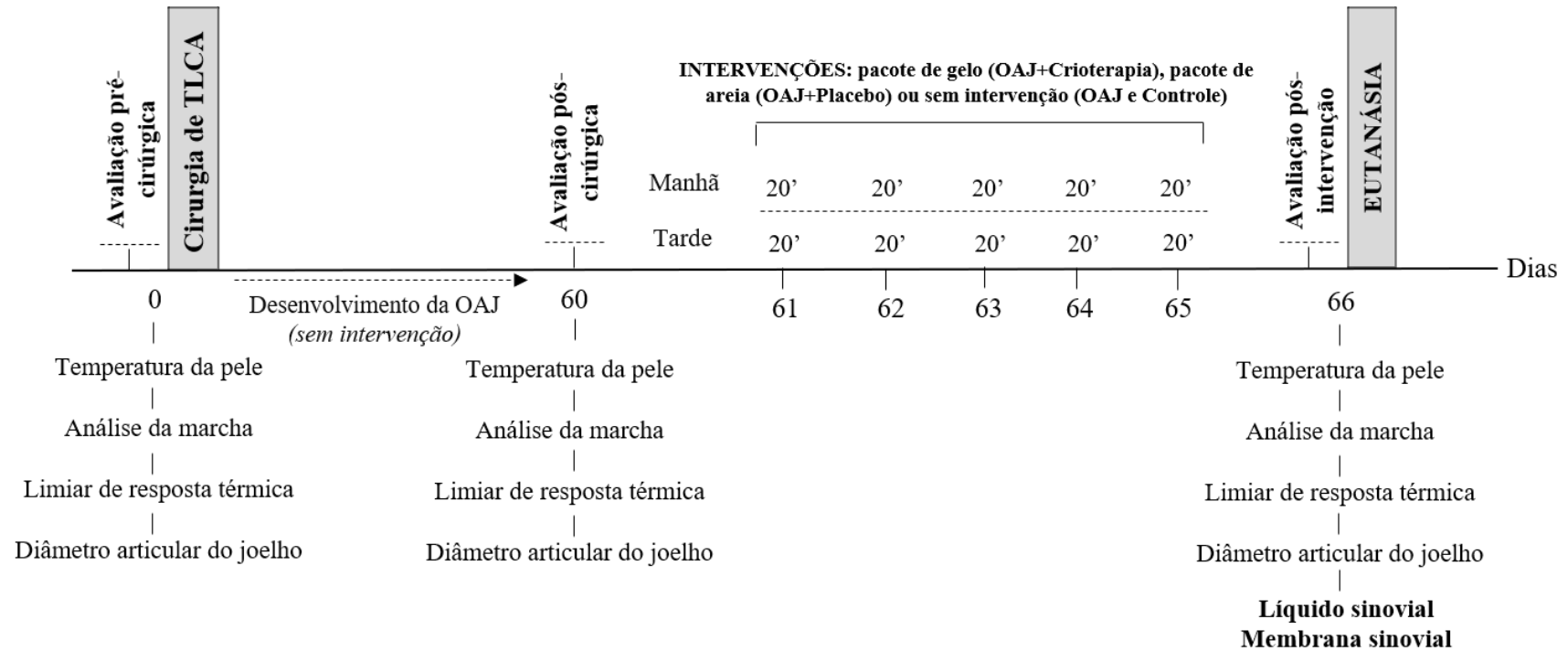


Figura 1. Procedimentos experimentais. Os animais de ambos os grupos receberam duas intervenções de 20 minutos por dia, uma pela manhã e outra à tarde. OAJ: osteoartrite do joelho; OAJ+Crioterapia: cirurgia de TLCA do joelho direito, submetido ao uso de sacos de gelo; OAJ+Placebo: cirurgia de TLCA do joelho direito, submetido ao uso de sacos de areia.

Indução da OAJ

Utilizamos um modelo adaptado de OAJ induzida por TLCA que causa alterações articulares em ratos semelhantes às observadas em humanos (STOOP et al., 2001). Resumidamente, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (12 mg/kg de xilazina e 95 mg/kg de cetamina), e foi realizada tricotomia digital e assepsia com iodo ao redor do joelho direito. Com o animal em posição supina, foi feita uma incisão longitudinal parapatelar medial de aproximadamente 1 cm, seguida da exposição do tendão patelar. Tanto a lesão da cápsula articular quanto a TLCA foram realizadas com uma tesoura cirúrgica do tipo oftálmica. O teste da gaveta anterior (livre deslocamento da tíbia em relação ao fêmur no sentido pósterio-anterior) foi realizado para confirmar a TLCA. Após a sutura da pele, os animais foram retornados às gaiolas, e paracetamol (13,5mg/100ml) foi adicionado à água de beber nas primeiras 48 horas como analgesia pós-operatória. Nesse modelo, descrevemos previamente um escore histológico de *Mankin* mais elevado no grupo OAJ (60 dias após a TLCA) quando comparado aos controles (animais *naive* de mesma idade) (CUNHA et al., 2019).

Teste de marcha

A análise da marcha foi conduzida utilizando-se o teste de impressão da pata, como previamente realizado em modelo animal de TLCA (RUAN et al., 2013). As patas traseiras dos ratos foram marcadas com tinta comercial não tóxica (guache, Faber-Castell, São Carlos, São Paulo). Em seguida, os animais foram colocados para caminhar sobre um corredor de madeira de 60 cm de comprimento e 7 cm de largura, coberto com papel branco. Uma câmara escura foi colocada no final da pista para atrair os animais. Após a conclusão do teste, o papel contendo as marcações das patas foi digitalizado a 300 dpi. A medida em torno da pata direita foi definida como a área da pata (pixels); a distância entre o primeiro e o quinto dedo, como largura da pata (cm); a distância entre dois passos da pata traseira, como comprimento da passada (cm); a distância horizontal entre a pata esquerda e a direita, como a base (cm); a distância entre o terceiro dedo do pé e o calcanhar, como o comprimento da pata (cm); e o ângulo da pata, como o ângulo entre o quinto dedo e o calcâneo e uma linha horizontal (°).

Temperatura da pele do joelho

De acordo com os critérios para aquisição de imagens termográficas, os animais foram aclimatados em um quarto escuro (15 minutos; 23°C ± 1) (COSTELLO et al., 2012). A termografia foi utilizada para medir a temperatura da pele do joelho direito em todos os grupos, utilizando-se uma câmera térmica infravermelha FLIR T420 (FLIR Systems®, EUA), acoplada

a um tripé colocado a 50 cm do joelho do animal. As imagens foram analisadas no software *FLIR Tools*, e os resultados, expressos em °C. Um estudo piloto (n = 8 ratos) foi realizado para determinar o resfriamento da pele no grupo OAJ + Crioterapia imediatamente após uma única sessão. A temperatura da pele do joelho reduziu em média $26,8 \pm 0,4$ °C (de $36,9 \pm 0,7$ °C para $10,1 \pm 1,5$ °C).

Diâmetro articular do joelho

O diâmetro da articulação do joelho foi medido com os animais na posição supina sob anestesia (2 ml/mlO₂; isoflurano 1,5%) (QUADROS et al., 2015), utilizando-se um paquímetro digital (Fisher Scientific, 150mm, EUA) posicionado nos côndilos femorais medial e lateral, no nível de interlinha articular do joelho (CUNHA et al., 2019). A média de duas medidas foi utilizada, e os dados foram expressos em milímetros (mm).

Limiar de resposta térmica

Os animais foram colocados sobre uma placa quente (Insight® Equipamentos Ltda, Brasil) a 52°C (51,8°C–52,4°C) (DE ANDRADE et al., 2017). O período de latência para a resposta da pata (salto, tremor ou lambida) foi considerado o tempo de resposta (segundos), em uma única repetição. O tempo máximo que o animal pôde permanecer sobre a placa quente foi de 25 segundos.

Confiabilidade das medidas

O coeficiente de correlação intraclasse (CCI_{1,2}) e o erro padrão de medida (EPM) foram testados para a análise termográfica (A) e o edema articular (B) em oito ratos dias antes da TLCA. Os ratos foram reavaliados 48 horas após a primeira avaliação. Ambas as variáveis apresentaram excelente confiabilidade: A) CCI = 0,92, EPM = 0,20° C; B) CCI = 0,94; EPM = 0,28 mm.

Intervenções de crioterapia e placebo

Intervenções nos grupos OAJ + Crioterapia (pacote de 20g de gelo triturado) e OAJ + Placebo (pacote de 20g de areia) foram realizadas no laboratório duas vezes ao dia, com aproximadamente 4 horas de intervalo entre as sessões. Cada intervenção durou 20 minutos (DANTAS et al., 2019) e foi aplicada sob anestesia (2 ml/mlO₂; 1,5% isoflurano) (QUADROS et al., 2015), com os animais em decúbito dorsal e a pata elevada (quadril $\pm 45^\circ$). Os pacotes de gelo e de areia foram colocados ao redor do joelho, usando-se um elástico para compressão.

O protocolo de crioterapia seguiu as recomendações clínicas para o manejo das lesões musculoesqueléticas de acordo com o protocolo PRICE (Proteção, Repouso, Gelo, Compressão e Elevação) (BLEAKLEY et al., 2007). Apesar da ausência de intervenção nos grupos Controle e OAJ, todos os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos de anestesia utilizados nos grupos de intervenção.

Coleta do líquido sinovial

Os animais foram anestesiados (240 mg/kg de cetamina e 60 mg/kg de xilazina; i.p.) e exsanguinados (CHAVES et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2015). Este último procedimento foi realizado para minimizar a possibilidade de contaminação de sangue no líquido sinovial. A pele e os ligamentos da articulação do joelho direito foram removidos, e a cavidade sinovial foi lavada duas vezes com 200µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Este fluido de lavagem articular foi utilizado para contagem de células, contagem diferencial de leucócitos e determinação do nível de citocinas (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Migração de leucócitos

A migração dos leucócitos foi determinada utilizando-se o líquido sinovial, como descrito anteriormente (PINTO et al., 2015). As cavidades articulares foram lavadas duas vezes com 5 µL de PBS contendo 1 mM de EDTA, e depois diluídas em um volume final de 50 µL com PBS/EDTA, para avaliar a migração de leucócitos no tempo estabelecido. Os leucócitos foram contabilizados em uma câmara de *Neubauer* diluída em solução de *Turk*. Os resultados foram expressos como o número de leucócitos por cavidade articular.

Contagem diferencial de leucócitos

Após a retirada de alíquotas para contagem total do número de leucócitos, o lavado articular foi centrifugado (1.500 rpm, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi estocado a -80°C para posterior análise (determinação de citocinas), e o *pellet* celular foi ressuspenso em 200µL de solução de PBS e EDTA. Em seguida, as lâminas para contagem diferencial foram preparadas por centrifugação (1.500 rpm, 10 minutos) de uma alíquota do lavado articular (50 mL). As lâminas foram, então, montadas, fixadas por 4 minutos e coradas com eosina (30 segundos) e hematoxilina (20 segundos). Em seguida, foram lavadas em água corrente e colocadas para secagem (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Posteriormente, procedeu-se à contagem diferencial das células do exsudato articular. As células foram examinadas em microscópio óptico com objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x). Foram, então, contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se os tipos celulares em macrófagos, linfócitos e neutrófilos. A contagem de células do lavado articular foi obtida calculando-se a porcentagem de cada tipo de célula (contagem diferencial) e o número de leucócitos totais presentes no lavado articular (DE OLIVEIRA et al., 2015). Os resultados foram expressos como número de células x $10^3/\text{ml}$.

Determinação dos níveis de citocinas

As concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 e IL-10 foram determinadas utilizando-se um ensaio imunoenzimático (ELISA) comercialmente disponível, seguindo as recomendações do fabricante (kits Duo-Set, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A densidade óptica das amostras individuais foi medida a 450 nm, utilizando-se um espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram expressos como a média \pm DP dos níveis de citocinas em pg/mg de líquido articular (BASSI et al., 2016; VERAS et al., 2015).

Avaliação histopatológica da sinovite

Amostras de cápsulas articulares foram fixadas em formalina tamponada a 4% (vol/vol), desidratadas em etanol e embebidas em parafina para preparação das lâminas. As secções teciduais foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para se analisar a sinovite (influxo de células inflamatórias e hiperplasia sinovial). A gravidade da patologia sinovial (isto é, sinovite) foi determinada utilizando-se um sistema de pontuação que mede a espessura da camada de células sinoviais numa escala de 0–3 (0 = 1–2 células, 1 = 2–4 células, 2 = 4–9 células e 3 = 10 ou mais células) e a densidade celular no estroma sinovial numa escala de 0–3 (0 = celularidade normal, 1 = celularidade levemente aumentada, 2 = celularidade moderadamente aumentada e 3 = aumento acentuado de celularidade) (LEWIS et al., 2011). Lâminas adicionais foram coradas usando-se o protocolo de coloração *Sirius Red* para avaliar a fibrose articular. A deposição de colágeno sob a membrana sinovial foi medida como a área de coloração Vermelho-Sirius positiva em 15 campos aleatórios de alta potência (ampliação de 400x) utilizando-se o software *Image J* (Image J, 1.33u, USA). Os resultados foram expressos como uma porcentagem da área positiva para colágeno.

Análise estatística

As análises foram realizadas no software *Statistical Package for the Social Sciences* 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). A homogeneidade das variâncias e a normalidade da distribuição foram verificadas usando-se os testes de *Levene* e *Shapiro-Wilk*, respectivamente. A ANOVA *two-way* foi realizada para o teste da marcha, temperatura da pele, diâmetro articular do joelho e limiar de resposta térmica, sendo avaliada a interação grupo (Controle, OAJ, OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo) x tempo (dias 0, 60 e 66). ANOVA *one-way* foi realizada para comparar, entre os grupos, a contagem total e diferencial de leucócitos, os níveis de citocinas e a fibrose articular. Quando necessário, foi realizado o teste *post hoc* de *Tukey* [$\alpha = 5\%$ e intervalo de confiança (IC) de 95%]. O escore de sinovite não apresentou distribuição normal, e foi analisado por meio de testes não paramétricos. O teste de *Kruskal-Wallis* foi usado para avaliar a sinovite entre os grupos, e o teste de *Mann-Whitney* foi usado para identificar as diferenças entre os grupos se os resultados de *Kruskal-Wallis* indicassem diferenças significativas. Para todas as comparações não paramétricas entre os grupos utilizando o teste de *Mann-Whitney*, o nível alfa foi ajustado de acordo com o número de comparações (Controle x OAJ, Controle x OAJ + Crioterapia, Controle x OAJ + Placebo, OAJ x OAJ + Crioterapia, OAJ x OAJ + Placebo, OAJ + Crioterapia x OAJ + Placebo) ou $\alpha = 0,05/6 = 0,008$. Assim, um valor de $p < 0,008$ foi considerado como diferença estatisticamente significante.

Resultados

Análise da marcha

No 60° dia após a TLCA, os grupos OAJ, OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo apresentaram área de pegada da pata menor em comparação ao grupo Controle [diferença média: -4478 pixels (-16,3%), IC 95%: -6831, -2124, $p < 0,0001$; diferença média: -3445 pixels (-12,5%), IC 95%: -5798, -1092, $p = 0,002$; diferença média: -4280 pixels (-15,6%), IC 95%: -6633, -1926, $p < 0,0001$, respectivamente]. Entre os grupos OAJ, apenas o grupo Crioterapia aumentou sua área de pegada da pata [OAJ, diferença média: 3936 pixels (15%), IC 95%: 1021, 6850, $p = 0,004$; OAJ + Placebo, diferença média: 3779 pixels (14%), IC 95%: 864, 6694, $p = 0,006$] após intervenções, sem alterações em relação aos controles [(IC 95%: -2671, 3158; $p > 0,05$); Figura 2A]. Para estimar que o equilíbrio de descarga de peso entre ambas as patas foi independente do tamanho do animal e da velocidade de caminhada, normalizou-se os dados em relação ao membro contralateral [tamanho (em pixels) da área de pegada da pata esquerda menos a direita]. No 60° dia após a TLCA, os grupos OAJ mostraram maior descarga de peso

na pata esquerda (não afetada) quando comparados aos controles [OAJ, diferença média: 4284 pixels (96,2%), IC 95%: 3114, 5796; $p < 0,001$; OAJ + Crioterapia, diferença média: 3915 pixels (95,8%), IC 95%: 1367, 6803; $p = 0,02$; OAJ + Placebo, diferença média: 5606 pixels (97,0%), IC 95%: 8264, 3064, $p < 0,001$]. Entre os grupos OAJ, apenas o grupo Crioterapia caminhou com maior simetria de descarga de peso entre as patas no 66º dia [OAJ, diferença média: 2972 (96,7%); IC 95%: 180, 6329; $p = 0,04$; OAJ + Placebo, diferença média: 6712 (98,5%), IC 95%: 4071, 9559; $p < 0,001$), sem diferenças em relação aos controles (IC 95%: -1967, 1384; $p > 0,05$; Figura 2B). Não houve alterações nas demais variáveis relacionadas à análise da marcha (Figura 2C-G).

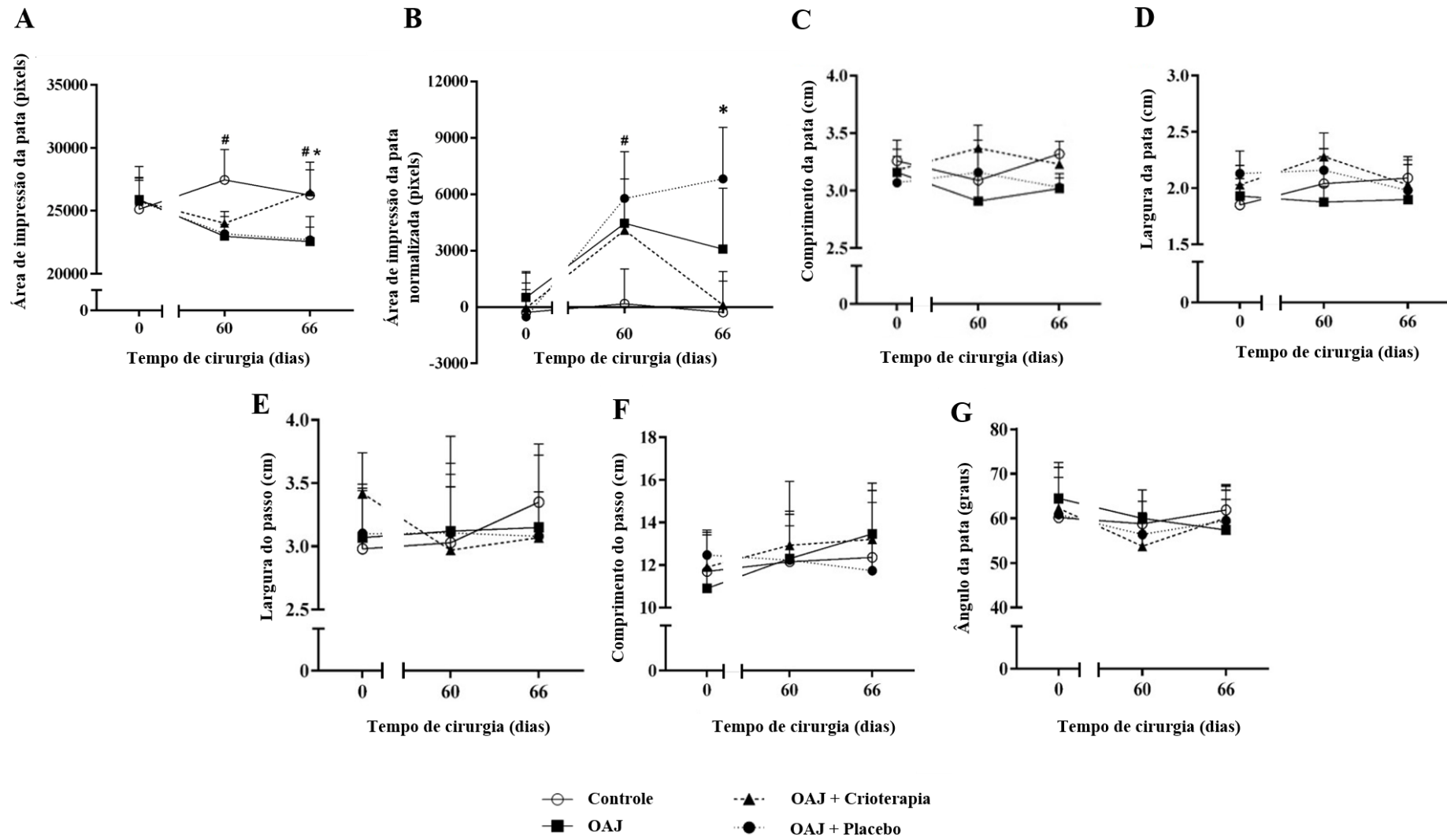


Figura 2. Área de impressão da pata (A); área de impressão da pata normalizada (B); comprimento da pata (C); largura da pata (D); largura do passo (E); comprimento do passo (F); e ângulo da pata (G) no início (0 dia), pré (60° dia) e pós (66° dia) protocolo de intervenção em todos os grupos. OAJ: osteoartrite do joelho; OAJ+Crioterapia: cirurgia de TLCA do joelho direito, submetido ao uso de sacos de gelo; OAJ+Placebo: cirurgia de TLCA do joelho direito, submetido ao uso de sacos de areia. # $p < 0,01$: grupo Controle *versus* grupos OAJ, OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo; * $p < 0,05$: ambos os grupos Controle e OAJ + Crioterapia *versus* grupos OAJ e OAJ + Placebo.

Limiar de resposta térmica

Não houve diferenças entre os grupos no limiar de resposta térmica ($p = 0,184$; Figura 3A).

Temperatura da pele do joelho

No 60° dia, a temperatura da pele foi maior nos grupos OAJ quando comparados ao grupo Controle (OAJ, diferença média: $1,5^\circ$, IC 95%: -2,4, -0,6; OAJ + Crioterapia, diferença média: $1,5^\circ\text{C}$, IC 95%: -2,4, -0,6; OAJ + Placebo, diferença média: $1,6^\circ\text{C}$, IC 95%: -2,5, -0,7, $p < 0,0001$). Essas diferenças continuaram no 66° dia, independentemente da intervenção [(OAJ, diferença média: $1,9^\circ\text{C}$, IC 95%: -2,8, -1,1; OAJ + Crioterapia, diferença média: $2,0^\circ\text{C}$, IC 95%: -2,9, -1,2; OAJ + Placebo, diferença média: $1,8^\circ\text{C}$, IC 95%: -2,7, -0,9, $p < 0,0001$); Figura 3B].

Diâmetro articular do joelho

No 60° dia, o diâmetro articular do joelho estava maior nos grupos OAJ quando comparados ao grupo Controle (OAJ, diferença média: 1,4mm, IC 95%: -2,0, -0,9; OAJ + Crioterapia, diferença média: 1,3mm, IC 95%: -1,8, -0,8; OAJ + Placebo, diferença média: 1,1 mm, IC 95%: -1,6, -0,6, $p < 0,0001$). Essas diferenças permaneceram inalteradas no 66° dia, independentemente da intervenção [(OAJ, diferença média: 1,4mm, IC 95%: -1,9, -0,9; OAJ + Crioterapia, diferença média: 1,3mm, IC 95%: -1,8, -0,8; OAJ + Placebo, diferença média: 1,1 mm, IC 95%: -1,8, -0,7; $p < 0,0001$); Figura 3C].

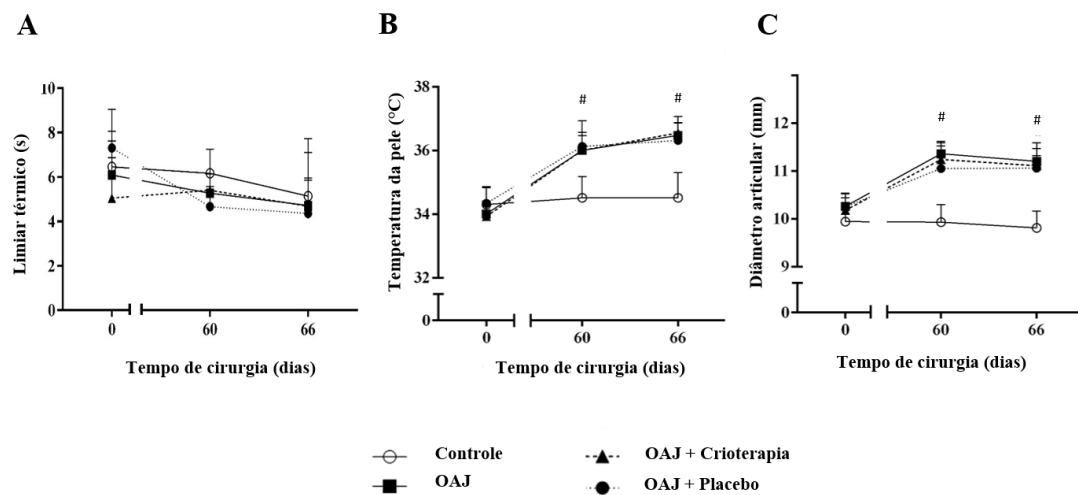


Figura 3. Limiar de resposta térmica (A); temperatura da pele (B); e edema articular do joelho (C) no início (0 dia), pré (60º dia) e pós (66º dia) protocolo de intervenção em todos os grupos. OAJ: osteoartrite do joelho; OAJ+Crioterapia: cirurgia de TLCA do joelho direito, submetido ao uso de sacos de gelo; OAJ+Placebo: cirurgia de TLCA do joelho direito, submetido ao uso de sacos de areia. # $p < 0,01$: grupo Controle *versus* grupos OAJ, OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo.

Migração de leucócitos para o líquido sinovial

Houve uma redução significativa do número de leucócitos no grupo OAJ + Crioterapia em comparação com os grupos OAJ [diferença média: $-0,65 \times 10^3/\text{ml}$ (-95,0%), IC 95%: -1,01, -0,29, $p < 0,0001$] e OAJ + Placebo [diferença média: $-1,05 \times 10^3/\text{ml}$ (-97,0%), IC 95%: -1,41, -0,69, $p < 0,0001$], mas sem diferenças em relação ao grupo Controle [(IC 95%: -0,34, 0,38, $p = 0,99$); Figura 4]. Os grupos OAJ e OAJ + Placebo continuam mais leucócitos em relação ao grupo Controle [diferença média: $0,67 \times 10^3/\text{ml}$ (99,1%), IC 95%: 0,31, 1,03, $p < 0,0001$; diferença média: $1,07 \times 10^3/\text{ml}$ (99,5%), IC 95%: 0,70, 1,43, $p < 0,0001$, respectivamente]. O número de leucócitos foi 43,1% maior no grupo OAJ + Placebo quando comparado ao grupo OAJ [(diferença média: $0,39 \times 10^3/\text{ml}$, IC 95%: 0,03, 0,76, $p = 0,028$); Figura 4A].

A contagem diferencial de leucócitos (Figura 4B-D) mostrou um declínio significativo no número de células no grupo OAJ + Crioterapia quando comparado ao grupo OAJ [macrófagos, diferença média: $-23,07 \times 10^3/\text{ml}$ (-94,0%), IC 95%: -33,19, -12,95, $p < 0,0001$; neutrófilos, diferença média: $-2,53 \times 10^3/\text{ml}$ (-99,3%), IC 95%: -4,45, -0,62, $p = 0,008$; linfócitos, diferença média: $-6,34 \times 10^3/\text{ml}$ (-97,1%), IC 95%: -11,67, -1,01, $p = 0,02$] e OAJ + Placebo [macrófagos, diferença média: $-30,87 \times 10^3/\text{ml}$ (-95,0%), IC 95%: -40,41, -21,33,

$p < 0,0001$; neutrófilos, diferença média: $-1,82 \times 10^3/\text{ml}$ (-99,0%), IC 95%: -3,55, -0,09, $p = 0,039$; linfócitos, diferença média: $-10,02 \times 10^3/\text{ml}$ (-98,1%), IC 95%: -15,34, -4,68, $p = 0,001$].

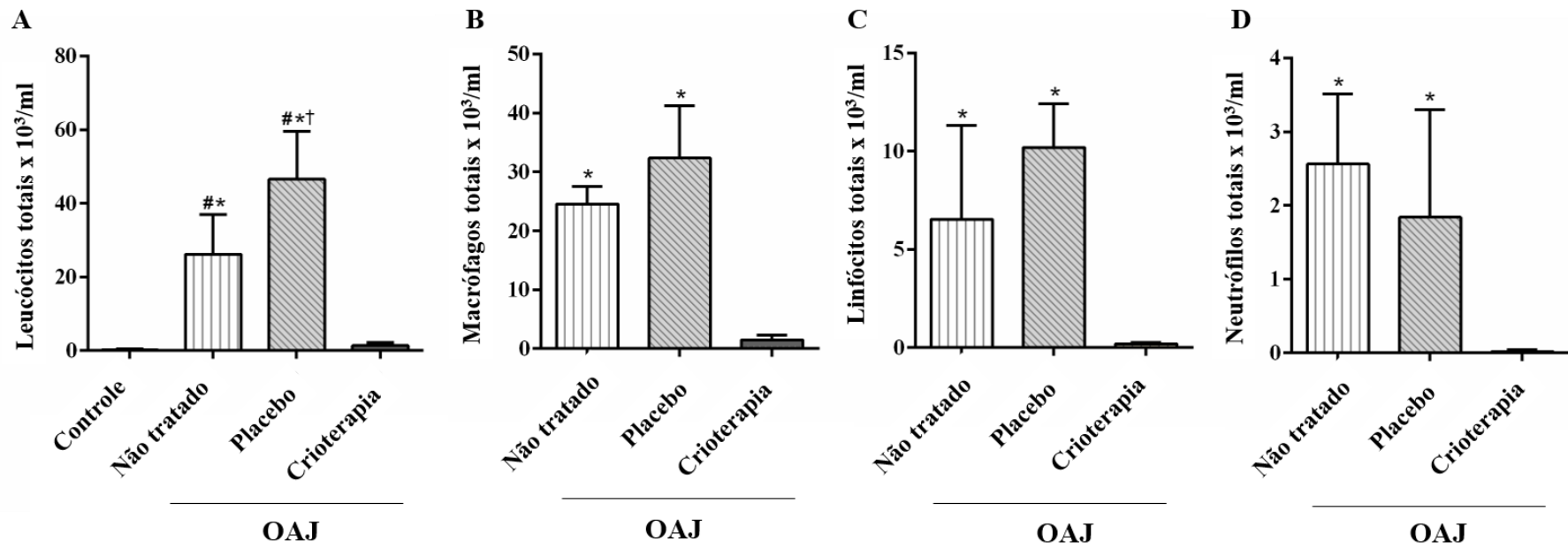


Figura 4. Número de células no líquido sinovial do joelho. Número total de leucócitos (A) e contagem diferencial de macrófagos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D). OAJ: osteoartrite do joelho. # $p < 0,05$ vs. grupo Controle; † $p < 0,05$ vs. grupo OAJ; * $p < 0,05$ vs. grupo OAJ + Crioterapia.

Citocinas do líquido sinovial da articulação do joelho

O grupo OAJ + Crioterapia continha uma menor concentração de citocinas em comparação com o grupo OAJ [IL-1 β , diferença média: -55,70 pg/ml (-65,3%), IC 95% : -73,84, -37,48; TNF- α , diferença média: -28,65 pg/ml (-70,0%), IC 95%: -41,13, -16,17; IL-6, diferença média: -11,02 pg/ml (-70,7%), IC 95%: -14,46, -7,59; IL-17, diferença média: -62,51 pg/ml (-61,9%), IC 95%: -77,14, -47,88; IL-10, diferença média: -19,34 pg/ml (-68,9%), IC 95%: -26,42, -12,26; p < 0,0001] e os grupos OAJ + Placebo [IL-1 β , diferença média: -46,8 pg/ml (-61,3%), IC 95%: -64,9, -28,6; TNF- α , diferença média: -26,8 pg/ml (-68,6%), IC 95%: -39,3, -14,4; IL-6, diferença média: -7,6 pg/ml (-62,5%), IC 95%: -11,0, -4,2; IL-17, diferença média: -48,5 (-55,9%), IC 95%: -63,1, -33,9; IL-10, diferença média: -15,1 (-63,4%), IC 95%: -22,1, -7,9; p < 0,0001, Figura 5]. O grupo OAJ + Crioterapia também apresentou concentrações mais baixas de IL-6 [diferença média: -11,0 pg/ml (-48,7%), IC 95%: -14,5, -7,6; p < 0,0001], IL-17 [diferença média: -48,5 pg/ml (-36,6%), IC 95%: -63,8, -33,3; p < 0,0001] e IL-10 [diferença média: -15,1 pg/ml (-61,4%), IC 95%: -22,1, -7,9; p < 0,0001] comparado ao grupo Controle (Figura 5C-E). O grupo OAJ exibiu uma concentração maior de IL-1 β [diferença média: 44,21 pg/ml (51,9%), IC 95%: 26,7, 61,7; p < 0,0001], TNF- α [diferença média: 17,1 pg/ml (41,7%), IC 95%: 4,6, 29,5; p = 0,005] e IL-17 [diferença média: 40,5 pg/ml (60,1%), IC 95%: 25,8, 55,1; p < 0,0001] comparado ao grupo Controle (Figura 5 A, B, D). O grupo OAJ + Placebo apresentou maior concentração de citocinas [IL-1 β , diferença média: 35,3 pg/ml (46,3%), IC 95%: 17,9, 52,8, p < 0,0001; TNF- α , diferença média: 15,2 pg/ml (38,9%), IC 95%: 2,7, 27,7, p = 0,01; IL-17, diferença média: 26,5 pg/ml (30,55%), IC 95%: 11,8, 41,1, p < 0,0001] comparado ao grupo Controle (Figura 5 A, B, D).

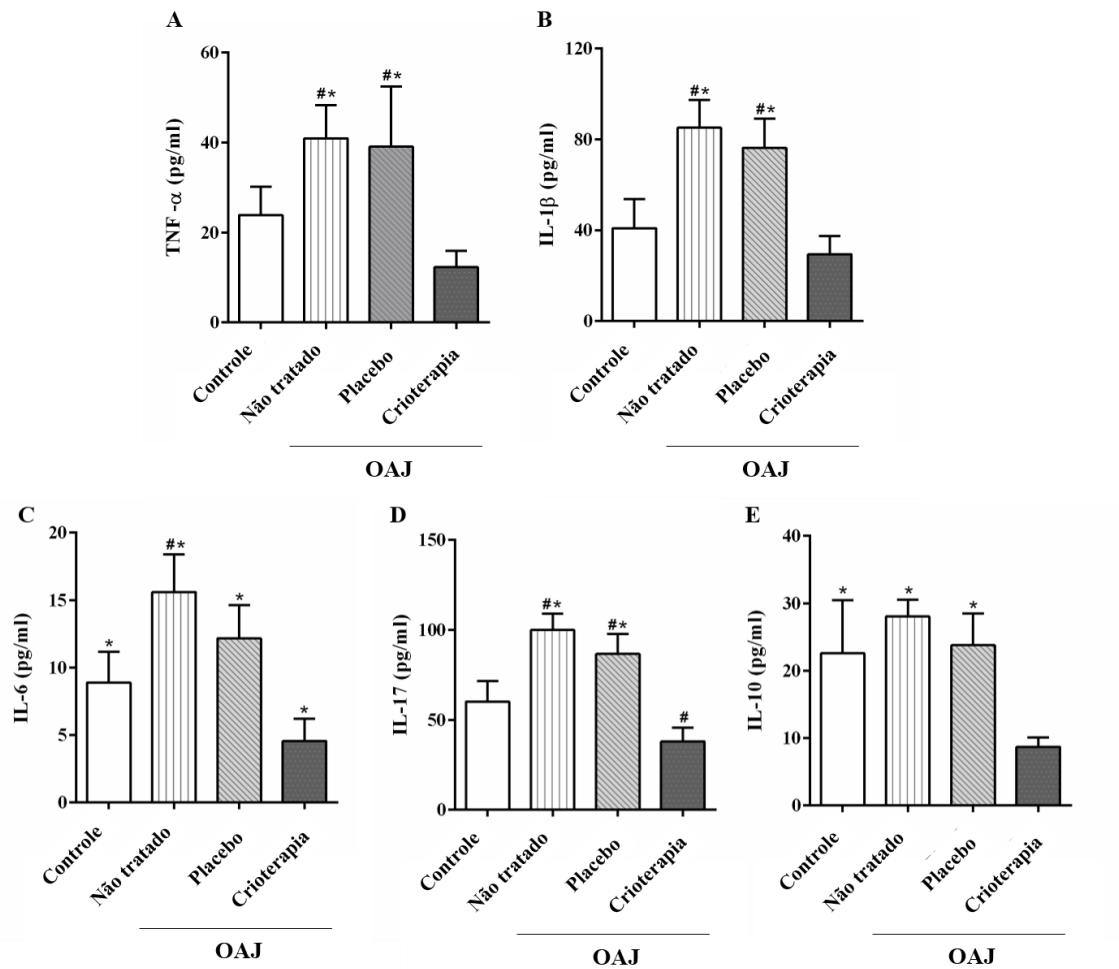


Figura 5. Concentração de citocinas no líquido sinovial do joelho. (A) TNF- α ; (B) IL-1 β ; (C) IL-6; (D) IL-17; e (E) IL-10. # $p < 0,05$ vs. grupo Controle. OAJ: osteoartrite do joelho. * $p < 0,05$ vs. grupo OAJ + Crioterapia.

Avaliação histopatológica da sinovite

Não houve alteração na membrana sinovial dos grupos OAJ ($p = 0,017$), OAJ + Placebo ($p = 0,115$) e OAJ + Crioterapia ($p = 0,013$) em comparação com o grupo Controle (Figura 5A e B). Em relação à fibrose da membrana sinovial (Figura 6A e C), os grupos OAJ apresentaram uma grande quantidade de colágeno em relação ao grupo Controle [OAJ, diferença média: -28,0%, IC 95%: -39,5, -16,6; $p \leq 0,0001$; OAJ + Placebo, diferença média: -16,1%, IC 95%: -28,4, -3,7; $p = 0,01$; OAJ + Crioterapia, diferença média: -18,5%, IC 95%: -29,9, -7,1; $p = 0,02$].

Além disso, não houve diferença na sinovite ou no escore de fibrose entre os grupos OAJ (Figura 6B e C; $p > 0,05$).

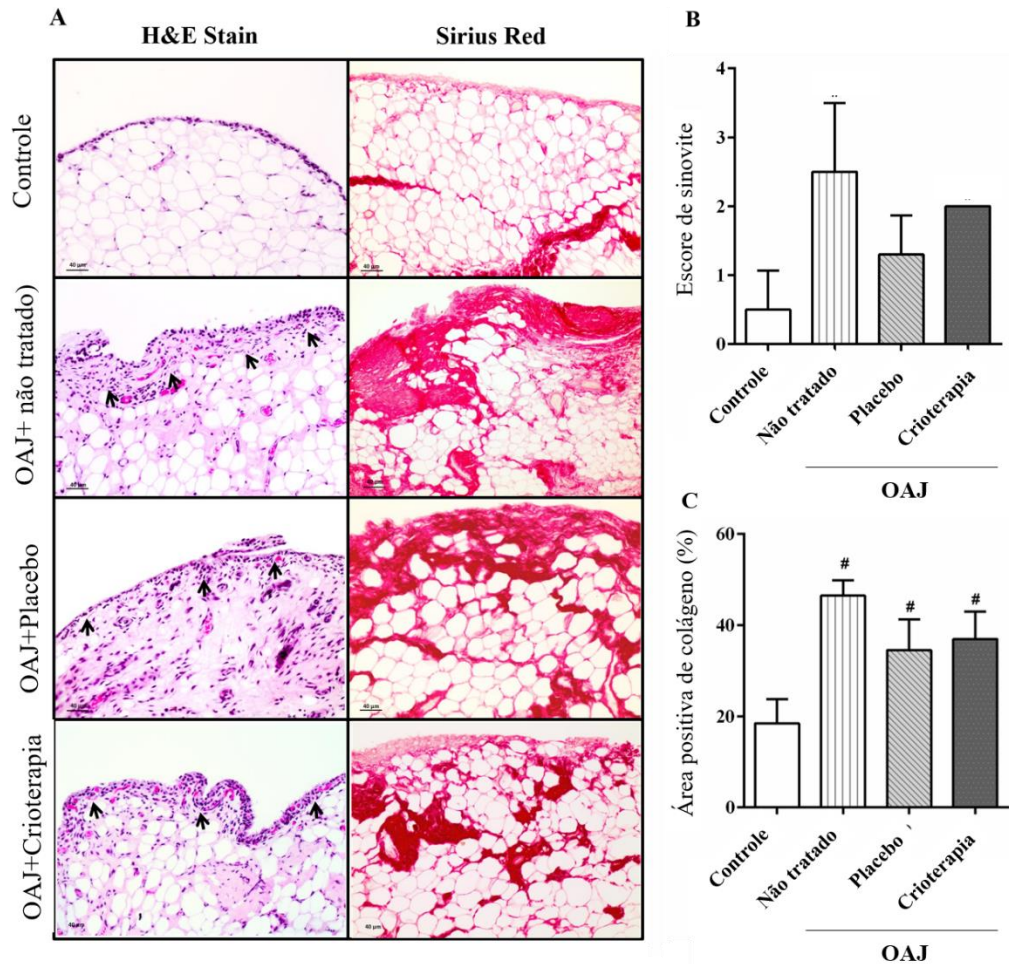


Figura 6. Avaliação histopatológica da membrana sinovial. Fotomicrografias representativas de secções da membrana sinovial coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e *Sirius Red* nos grupos Controle, OAJ, OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo (aumento de 200x). (A) Representação gráfica do escore de sinovite (B) e fibrose (C) nos grupos Controle, OAJ + Crioterapia e OAJ + Placebo. OAJ: osteoartrite do joelho. # $p < 0,05$ vs. grupo de controle.

Discussão

Nossos resultados mostram, pela primeira vez, que a crioterapia semelhante à utilizada na clínica é uma intervenção benéfica para a OAJ induzida por TLCA, uma vez que melhora o padrão da marcha, e os seus efeitos são mediados pela regulação negativa da inflamação

sinovial articular. O reduzido processo inflamatório observado no grupo Crioterapia, devido à menor migração de leucócitos para a cavidade articular, indica um efeito benéfico no controle da inflamação sinovial. Esses resultados sugerem que a crioterapia pode ser usada como tratamento não farmacológico e complementar da inflamação articular relacionada à OAJ.

Embora os efeitos anti-inflamatórios da crioterapia sejam pouco estudados em modelos animais de artrite (GUILLOT et al., 2014), vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar seus efeitos na redução do processo inflamatório nas articulações. Uma única aplicação de gelo em longo prazo (4 horas) diminuiu a fagocitose de leucócitos no líquido sinovial do joelho de cães com sinovite induzida por cristais de urato. Os efeitos foram atribuídos ao aumento da viscosidade no líquido sinovial, que pode ter impedido o movimento de leucócitos para os cristais (DORWART; HANSELL; SCHUMACHER, 1974b). Em outro estudo, bolsas de gelo (30 minutos, uma vez por dia, durante 10 dias) reduziram o infiltrado celular e a hiperplasia sinovial em coelhos com artrite induzida por zymosan (WEINBERGER, 1995). Em um modelo traumático, suínos com entorse do ligamento radiocarpal sofreram um declínio no número de leucócitos após duas aplicações de compressas de gelo triturado (20 minutos cada) (FARRY et al., 1980). Nesses estudos, a sinovite e a inflamação foram suprimidas pela redução da temperatura intra-articular. De acordo com estudos anteriores, a atividade enzimática responsável pela degeneração da matriz (ou seja, collagenases) diminui em temperaturas mais baixas (HARRIS; MCCROSKERY, 1974; OOSTERVELD; RASKER, 1994a). Embora não se tenha medido a temperatura intra-articular, esses mecanismos provavelmente também ocorreram no presente estudo, contribuindo para o declínio da inflamação articular. Outro possível mecanismo associado à crioterapia é a diminuição do metabolismo local, demonstrado em investigação anterior (HO et al., 1994), causando menor infiltrado celular na membrana sinovial e, conseqüentemente, menor ativação de mediadores inflamatórios.

Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e o TNF- α , exercem ação catabólica e contribuem de diversas formas para a degeneração articular na OAJ, incluindo a ativação de proteinases e a supressão do colágeno tipo II, um dos principais componentes da matriz extracelular (KAPOOR et al., 2011; MABEY; HONSAWEK, 2015). Outras citocinas, como a IL-17, atuam como mediador crítico no recrutamento, migração e ativação de neutrófilos (DELIGNE et al., 2015). Segundo nossos resultados, a crioterapia foi eficaz na redução ($\geq 55\%$) dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no líquido sinovial. Um estudo prévio, investigando a crioterapia aplicada nas patas de ratos com artrite induzida por adjuvante (30 minutos, duas vezes ao dia, durante 14 dias), mostrou efeitos anti-inflamatórios locais e sistêmicos, que foram mediados principalmente pela expressão gênica e proteica de IL-6 e

IL-17, independente de TNF- α (GUILLOT et al., 2017). Estudos conduzidos em diferentes condições fisiológicas e patológicas relacionaram os efeitos benéficos da crioterapia à inibição gênica dependente de fator nuclear kappa B (NF- κ B), IL-1 β , TNF- α e IL-6 (GUILLOT et al., 2014; YENARI; HAN, 2006). Essas vias também estão envolvidas nos efeitos da crioterapia observados no presente estudo.

Apesar do declínio significativo do processo inflamatório observado no grupo OAJ submetido à crioterapia, não houve melhora nos sinais histopatológicos da membrana sinovial. Esse resultado mostra que o modelo experimental utilizado induz a OAJ, e que os sinais da doença na membrana sinovial não são alterados pela crioterapia.

Em relação à análise da marcha, a maior área da pata encontrada no grupo OAJ + Crioterapia em comparação aos grupos OAJ e OAJ + Placebo, e o resultado semelhante em relação ao grupo Controle, indica uma descarga de peso mais homogênea, favorecendo um padrão de marcha normal. Os resultados do presente estudo com o modelo OAJ em ratos foram semelhantes aos de pesquisas anteriores (RUAN et al., 2013), que também relataram um declínio na área da pata de camundongos após quatro e oito semanas de TLCA. A analgesia induzida pelo frio afeta diretamente o controle da marcha, a diminuição dos limiares de excitabilidade de nociceptores e as velocidades de condução nervosa (DEMOULIN; VANDERTHOMMEN, 2012). Um declínio na informação nociceptiva transmitida através da aferência primária para a medula espinhal resultaria em menores sinais comportamentais e em redução da atividade neuronal no corno dorsal, gerando uma diminuição do campo receptivo, o que pode afetar a responsividade da marcha (SLUKA et al., 1999). Em contraste com o observado em humanos, não encontramos mudanças nas demais variáveis relacionadas à análise da marcha, como o comprimento e a largura da passada. Nossos resultados são consistentes com achados prévios em ratos (CLARKE et al., 1997; RUAN et al., 2013), embora pacientes com OAJ exibissem alterações compensatórias nos parâmetros espaço-temporais da marcha, como menor velocidade da marcha, diminuição do comprimento da passada e maior largura da base (AL-ZAHRANI; BAKHEIT, 2002; BEJEK et al., 2006).

Finalmente, as características de cronicidade da OAJ podem explicar a ausência de um efeito da crioterapia na temperatura da pele e no diâmetro da articulação do joelho. É importante ressaltar que não observamos hiperalgesia térmica no modelo de OAJ utilizado em nosso estudo. Vários estudos investigaram o comportamento em modelos de OAJ em roedores, e a hiperalgesia térmica não é comumente modificada ou relatada (BOVE et al., 2006; TSAI et al., 2017). As alterações comportamentais são frequentemente limitadas a adaptações da marcha, alodinia mecânica, hiperalgesia mecânica e desequilíbrios na descarga de peso.

Uma das limitações deste estudo foi a utilização do teste de impressão da pata para avaliar os padrões de marcha, visto que não há como avaliar com precisão a velocidade da marcha do animal. Outra possível limitação foi a ausência de um grupo Sham para o procedimento cirúrgico (cirurgia de joelho sem TLCA). Usamos apenas um grupo Controle sem intervenção cirúrgica, porque estudos prévios encontraram um desgaste articular similar entre os grupos OAJ e Sham (DELFINO et al., 2013; DIAS et al., 2014).

Conclusão

A crioterapia similar à utilizada na clínica melhora a descarga de peso entre as patas e reduz o número de leucócitos e citocinas inflamatórias no líquido sinovial de ratos com OAJ induzida por TLCA. Esses resultados fornecem novas evidências dos efeitos benéficos da crioterapia e sugerem que esta pode ser utilizada como um tratamento não farmacológico e complementar para controlar a inflamação articular na OAJ.

Financiamento

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 155211/2016-1 e 302169/2018-0); pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2016/24666-6 e 2015/26567-2); e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código Financeiro 001).

Referências bibliográficas

AJUIED, A. et al. Anterior Cruciate Ligament Injury and Radiologic Progression of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. **The American Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 42, n. 9, p. 2242–2252, 2014.

AL-ZAHRANI, K. S.; BAKHEIT, A. M. O. A study of the gait characteristics of patients with chronic osteoarthritis of the knee. **Disability and rehabilitation**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 275–80, 2002.

BASSI, G. S. et al. Spinal GABA-B receptor modulates neutrophil recruitment to the knee

joint in zymosan-induced arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 389, n. 8, p. 851–861, 2016.

BECK, T. W. The Importance of A Priori Sample Size Estimation in Strength and Conditioning Research. **Journal of Strength and Conditioning Research**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 2323–2337, 2013.

BEJEK, Z. et al. The influence of walking speed on gait parameters in healthy people and in patients with osteoarthritis. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 612–622, 2006.

BLEAKLEY, C. M. et al. The PRICE study (Protection Rest Ice Compression Elevation): design of a randomised controlled trial comparing standard versus cryokinetic ice applications in the management of acute ankle sprain [ISRCTN13903946]. **BMC Musculoskeletal Disorders**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 125, 2007.

BOCOBO, C. et al. The effect of ice on intra-articular temperature in the knee of the dog. **American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 181–185, 1991.

BOVE, S. E. et al. Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1041–1048, 2006.

BROSSEAU, L. et al. Thermotherapy for treatment of osteoarthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], 2003.

CHAVES, H. V. et al. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **Journal of biomedicine & biotechnology**, [s. l.], v. 2011, p. 707985, 2011.

CLARKE, K. A. et al. Gait analysis in a rat model of osteoarthrosis. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 62, n. 5, p. 951–4, 1997.

COSTELLO, J. T. et al. The use of thermal imaging in assessing skin temperature following cryotherapy: a review. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 103–110, 2012.

CUNHA, J. E. et al. Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. **Scientific reports**, [s. l.], v. 9, p. 6366, 2019.

DANTAS, L. O. et al. The effects of cryotherapy on pain and function in individuals with knee osteoarthritis: a systematic review of randomized controlled trials. **Clinical Rehabilitation**, [s. l.], 2019.

DE ANDRADE, A. L. M. et al. Effect of photobiomodulation therapy (808 nm) in the control of neuropathic pain in mice. **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 865–872, 2017.

DE OLIVEIRA, F. F. B. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Caryocar coriaceum Wittm fruit pulp fixed ethyl acetate extract on zymosan-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 174, p. 452–463, 2015.

DELFINO, G. B. et al. Quadriceps Muscle Atrophy After Anterior Cruciate Ligament Transection Involves Increased mRNA Levels of Atrogin-1, Muscle Ring Finger 1, and Myostatin. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, [s. l.], v. 92, n. 5, p. 411–9, 2013.

DELIGNE, C. et al. Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1843–1852, 2015.

DEMOULIN, C.; VANDERTHOMMEN, M. Cryotherapy in rheumatic diseases. **Joint, bone, spine : revue du rhumatisme**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 117–8, 2012.

DIAS, C. N. K. et al. Analysis of local and systemic TNF- α and IL1- β expression in the acute phase of knee osteoarthritis of rats. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 164-165, 2014.

DORWART, B. B.; HANSELL, J. R.; SCHUMACHER, H. R. Effects of cold and heat on urate crystal induced synovitis in the dog. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 563–571, 1974. a.

DORWART, B. B.; HANSELL, J. R.; SCHUMACHER, H. R. Effects of cold and heat on urate crystal-induced synovitis in the dog. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 563–571, 1974. b.

FARRY, P. J. et al. Ice treatment of injured ligaments: An experimental model. **New Zealand Medical Journal**, [s. l.], v. 91, n. 651, p. 12–14, 1980.

FARRY, P. J.; BEALE, L. R.; MACBETH, W. A. Intrarenal extravasation complicating selective vessel angiography. **The New Zealand medical journal**, [s. l.], v. 72, n. 458, p. 17–8, 1970.

FERNANDES, L. et al. EULAR recommendations for the non-pharmacological core management of hip and knee osteoarthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 72, n. 7, p. 1125–35, 2013.

GUILLOT, X. et al. Cryotherapy in inflammatory rheumatic diseases: a systematic review. **Expert Review of Clinical Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 281–294, 2014.

GUILLOT, X. et al. Local cryotherapy improves adjuvant-induced arthritis through down-regulation of IL-6 / IL-17 pathway but independently of TNF α . **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 7, 2017.

HARRIS, E. D. J.; MCCROSKERY, P. A. The influence of temperature and fibril stability on degradation of cartilage collagen by rheumatoid synovial collagenase. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 290, n. 1, p. 1–6, 1974.

HO, S. S. W. et al. The Effects of Ice on Blood Flow and Bone Metabolism in Knees. **The American Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 537–540, 1994.

KAPOOR, M. et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Review Rheumatology**, v. 7, n. 1, p. 33-42, 2011.

KNIGHT, K. L. **Cryotherapy in Sport Injury Management**. [s.l: s.n.]. v. 1

LEWIS, J. S. et al. Acute joint pathology and synovial inflammation is associated with increased intra-articular fracture severity in the mouse knee. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 864–873, 2011.

LITWIC, A. et al. Europe PMC Funders Group Epidemiology and Burden of Osteoarthritis. **British Medical Bulletin** [s. l.], v. 44, n. 0, p. 185–199, 2013.

MABEY, T.; HONSAWEK, S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. **World journal of orthopedics**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 95–105, 2015.

MALEMUD, C. J. **Anticytokine therapy for osteoarthritis: Evidence to date**, 2010.

NEOGI, T.; ZHANG, Y. Epidemiology of OA. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 1–19, 2013.

OLIVER, S. J.; BRAHN, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **The Journal of rheumatology. Supplement**, [s. l.], v. 44, p. 56–60, 1996.

OOSTERVELD, F. G. J.; RASKER, J. J. Treating arthritis with locally applied heat or cold.

Seminars in Arthritis and Rheumatism, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 82–90, 1994. a.

OOSTERVELD, F. G. J.; RASKER, J. J. Treating arthritis with locally applied heat or cold.

Seminars in Arthritis and Rheumatism, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 82–90, 1994. b.

PINTO, L. G. et al. Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1 β production. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 235, 2015.

QUADROS, A. U. et al. Dynamic weight bearing is an efficient and predictable method for evaluation of arthritic nociception and its pathophysiological mechanisms in mice. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 14648, 2015.

RUAN, M. Z. C. et al. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 1355–1364, 2013.

RUANO, J. S.; SITLER, M. R.; DRIBAN, J. B. Prevalence of Radiographic Knee Osteoarthritis After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction, With or Without Meniscectomy: An Evidence-Based Practice Article. **Journal of Athletic Training**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 606–609, 2017.

SLUKA, K. A. et al. Reduction of pain-related behaviors with either cold or heat treatment in an animal model of acute arthritis. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 313–317, 1999.

STOOP, R. et al. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 308–315, 2001.

TSAI, H.-C. et al. Traumatic osteoarthritis-induced persistent mechanical hyperalgesia in a rat model of anterior cruciate ligament transection plus a medial meniscectomy. **Journal of Pain Research**, [s. l.], v. Volume 11, p. 41–50, 2017.

VERAS, F. P. et al. Fructose 1,6-bisphosphate, a high-energy intermediate of glycolysis, attenuates experimental arthritis by activating anti-inflammatory adenosinergic pathway. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, 2015.

VOS, T. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The**

Lancet, [s. l.], v. 380, n. 9859, p. 2163–2196, 2012.

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, [s.l], v. 388, n. 10053, p. 1545-1602, 2016.

WEINBERGER A, G. S. Treatment of inflammatory synovitis with ice application. **Arthritis Rheum**, [s. l.], n. 38 Suppl.:, p. S242. 44., 1995.

YENARI, M.; HAN, H. Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: Role of nuclear factor kappa B (NFκB). **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 164–169, 2006.

Estudo II

Trinta dias após a transecção do ligamento cruzado anterior são suficientes para induzir dor, comprometimento funcional e inflamação sinovial relacionada à osteoartrite do joelho em ratos

BARBOSA, G.M.; CUNHA, J.E.; CUNHA, T.M.; RUSSO, T.L.; CASTRO, P.A.T.S.; OLIVEIRA, F.F.; CUNHA, F.; RAMALHO, F.S.; SALVINI, T.F.

Artigo em revisão no periódico *Inflammation Research* (Fator de impacto: 2,99)

Resumo

O modelo de osteoartrite do joelho (OAJ) induzida por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) em ratos tem sido amplamente utilizado devido à sua semelhança com a OAJ pós-traumática em humanos. Embora a progressão da OAJ neste modelo indique uma degeneração da cartilagem mais intensa após 60 dias, estudos piloto do nosso laboratório sugeriram que um tempo mais curto (30 dias) após a TLCA poderia ser suficiente para induzir a OAJ, podendo ser utilizado com segurança neste tipo de estudos. O objetivo deste estudo foi comparar os sinais da OAJ 30 e 60 dias após a TLCA unilateral. Dor, função da marcha, inflamação no líquido sinovial e alterações histopatológicas na membrana sinovial foram analisadas, bem como a interação entre essas variáveis. Ratos *Wistar* machos ($n = 32$; $219,2 \pm 18,6$ g) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de oito animais cada. Dois grupos foram submetidos a cirurgia unilateral para indução da OAJ e analisados após 30 (OAJ30) e 60 dias (OAJ60). Dois grupos Controle (sem cirurgia) também foram avaliados após os mesmos períodos de tempo (C30 e C60). Todos os grupos foram avaliados antes da TLCA, do teste menos estressante para o mais estressante (temperatura da pele, limiar de resposta mecânica, teste da marcha, limiar de resposta térmica e edema), e também 30 e 60 dias após a cirurgia. Após a eutanásia, o líquido sinovial e a membrana sinovial foram coletados. Trinta dias após o TLCA, o grupo OAJ30 apresentou diminuição da área de impressão da pata e limiar de resposta mecânica, maior diâmetro articular, temperatura da pele, contagem de leucócitos, níveis de citocinas e escore de sinovite. Não foram encontradas diferenças entre OAJ30 e OAJ60 ($p \geq 0,05$). Em conclusão, 30 dias após a TLCA foram suficientes para induzir todos os sinais da OAJ em ratos, sugerindo que um período de tempo mais curto pode ser utilizado como modelo experimental.

Palavras-chave: Doença Musculoesquelética. Sinovite. Mediadores da Inflamação. Modelo Animal. Análise de Marcha.

Introdução

A lesão do ligamento cruzado anterior (LCA) frequentemente causa osteoartrite do joelho (OAJ) pós-traumática e fraqueza muscular (CUNHA et al., 2019; VAN YPEREN et al., 2018). Um recente estudo mostrou que a OAJ induzida por transecção do LCA (TLCA) em ratos promove remodelação e atrofia da junção neuromuscular nos músculos quadríceps e tibial anterior, associada a sinais inflamatórios, alterações na marcha e alterações na expressão de genes e proteínas musculares (CUNHA et al., 2019). Sabe-se que 68–80% dos pacientes com lesão do LCA desenvolvem a OAJ radiográfica dentro de um período de acompanhamento de 20 anos, independentemente da reconstrução ligamentar (VAN YPEREN et al., 2018). Diversos fatores de risco estão associados a essa alta incidência, incluindo danos no momento da lesão (MENDIAS et al., 2013), instabilidade mecânica contínua (CHAUDHARI; SCHMITT; ANDRIACCHI, 2018) e inflamação local extensa (SCANZELLO; GOLDRING, 2012). O trauma articular ativa uma cascata de respostas catabólicas, incluindo citocinas inflamatórias (HARKEY et al., 2015; MABEY; HONSAWEK, 2015), o que pode contribuir para alterações dos sintomas em longo prazo, como dor articular, derrame ocasional e comprometimento funcional (HARKEY et al., 2015; MABEY; HONSAWEK, 2015). Estudos em animais usaram o modelo de TLCA para simular a OAJ pós-traumática e investigar a patogênese da doença (LITTLE; HUNTER, 2013; PICKARSKI et al., 2011; STOOP et al., 2001). No entanto, a maioria dos estudos concentrava-se nos aspectos morfológicos e moleculares da articulação, com menor atenção à dor, à função motora e à inflamação sinovial, o que ampliaria a caracterização da OAJ no modelo animal, quando considerados em conjunto.

De acordo com o que observamos, apenas um estudo investigou as alterações comportamentais e histopatológicas em camundongos em 4, 8 e 12 semanas no modelo OAJ induzida por TLCA (RUAN et al., 2013), demonstrando um declínio no desempenho motor, resposta tardia a estímulos térmicos, alterações na marcha e degeneração da cartilagem tibiofemoral a partir de quatro semanas após a cirurgia. No entanto, como nesse estudo a TLCA foi bilateral (RUAN et al., 2013), há limitações em comparar esses resultados com outros estudos utilizando modelo de OAJ unilateral. Além disso, sinais de inflamação, como edema articular, inflamação sinovial e alterações histopatológicas na membrana sinovial ao longo do tempo, não foram caracterizados. Pesquisas anteriores avaliaram a progressão da OAJ em modelos bioquímicos (KELLY; DOBSON; HARRIS, 2013; POMONIS et al., 2005). No entanto, esse modelo é geralmente aplicado em estudos com períodos de observação inferiores

a quatro semanas, dificultando a comparação com modelos de OAJ induzida por TLCA. Outro método de indução da OAJ é a TLCA com a ressecção do menisco medial (HAMILTON et al., 2015; TSAI et al., 2017), o qual exacerba o dano da cartilagem articular e aumenta a formação de osteófitos (HAYAMI et al., 2006; RUANO; SITLER; DRIBAN, 2017) .

A OAJ induzida por TLCA em modelos animais tem sido amplamente utilizada nas pesquisas devido à sua semelhança com a OAJ pós-traumática em humanos (CUNHA et al., 2019; STOOP et al., 2001). Embora a progressão histopatológica da OAJ nesse modelo esteja bem descrita e apresente degeneração da cartilagem mais intensa após 60 dias (FANG; BEIER, 2014; HAMILTON et al., 2015; RUAN et al., 2013), alguns aspectos ainda não foram elucidados. Por exemplo, que período de tempo é necessário para caracterizar os sinais de OAJ nesse modelo? Estudos piloto do nosso laboratório sugerem que 30 dias após a TLCA unilateral poderiam ser suficientes para induzir todos os sinais da OAJ, como dor, comprometimento funcional e um aumento nos mediadores inflamatórios do líquido sinovial, quando comparado ao modelo de OAJ de 60 dias.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi comparar a OAJ unilateral 30 e 60 dias após a TLCA em ratos. Dor, função da marcha, inflamação no líquido sinovial e alterações histopatológicas na membrana sinovial foram analisadas, bem como a interação entre essas variáveis. Nossa hipótese foi de que 30 dias após a TLCA são suficientes para induzir a OAJ em ratos, com sinais semelhantes aos observados em estudos prévios de 60 dias. Em caso afirmativo, estudos futuros poderiam ser conduzidos usando um período menor de OAJ induzida por TLCA no modelo de ratos, a fim de minimizar os custos e a manutenção dos animais.

Materiais e métodos

Animais e grupos experimentais

O protocolo experimental foi de acordo com o *National Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996). O Comitê de Ética da UFSCar aprovou os procedimentos experimentais (número 7949291116/2017), e o estudo foi conduzido por profissionais capacitados, cegos para a identificação dos grupos experimentais. Um cálculo amostral a priori foi realizado usando o *G*Power* (versão 3.1; University of Trier, Trier, Alemanha) (BECK, 2013). Com base em um estudo piloto previamente realizado ($n = 8$), adotou-se $\alpha = 0,05$, poder $(1-\beta) = 0,80$, coeficiente de correlação = 0,5 e tamanho do

efeito = 0,30. O teste de marcha e a migração de leucócitos foram utilizados para o cálculo. Para tanto, estimou-se que um total de 32 animais (oito por grupo) seria um tamanho amostral adequado.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos com dois meses de idade ($n = 32$; $219,2 \pm 18,6$ g). Os animais foram alojados em condições isentas de patógenos a $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sob um ciclo de luz reversa (12 horas de luz/12 horas de escuridão), e tiveram livre acesso a ração padrão para rato e água. Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de oito animais cada. Dois grupos foram submetidos a cirurgia unilateral para indução da OAJ e analisados após 30 (OAJ30) e 60 dias (OAJ60). Dois grupos Controle (compostos por animais *naïve*, sem cirurgia) também foram avaliados após os mesmos períodos de tempo (C30 e C60). Utilizamos apenas o grupo Controle sem intervenção cirúrgica, pois estudos prévios revelaram degeneração articular semelhante entre os grupos OAJ e Sham (cirurgia do joelho sem TLCA) (CUNHA et al., 2019; DELFINO et al., 2013; DIAS et al., 2014). Todos os animais foram analisados antes da cirurgia de TLCA, do teste menos estressante para o mais estressante: temperatura da pele, limiar de resposta mecânica, teste de marcha, limiar de resposta térmica e diâmetro articular do joelho. Todos os grupos foram reavaliados 30 e 60 dias após o TLCA. Os animais foram, então, submetidos a eutanásia para a coleta do líquido sinovial e da membrana sinovial (Figura 1).

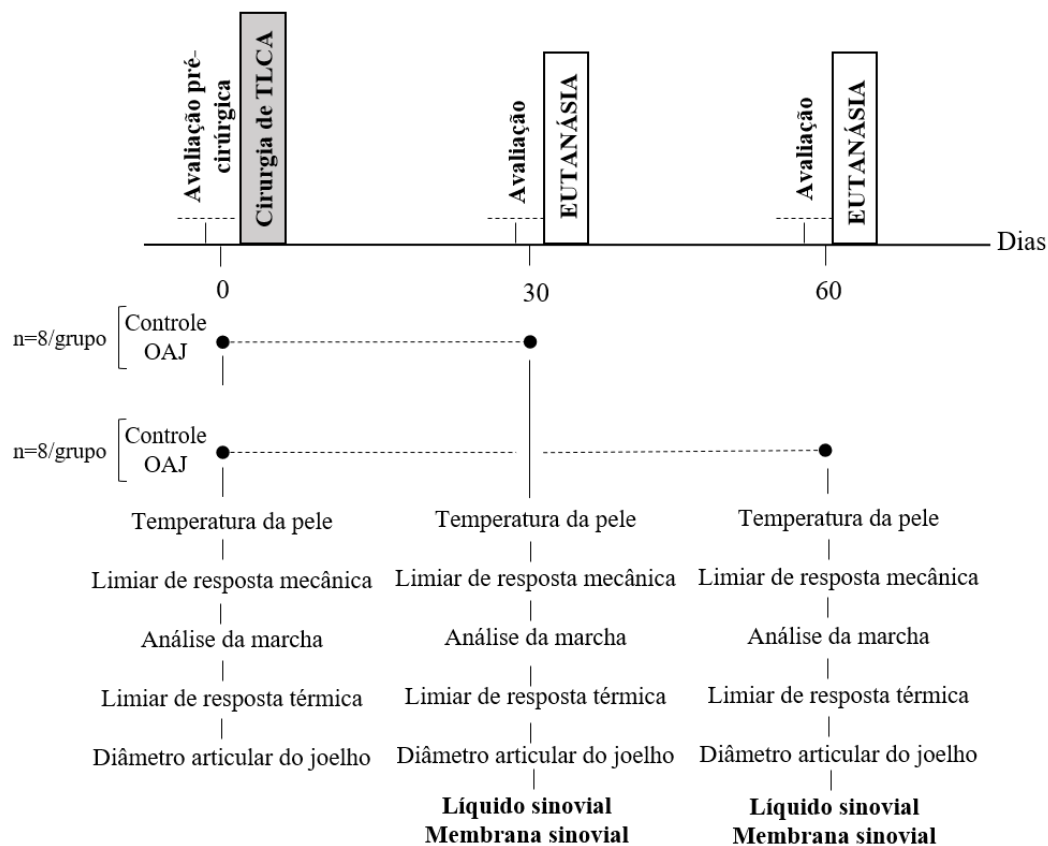


Figura 1. Procedimentos experimentais. Para cada período de tempo, os animais foram distribuídos aleatoriamente em Controle (sem cirurgia) ou OAJ (osteoartrite de joelho após a TLCA), e foram analisados antes da TLCA e 30 ou 60 dias após a cirurgia.

Indução da OAJ

Utilizamos um modelo adaptado de OAJ induzida por TLCA que causa alterações articulares em ratos semelhantes às observadas em humanos (STOOP et al., 2001). Resumidamente, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (12 mg/kg de xilazina e 95 mg/kg de cetamina), e foi realizada tricotomia digital e assepsia com iodo ao redor do joelho direito. Com o animal em posição supina, foi feita uma incisão longitudinal parapatelar medial de aproximadamente 1 cm, seguida da exposição do tendão patelar. Tanto a lesão da cápsula articular quanto a TLCA foram realizadas com uma tesoura cirúrgica do tipo oftálmica. O teste da gaveta anterior (livre deslocamento da tibia em relação ao fêmur no sentido pósterio-anterior) foi realizado para confirmar a TLCA. Após a sutura da pele, os animais foram retornados às gaiolas, e paracetamol (13,5mg/100ml) foi adicionado à água de beber nas primeiras 48 horas como analgesia pós-operatória. Nesse modelo, descrevemos previamente um escore histológico de *Mankin* mais elevado no grupo OAJ (60 dias após a TLCA) quando comparado aos Controles (animais *naive* de mesma idade) (CUNHA et al., 2019).

Avaliações

Teste de marcha

A análise da marcha foi conduzida utilizando-se o teste de impressão da pata, como previamente realizado em modelo animal de TLCA (RUAN et al., 2013). As patas traseiras dos ratos foram marcadas com tinta comercial não tóxica (guache, Faber-Castell, São Carlos, São Paulo). Em seguida, os animais foram colocados para caminhar sobre um corredor de madeira de 60 cm de comprimento e 7 cm de largura, coberto com papel branco. Uma câmara escura foi colocada no final da pista para atrair os animais. Após a conclusão do teste, o papel contendo as marcações das patas foi digitalizado a 300 dpi. A medida em torno da pata direita foi definida como a área da pata (pixels); a distância entre o primeiro e o quinto dedo, como largura da pata (cm); a distância entre dois passos da pata traseira, como comprimento da passada (cm); a distância horizontal entre a pata esquerda e a direita, como a base (cm); a distância entre o

terceiro dedo do pé e o calcanhar, como o comprimento da pata (cm); e o ângulo da pata, como o ângulo entre o quinto dedo e o calcâneo e uma linha horizontal (°).

Limiar de resposta mecânica

O limiar de resposta mecânica da pata traseira direita foi medido pelo método eletrônico de *Von Frey* (eletrônico Von Frey) (GUILLOT et al., 2017). Os ratos foram colocados em gaiolas de acrílico (12 x 20 x 17 cm) com piso de grade de arame, 20 minutos antes do início dos testes em uma sala silenciosa. O teste consistiu em estimular um reflexo de flexão da pata traseira usando um transdutor de força manual adaptado com uma ponta de polipropileno. O investigador foi treinado para aplicar o estímulo perpendicularmente na face plantar (um dos cinco dedos), aumentando gradualmente a pressão. A intensidade do estímulo quando a pata foi retirada foi considerada como o limiar mecânico (g).

Temperatura da pele do joelho

De acordo com os critérios para aquisição de imagens termigráficas (COSTELLO et al., 2012), os animais foram aclimatados em um quarto escuro (15 minutos; $23^{\circ}\text{C} \pm 1$). A termografia foi utilizada para medir a temperatura da pele do joelho direito em todos os grupos, utilizando-se uma câmera térmica infravermelha FLIR T420 (FLIR Systems®, EUA), acoplada a um tripé colocado a 50 cm do joelho do animal. As imagens foram analisadas no software *FLIR Tools*, e os resultados, expressos em °C.

Limiar de resposta térmica

Os animais foram colocados sobre uma placa quente (Insight® Equipamentos Ltda, Brasil) a 52°C ($51,8^{\circ}\text{C}$ – $52,4^{\circ}\text{C}$) (DE ANDRADE et al., 2017). O período de latência para a resposta da pata (salto, tremor ou lambida) foi considerado o tempo de resposta (segundos), em uma única repetição. O tempo máximo que o animal pôde permanecer sobre a placa quente foi de 25 segundos.

Diâmetro articular do joelho

O diâmetro da articulação do joelho foi medido com os animais na posição supina sob anestesia (2 ml/mlO₂; isoflurano 1,5%) (QUADROS et al., 2015), utilizando-se um paquímetro digital (Fisher Scientific, 150mm, EUA) posicionado nos côndilos femorais medial e lateral, no

nível de interlinha articular do joelho (CUNHA et al., 2019). A média de duas medidas foi utilizada, e os dados foram expressos em milímetros (mm).

Confiabilidade das medidas

O coeficiente de correlação intraclasse (CCI_{1,2}) e o erro padrão de medida (EPM) foram testados para a análise termográfica (A) e o edema articular (B) em oito ratos dias antes da TLCA. Os ratos foram reavaliados 48 horas após a primeira avaliação. Ambas as variáveis apresentaram excelente confiabilidade: A) CCI = 0,92, EPM = 0,20° C; B) CCI = 0,94; EPM = 0,28 mm.

Coleta do líquido sinovial

Os animais foram anestesiados (240 mg/kg de cetamina e 60 mg/kg de xilazina; i.p.) e exsanguinados (CHAVES et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2015). Este último procedimento foi realizado para minimizar a possibilidade de contaminação de sangue no líquido sinovial. A pele e os ligamentos da articulação do joelho direito foram removidos, e a cavidade sinovial foi lavada duas vezes com 200µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 10 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Este fluido de lavagem articular foi utilizado para a contagem de células, contagem diferencial de leucócitos e determinação do nível de citocinas (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Migração de leucócitos

A migração dos leucócitos foi determinada utilizando-se o líquido sinovial, como descrito anteriormente (PINTO et al., 2015). As cavidades articulares foram lavadas duas vezes com 5 µL de PBS contendo 1 mM de EDTA, e depois diluídas em um volume final de 50 µL com PBS/EDTA, para avaliar a migração de leucócitos no tempo estabelecido. Os leucócitos foram contabilizados em uma câmara de *Neubauer* diluída em solução de *Turk*. Os resultados foram expressos como o número de leucócitos por cavidade articular.

Contagem diferencial de leucócitos

Após a retirada de alíquotas para contagem total do número de leucócitos, o lavado articular foi centrifugado (1.500 rpm, 10 minutos, 4°C). O sobrenadante foi estocado a -80°C para posterior análise (determinação de citocinas), e o *pellet* celular foi ressuspenso em 200µL de solução de PBS e EDTA. Em seguida, as lâminas para contagem diferencial foram preparadas por centrifugação (1.500 rpm, 10 minutos) de uma alíquota do lavado articular (50

mL). As lâminas foram, então, montadas, fixadas por 4 minutos e coradas com eosina (30 segundos) e hematoxilina (20 segundos). Em seguida, foram lavadas em água corrente e colocadas para secagem (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Posteriormente, procedeu-se à contagem diferencial das células do exsudato articular. As células foram examinadas em microscópio óptico com objetiva de imersão em óleo (aumento de 100x). Foram, então, contadas 100 células por lâmina, diferenciando-se os tipos celulares em macrófagos, linfócitos e neutrófilos. A contagem de células do lavado articular foi obtida calculando-se a porcentagem de cada tipo de célula (contagem diferencial) e o número de leucócitos totais presentes no lavado articular (DE OLIVEIRA et al., 2015). Os resultados foram expressos como número de células x $10^3/\text{ml}$.

Determinação dos níveis de citocinas

As concentrações de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17 e IL-10 foram determinadas utilizando-se um ensaio imunoenzimático (ELISA) comercialmente disponível, seguindo as recomendações do fabricante (kits Duo-Set, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A densidade óptica das amostras individuais foi medida a 450 nm utilizando-se um espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram expressos como a média \pm DP dos níveis de citocinas em pg/mg de líquido articular (BASSI et al., 2016; VERAS et al., 2015).

Avaliação histopatológica da sinovite

Amostras de cápsulas articulares foram fixadas em formalina tamponada a 4% (vol/vol), desidratadas em etanol e embebidas em parafina para preparação das lâminas. As secções teciduais foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para analisar a sinovite (influxo de células inflamatórias e hiperplasia sinovial). A gravidade da patologia sinovial (isto é, sinovite) foi determinada utilizando-se um sistema de pontuação que mede a espessura da camada de células sinoviais numa escala de 0–3 (0 = 1–2 células, 1 = 2–4 células, 2 = 4–9 células e 3 = 10 ou mais células) e densidade celular no estroma sinovial numa escala de 0–3 (0 = celularidade normal, 1 = celularidade levemente aumentada, 2 = celularidade moderadamente aumentada e 3 = aumento acentuado de celularidade) (LEWIS et al., 2011).

Análise Estatística

As análises foram realizadas no software *Statistical Package for the Social Sciences* 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Como todas as variáveis apresentaram distribuição normal

($p > 0,05$) de acordo com os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, foi realizada a ANOVA de medidas repetidas para avaliar a interação entre os grupos (OAJ e Controle) e o tempo (0, 30 e 60 dias). A ANOVA *one-way* foi realizada para comparar as variáveis inflamatórias entre os grupos. Quando necessário, o teste *post hoc* de *Tukey* foi realizado. Os coeficientes de correlação de *Pearson* (r) foram calculados para avaliar a associação entre a área de impressão da pata, o limiar mecânico e térmico, o diâmetro articular do joelho, a temperatura da pele, os leucócitos e as citocinas inflamatórias. O nível de significância foi estabelecido em 0,05 para todas as análises estatísticas. A força do coeficiente de correlação foi considerada ruim quando os valores estavam entre 0 e 0,25, fracos entre 0,26 e 0,50, moderados entre 0,51 e 0,75, e fortes entre 0,76 e 1 32.

Resultados

Análise da marcha

Os grupos OAJ apresentaram uma menor área de impressão da pata quando comparados aos Controles 30 [diferença média: 3673,5 pixels (14,8%), IC 95%: -1205, 6142; $p = 0,007$] e 60 dias [diferença média: 2315,1 pixels (8,8%), IC 95%: -763, 3867; $p = 0,007$] após a TLCA (Figura 2A). Não houve alterações nas demais variáveis da análise da marcha (Figura 2B-F).

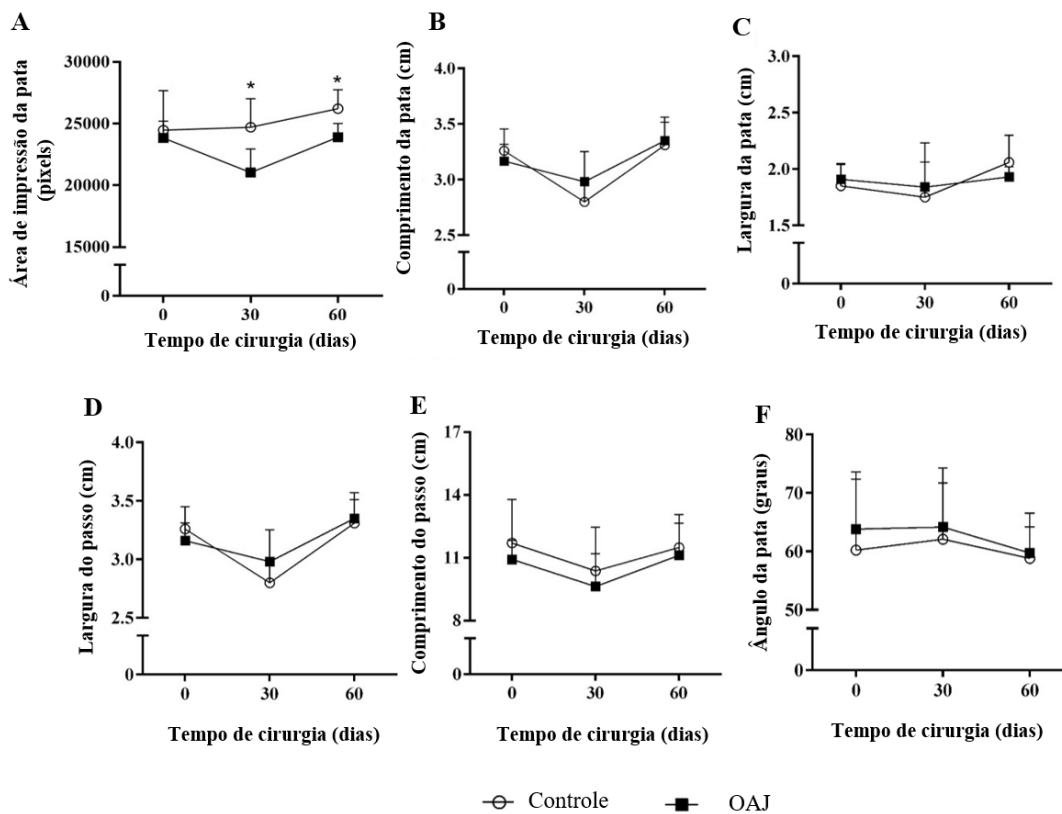


Figura 2. Área de impressão da pata (A); comprimento da pata (B); largura da pata (C); largura do passo (D); comprimento do passo (E); e ângulo da pata (F) no início (0 dia), 30 e 60 dias após a cirurgia nos grupos Controle e OAJ. OAJ: osteoartrite do joelho. * $p < 0,01$ grupo Controle *versus* OAJ.

Limiar de resposta mecânica e térmica

Houve redução significativa no limiar de resposta mecânica no grupo OAJ30 em relação ao grupo C30, trinta dias após a TLCA [diferença média: 14,5g (30,4%), IC 95%: -8,9, 14,9; $p = 0,037$], sem diferenças após 60 dias ($p = 0,396$; Figura 3A). Não foram observadas diferenças entre os grupos para o limiar de resposta térmica ($p > 0,05$; Figura 2B).

Diâmetro articular do joelho

O diâmetro da articulação do joelho foi maior nos grupos OAJ quando comparados aos Controles [diferença média: 30 dias = 1,31 mm (10,6%); IC 95%: -0,024, 2,60; $p < 0,001$; 60 dias = 1,13 mm (10%), IC 95%: -1,47, 0,81; $p < 0,001$; Figura 3C], sem diferenças entre ambos os tempos ($p = 0,07$).

Temperatura da pele do joelho

A temperatura da pele foi maior nos grupos OAJ em relação aos Controles [diferença média: 30 dias = 1,3°C (3,5%); IC 95%: -0,73, 1,81; $p < 0,001$; 60 dias = 1,6°C (4,2%); IC 95%: -0,86, 2,11; $p < 0,001$; Figura 3D], sem diferenças entre ambos os tempos ($p > 0,05$).

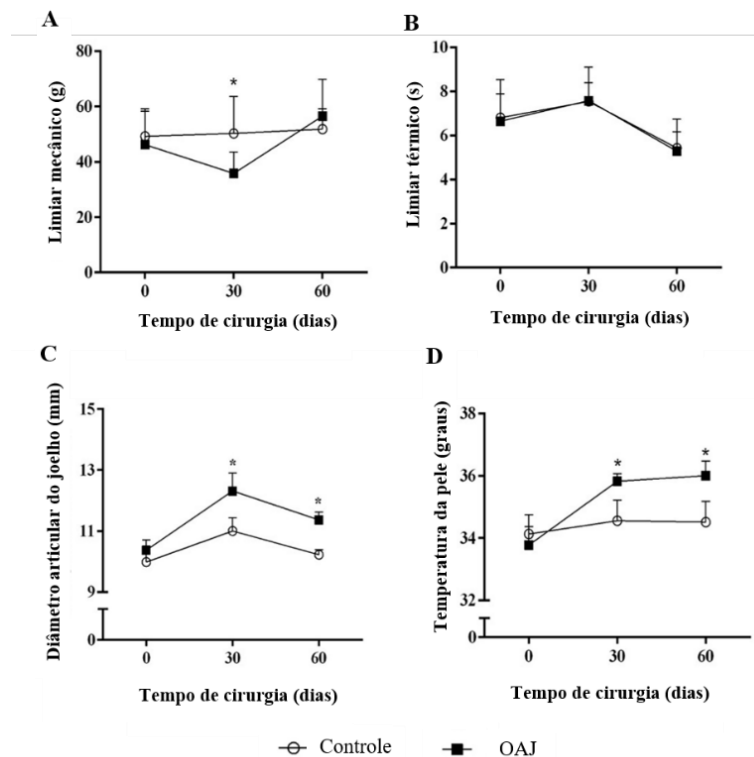


Figura 3. Limiar de resposta mecânica (A) e térmica (B); diâmetro articular do joelho (C); e temperatura da pele (D) no início (0 dia), 30 e 60 dias após a cirurgia nos grupos Controle e OAJ. OAJ: osteoartrite do joelho. * $p < 0,01$ grupo Controle *versus* OAJ.

Migração de leucócitos no líquido sinovial do joelho

Houve um aumento significativo no número de leucócitos nos grupos OAJ, em comparação com os controles, 30 e 60 dias após a TLCA (diferença média: $28,3 \times 10^3/\text{ml}$ e $21,6 \times 10^3/\text{ml}$, respectivamente; $p < 0,001$; Figura 4A), sem diferença entre os grupos OAJ. O maior número de leucócitos registrados foram macrófagos no líquido sinovial ($27,8 \times 10^3/\text{ml}$), seguidos pelos linfócitos ($4,8 \times 10^3/\text{ml}$) e neutrófilos ($2,5 \times 10^3/\text{ml}$), independentemente do tempo após a cirurgia (Figura 4B-D).

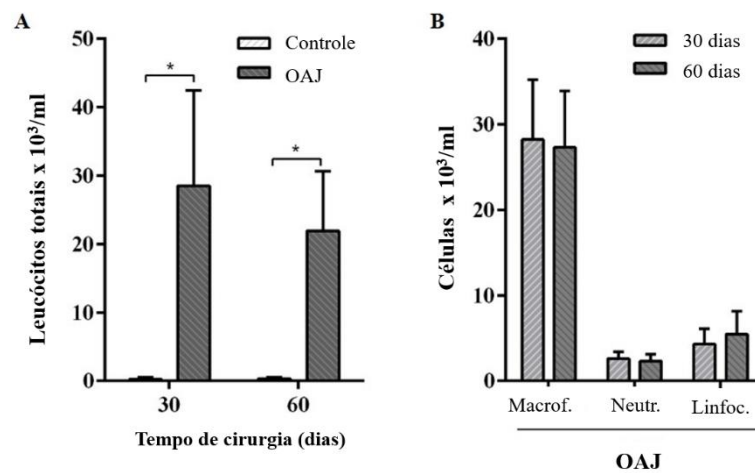


Figura 4. Número de células no líquido sinovial do joelho. Número total de leucócitos (A) e contagem diferencial de macrófagos (B), linfócitos (C) e neutrófilos (D). OAJ: osteoartrite do joelho. # $p < 0,05$ vs. grupo Controle; † $p < 0,05$ vs. grupo OAJ; * $p < 0,05$ vs. grupo OAJ + Crioterapia.

Níveis de citocinas no líquido sinovial do joelho

Nos 30° e 60° dias, os ratos com OAJ exibiram maiores concentrações de TNF- α (42,2% e 39,4%, respectivamente; Figura 5A), IL-1 β (47,8% e 53,3%, respectivamente; Figura 4B), IL-6 (64,7 % e 42,3%, respectivamente; Figura 5C) e IL-17 (47,4% e 38,3%, respectivamente; Figura 5D) em comparação com os controles ($p < 0,001$). No entanto, houve um declínio na IL-6 (36,8%) no grupo OAJ60 quando comparado ao grupo OAJ30 ($p = 0,003$; Figura 5C). Nenhuma alteração foi observada para IL-10, 30 e 60 dias após a TLCA ($p > 0,05$; Figura 5).

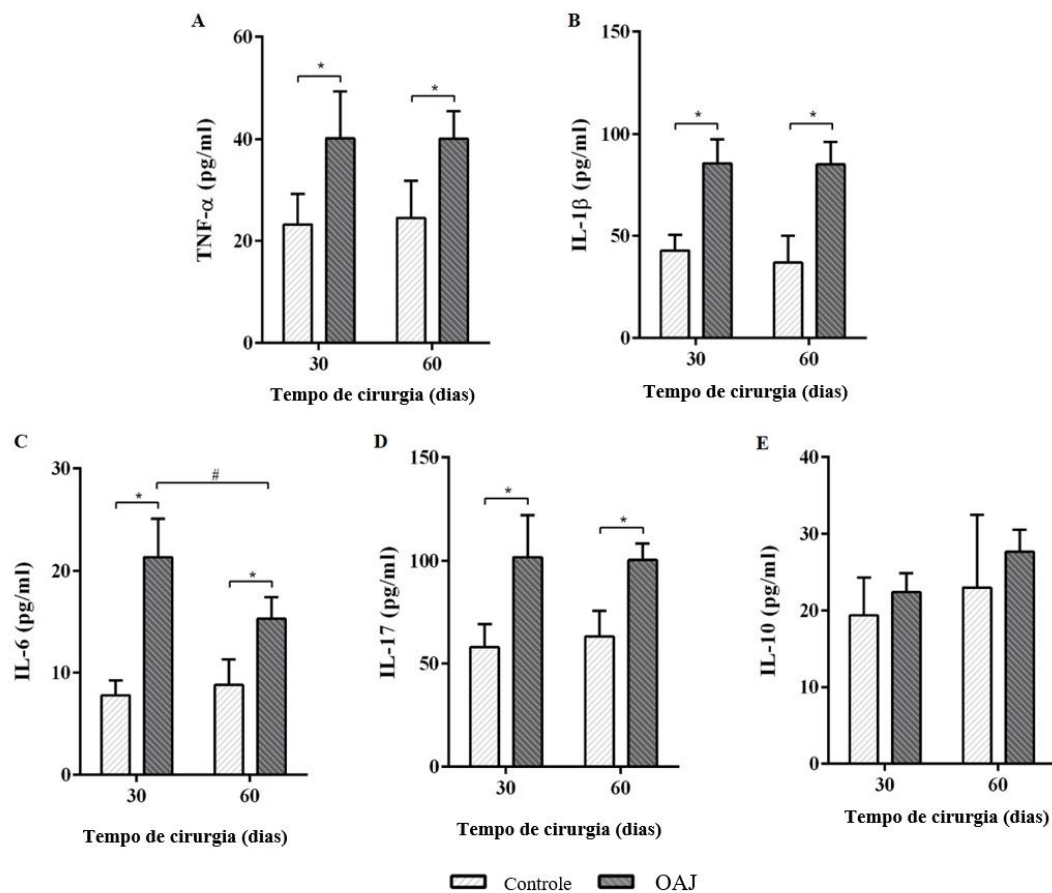


Figura 5. Concentração de citocinas no líquido sinovial do joelho. (A) TNF- α ; (B) IL1-p; (C) IL-6; (D) IL-17; (E) IL-10. OAJ: osteoartrite do joelho. * $p \leq 0,001$ Controle vs. grupos OAJ; # $p = 0,006$: 30 vs. 60 dias após a TLCA nos grupos OAJ.

Avaliação histopatológica da sinovite

Houve alteração na membrana sinovial de ratos com OAJ em relação aos controles ($p < 0,01$) 30 e 60 dias após a cirurgia (Figura 6A), com o grupo OAJ30 exibindo um escore médio maior que OAJ60. Porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 6B; $p > 0,05$).

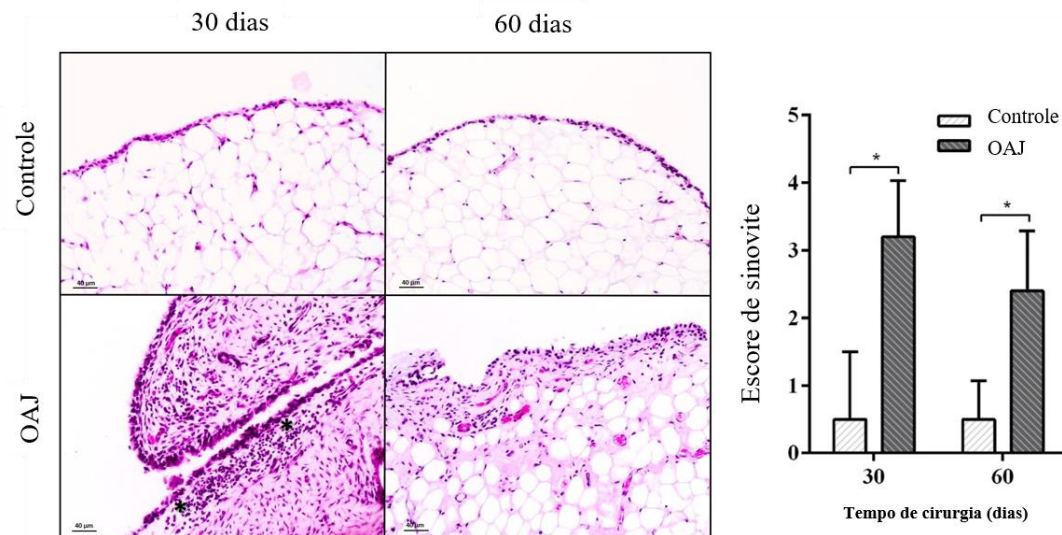


FIGURA 6. Avaliação histopatológica da membrana sinovial. Fotomicrografias representativas de secções da membrana sinovial coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) nos grupos Controle e OAJ (aumento de 200x) (A). Representação gráfica do escore de sinovite nos grupos Controle e OAJ 30 e 60 dias após a cirurgia, que mediu a espessura da camada de células sinoviais e a densidade celular no estroma sinovial (B). OAJ: osteoartrite do joelho. Os dados são expressos como média \pm DP ($n = 3-5$ animais por grupo); * $p < 0,01$ Controle vs. grupo OAJ.

Análises de correlação

Associações entre área de impressão da pata, limiar mecânico e térmico, diâmetro da articulação, temperatura da pele, leucócitos e citocinas inflamatórias são mostradas na Tabela 1. Trinta dias após a TLCA, foi observada uma correlação moderada entre a área de impressão da pata e o diâmetro da articulação ($r = -0,59$, $p = 0,04$) e IL1- β ($r = -0,61$, $p = 0,03$), e uma forte correlação entre a área de impressão da pata e a temperatura da pele ($r = -0,81$, $p = 0,001$) 60 dias após a TLCA. Houve forte correlação entre a inflamação sinovial e o diâmetro articular ($r = 0,63-0,92$, $p < 0,05$), e moderada a forte correlação entre inflamação sinovial e temperatura da pele ($r = 0,58-0,79$, $p < 0,05$) para ambos os tempos (30 e 60 dias) após a TLCA. Com relação à resposta mecânica, observou-se moderada correlação entre o limiar mecânico e os níveis de TNF- α ($r = -0,62$, $p = 0,03$) 30 dias após o TLCA. No grupo OAJ60, houve moderada correlação entre o limiar de resposta mecânica e o diâmetro articular ($r = 0,64$, $p = 0,02$), TNF- α ($r = 0,60$, $p = 0,04$) e IL-6 ($r = 0,60$, $p = 0,04$).

Tabela I. Coeficientes de correlação de *Pearson* (r) para a área de impressão da pata, limiares mecânicos e térmicos, diâmetro articular, temperatura da pele, leucócitos e citocinas inflamatórias, 30 e 60 dias após a TLCA em ratos.

	Área de impressão da pata	Limiar mecânico	Limiar térmico	Diâmetro articular	Temperatura da pele	Leucócitos	IL1- β	TNF- α	IL-6	IL-17	IL-10	
OAJ30	Área de impressão da pata	-	0.07	-0.14	-0.59*	-0.52	-0.48	-0.61*	-0.49	-0.57	-0.29	-0.46
	Limiar mecânico		-	0.34	-0.29	-0.50	-0.47	-0.49	-0.62*	-0.44	-0.45	-0.20
	Limiar térmico			-	0.08	0.08	-0.09	-0.08	-0.01	-0.07	-0.34	-0.16
	Diâmetro articular				-	0.69*	0.70*	0.80*	0.68*	0.67*	0.63*	0.38
	Temperatura da pele					-	0.63*	0.79*	0.63*	0.68*	0.58*	0.35
OAJ60	Área de impressão da pata	-	-0.16	0.20	-0.56	-0.81*	-0.51	-0.55	-0.36	-0.41	-0.46	-0.18
	Limiar mecânico		-	0.32	0.64*	0.28	0.45	0.48	0.60*	0.60*	0.47	0.20
	Limiar térmico			-	0.17	0.14	0.17	0.10	0.24	0.24	0.26	0.11
	Diâmetro articular				-	0.79*	0.84*	0.92*	0.86*	0.85*	0.90*	0.50
	Temperatura da pele					-	0.62*	0.72*	0.63*	0.66*	0.75*	0.33

* $p < 0,05$; OAJ: osteoartrite do joelho; TLCA: transecção do ligamento cruzado anterior

Discussão

Os resultados do nosso estudo mostram que um período de 30 dias após a TLCA unilateral foi suficiente para induzir os sinais de OAJ em ratos. Essa conclusão baseia-se na similaridade entre os resultados nos grupos OAJ30 e OAJ60 dias, como déficits na marcha, aumento dos sinais inflamatórios e os resultados das análises de correlação.

No presente estudo, as alterações da marcha foram analisadas pelo teste de impressão da pata. Ratos com OAJ unilateral apresentaram declínio na área da pata, com o maior déficit percentual registrado 30 dias após a TLCA (14,8%). Efeitos de compensação semelhantes foram descritos em estudo prévio, que também relatou uma menor área de impressão da pata em camundongos a partir de quatro semanas após a TLCA bilateral (RUAN et al., 2013). Além disso, testes de correlação mostraram que o declínio na área de impressão da pata foi moderadamente associado com o aumento do diâmetro articular e níveis de IL1- β no líquido sinovial. Em estudo prévio, a IL1- β foi negativamente correlacionada com o alinhamento articular (ângulo tíbio-femoral) em indivíduos com OAJ (NING et al., 2011). Outro fator importante que favorece as alterações na marcha é a presença de dor (TSAI et al., 2017), embora não tenha sido encontrada associação entre a impressão da pata e a dor nociceptiva em nosso estudo. No entanto, nossos achados indicam que outros fatores, como edema articular e processo inflamatório, podem ter contribuído para essas compensações.

O declínio no limiar de resposta mecânica identificado 30 dias após a TLCA indicou a presença de hiperalgesia mecânica secundária, cuja ausência após 60 dias sugere uma progressão bifásica da dor (TSAI et al., 2017). A hiperalgesia 30 dias após a TLCA provavelmente está associada à dor nociceptiva nas articulações devido à cirurgia no joelho. Nossos resultados são semelhantes aos obtidos em investigação prévia (TSAI et al., 2017), na qual a hiperalgesia mecânica foi maior até 5 semanas após a lesão articular do joelho, e atingiu o pico entre 2 e 4 semanas, melhorando posteriormente, mas persistindo até 15 semanas. Segundo o estudo, um dos fatores que podem ter favorecido o declínio do limiar mecânico após o trauma é a presença de mediadores inflamatórios sensibilizando os nociceptores primários (MILLER; MILLER; MALFAIT, 2014). No presente estudo, houve associação moderada e negativa entre o limiar de resposta mecânica e os níveis de TNF- α 30 dias após a TLCA. O TNF- α aumenta rapidamente as taxas de disparo das fibras A e C nos gânglios da raiz dorsal, aumentando a transmissão sináptica na medula espinhal (SCHÄFERS et al., 2003; TAVES et al., 2013). Resultados semelhantes foram observados em indivíduos com OAJ, com correlação

moderada entre os níveis de TNF- α no líquido sinovial e os escores de dor (ORITA et al., 2011). Os níveis de IL-6, uma glicoproteína envolvida no disparo nociceptivo da fibra C nos gânglios da raiz dorsal da medula (BRENN; RICHTER; SCHAIBLE, 2007; MILLER; MILLER; MALFAIT, 2014), foram maiores 30 dias após a TLCA do que aos 60 dias, embora não correlacionados com o limiar de resposta mecânica no 30° dia. A análise de correlação indicou que níveis mais elevados de TNF- α no 30° dia desempenharam um papel significativo no aumento da dor, possivelmente devido ao reduzido limiar de resposta mecânica.

Curiosamente, os animais não exibiram hiperalgesia ao estímulo térmico 30 e 60 dias após o TLCA. Além disso, não foi observada correlação entre o limiar térmico e nenhuma das variáveis estudadas. Esses resultados são corroborados por estudos prévios em modelo de OAJ pós-traumática em ratos (BOVE et al., 2006; TSAI et al., 2017), que encontraram alterações no limiar mecânico sem diferenças nos limiares térmicos 28 dias após a transecção do ligamento colateral medial com meniscectomia medial (BOVE et al., 2006), e até 15 semanas após a TLCA com meniscectomia medial (TSAI et al., 2017). Uma hipótese para esses resultados envolve a ativação de um subconjunto de nociceptores responsáveis por evocar calor ou dor mecânica (CAVANAUGH et al., 2009; SCHERRER et al., 2009). Outra possibilidade é que os neurônios sensoriais primários envolvidos na patogênese da dor diferem entre os modelos de OAJ (WU; HENRY, 2010). Especificamente, no modelo de OAJ induzido pela cirurgia, as alterações da fibra A β podem levar à hiperalgesia mecânica, sem alterações nas fibras C, que estão associadas à hiperalgesia térmica (TSAI et al., 2017; WU; HENRY, 2010). Isso poderia explicar a ausência de hiperalgesia térmica em nosso modelo.

Além dos aspectos relacionados à dor, identificaram-se níveis mais elevados de citocinas inflamatórias nos macrófagos e no líquido sinovial 30 e 60 dias após a TLCA, sem diferenças entre eles. Macrófagos estão envolvidos em danos estruturais no tecido articular e desempenham um papel importante na perpetuação de respostas inflamatórias destrutivas (BONDESON et al., 2010; SELLAM; BERENBAUM, 2010). Altas concentrações de IL-1 β e IL-17 também foram registradas no líquido sinovial 30 e 60 dias após a TLCA. Produzida por macrófagos ativados, a IL-1 β é um importante mediador da resposta inflamatória que ativa enzimas catabólicas (destrutivas) na articulação (GLYN-JONES et al., 2015; MABEY; HONSAWEK, 2015). A IL-17, um mediador crítico no recrutamento, migração e ativação de neutrófilos, também contribui para a degradação da cartilagem e infiltração sinovial na OAJ (DELIGNE et al., 2015). Mudanças estruturais na membrana sinovial também foram observadas 30 dias após a TLCA, confirmando as características inflamatórias e degenerativas do modelo. Além disso, houve uma forte correlação entre a inflamação sinovial e o diâmetro

articular, e moderada a forte correlação entre a inflamação sinovial e a temperatura da pele 30 e 60 dias após a TLCA. Nossos resultados também sugerem que técnicas não invasivas mais acessíveis disponíveis para uso clínico, como a termografia, podem ser usadas para complementar a análise da OAJ em modelos animais.

Conclusão

Nossos dados mostraram que 30 dias após a TLCA são suficientes para induzir a OAJ em ratos, sugerindo que um período de tempo mais curto pode ser utilizado como modelo experimental. Estudos adicionais serão necessários para investigar se os tecidos adjacentes também se adaptam da mesma forma 30 e 60 dias após a TLCA.

Financiamento

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 155211/2016-1 e 302169/2018-0); pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2016/24666-6 e 2015/26567-2); e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código Financeiro 001).

Referências bibliográficas

- BASSI, G. S. et al. Spinal GABA-B receptor modulates neutrophil recruitment to the knee joint in zymosan-induced arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 389, n. 8, p. 851–861, 2016.
- BECK, T. W. The Importance of A Priori Sample Size Estimation in Strength and Conditioning Research. **Journal of Strength and Conditioning Research**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 2323–2337, 2013.
- BONDESON, J. et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 647–657, 2010.
- BOVE, S. E. et al. Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of

both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1041–1048, 2006.

BRENN, D.; RICHTER, F.; SCHAIBLE, H.-G. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: An inflammatory mechanism of joint pain. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 351–359, 2007.

CAVANAUGH, D. J. et al. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 22, p. 9075–9080, 2009.

CHAUDHARI, A. M. W.; SCHMITT, L. C.; ANDRIACCHI, T. P. Effects of Alterations in Gait Mechanics on the Development of Osteoarthritis in the ACL-Deficient Knee. In: **ACL Injuries in the Female Athlete**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018. p. 153–166.

CHAVES, H. V. et al. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **Journal of biomedicine & biotechnology**, [s. l.], v. 2011, p. 707985, 2011.

COSTELLO, J. T. et al. The use of thermal imaging in assessing skin temperature following cryotherapy: a review. **Journal of Thermal Biology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 103–110, 2012.

CUNHA, J. E. et al. Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. **Scientific reports**, [s. l.], v. 9, p. 6366, 2019.

DE ANDRADE, A. L. M. et al. Effect of photobiomodulation therapy (808 nm) in the control of neuropathic pain in mice. **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 865–872, 2017.

DE OLIVEIRA, F. F. B. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Caryocar coriaceum Wittm fruit pulp fixed ethyl acetate extract on zymosan-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 174, p. 452–463, 2015.

DELFINO, G. B. et al. Quadriceps Muscle Atrophy After Anterior Cruciate Ligament Transection Involves Increased mRNA Levels of Atrogin-1, Muscle Ring Finger 1, and Myostatin. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, [s. l.], v. 92, n. 5, p. 411–9, 2013.

DELIGNE, C. et al. Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed

and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 1843–1852, 2015.

DIAS, C. N. K. et al. Analysis of local and systemic TNF- α and IL1- β expression in the acute phase of knee osteoarthritis of rats. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 164-165, 2014.

FANG, H.; BEIER, F. Mouse models of osteoarthritis: Modelling risk factors and assessing outcomes. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 7, p. 413-21, 2014.

GLYN-JONES, S. et al. Osteoarthritis. **The Lancet**, [s. l.], v. 386, n. 9991, p. 376–387, 2015.

GUILLOT, X. et al. Local cryotherapy improves adjuvant-induced arthritis through down-regulation of IL-6 / IL-17 pathway but independently of TNF α . **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 7, 2017.

HAMILTON, C. B. et al. Weight-bearing asymmetry and vertical activity differences in a rat model of post-traumatic knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 1178–1185, 2015.

HARKEY, M. S. et al. Osteoarthritis-related biomarkers following anterior cruciate ligament injury and reconstruction: A systematic review. **Osteoarthritis Cartilage**, n. 23, v. 1, p. 1-12, 2015.

HAYAMI, T. et al. Characterization of articular cartilage and subchondral bone changes in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **Bone**, [s. l.], v. 38, n. 2, p. 234–243, 2006.

J.S., L. et al. Acute joint pathology and synovial inflammation is associated with increased intra-articular fracture severity in the mouse knee. **Osteoarthritis and Cartilage**, S.A. Olson, Duke University Medical Center, Box 3389, Durham, NC 27710, United States, v. 19, n. 7, p. 864–873, 2011.

KELLY, S.; DOBSON, K. L.; HARRIS, J. Spinal nociceptive reflexes are sensitized in the monosodium iodoacetate model of osteoarthritis pain in the rat. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 1327–1335, 2013.

LITTLE, C. B.; HUNTER, D. J. Post-traumatic osteoarthritis: from mouse models to clinical trials. **Nature reviews. Rheumatology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 485–97, 2013.

MABEY, T.; HONSAWEK, S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis.

World journal of orthopedics, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 95–105, 2015.

MENDIAS, C. L. et al. Changes in Circulating Biomarkers of Muscle Atrophy, Inflammation, and Cartilage Turnover in Patients Undergoing Anterior Cruciate Ligament Reconstruction and Rehabilitation. **The American Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1819–1826, 2013.

MILLER, R. E.; MILLER, R. J.; MALFAIT, A.-M. Osteoarthritis joint pain: the cytokine connection. **Cytokine**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 185–93, 2014.

NING, L. et al. Correlations between both the expression levels of inflammatory mediators and growth factor in medial perimeniscal synovial tissue and the severity of medial knee osteoarthritis. **International Orthopaedics**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 831–838, 2011.

ORITA, S. et al. Associations between proinflammatory cytokines in the synovial fluid and radiographic grading and pain-related scores in 47 consecutive patients with osteoarthritis of the knee. **BMC Musculoskeletal Disorders**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 144, 2011.

PICKARSKI, M. et al. Molecular changes in articular cartilage and subchondral bone in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. **BMC Musculoskeletal Disorders**. [s.l: s.n.], v. 12, p 197, 2011.

PINTO, L. G. et al. Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1 β production. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 235, 2015.

POMONIS, J. D. et al. Development and pharmacological characterization of a rat model of osteoarthritis pain. **Pain**, [s. l.], v. 114, n. 3, p. 339–346, 2005.

QUADROS, A. U. et al. Dynamic weight bearing is an efficient and predictable method for evaluation of arthritic nociception and its pathophysiological mechanisms in mice. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 14648, 2015.

RUAN, M. Z. C. et al. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 1355–1364, 2013.

RUANO, J. S.; SITLER, M. R.; DRIBAN, J. B. Prevalence of Radiographic Knee Osteoarthritis After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction, With or Without Meniscectomy: An Evidence-Based Practice Article. **Journal of Athletic Training**, [s. l.], v.

52, n. 6, p. 606–609, 2017.

SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. R. **The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis**, 2012.

SCHÄFFERS, M. et al. Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 3028–38, 2003.

SCHERRER, G. et al. Dissociation of the Opioid Receptor Mechanisms that Control Mechanical and Heat Pain. **Cell**, [s. l.], v. 137, n. 6, p. 1148–1159, 2009.

SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 625–635, 2010.

STOOP, R. et al. Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. **Osteoarthritis and Cartilage**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 308–315, 2001.

TAVES, S. et al. Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain. **Neural plasticity**, [s. l.], v. 2013, p. 753656, 2013.

TSAI, H.-C. et al. Traumatic osteoarthritis-induced persistent mechanical hyperalgesia in a rat model of anterior cruciate ligament transection plus a medial meniscectomy. **Journal of Pain Research**, [s. l.], v. Volume 11, p. 41–50, 2017.

VAN YPEREN, D. T. et al. Twenty-Year Follow-up Study Comparing Operative Versus Nonoperative Treatment of Anterior Cruciate Ligament Ruptures in High-Level Athletes. **The American Journal of Sports Medicine**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1129–1136, 2018.

VERAS, F. P. et al. Fructose 1,6-bisphosphate, a high-energy intermediate of glycolysis, attenuates experimental arthritis by activating anti-inflammatory adenosinergic pathway. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, 2015.

WU, Q.; HENRY, J. L. Changes in A β Non-Nociceptive Primary Sensory Neurons in a Rat Model of Osteoarthritis Pain. **Molecular Pain**, [s. l.], v. 6, p. 1744-8069-6–37, 2010.

Conclusões finais da tese

Essa tese de Doutorado abordou os efeitos da crioterapia na função e inflamação sinovial de ratos com OAJ induzida por TLCA. Além disso, comparou a progressão da OAJ 30 e 60 dias após a TLCA, investigando a dor, a função, os sinais inflamatórios e as alterações histopatológicas da membrana sinovial, bem como as suas interações. Baseado nos resultados de ambos os estudos realizados, podemos concluir:

- Os resultados do estudo I fornecem novas evidências dos efeitos benéficos da crioterapia e sugerem que a mesma pode ser utilizada como tratamento não farmacológico e complementar para melhorar a função e controlar a inflamação articular na OAJ de ratos.
- Os resultados do estudo II contribuem para uma melhor caracterização do modelo de OAJ induzida por TLCA, sugerindo um período de tempo mais curto para ser utilizado como modelo experimental.

APÊNDICE I

Produções científicas relacionada à tese

1. Artigos completos

- Cunha, J.E.; **Barbosa, G.M.**; Castro P.A.T.S.; Luiz B.L.F.; Silva, A.C.A; Russo T.L.R.; Vasilceac, F.A.; Cunha, T.M.; Cunha F.Q.; Salvini, T.F. Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/s41598-019-42546-7
- Castro, PAT; Cunha, JE; **Barbosa, GM**; Machanocker, DH; Cunha, TM; Perez, RS; Oliveira, FFB; Ramalho, FS; Russo, TL; Cunha, FQ; Salvini, TF. Clinical-like cryotherapy in acute arthritis of the knee improves inflammation signs, pain, joint swelling and motor performance in mice. Em revisão (*Scientific Reports*; Manuscript Number: SREP-19-20743), 2019.
- Dantas, OL; Breda CC; Serrao, PRMS; Aburquerque-Sendín F; Jorge AES; Cunha JE; **Barbosa GM**; Durigan, JLQ; Salvini TF. Short-term cryotherapy and placebo improve pain and physical function in individuals with knee osteoarthritis - a randomized placebo controlled trial. Aprovado (*Physical Therapy Journal*; Manuscript Number: PHYST-18-163), 2019.
- Castro, PAT; **Barbosa, GM**; Cunha, JE; Machanocker, DH; Cunha, TM; Luna, GF; Russo, TL; Cunha, FQ; Salvini, TF. Effect of cryotherapy on inflammatory signs, the neuromuscular signaling pathway and the pathway of atrophy / skeletal muscle weakness in mice with acute knee arthritis. Em processo de submissão para o *Jornal Arthritis Research & Therapy*, 2019.
- Castro, PAT; Machanocker, DH; Luna, GF; Cunha, TM; **Barbosa, GM**; Cunha, JE; Russo, TL; Cunha, FQ; Salvini, TF. Studies on joint swelling, joint nociception, neutrophil migration and nerve-muscle interface pathways in the acute knee arthritis induced by the aia model in mice. Em processo de submissão para o *Jornal Plos One*, 2019.

2. Resumos publicados em anais

- Castro, P.A.T.S.; **Barbosa, G.M.**; Cunha, J.E; Cunha, T.M.; Cunha, F.Q.; Salvini, T.F. A crioterapia reduz a hipernocicepção mecânica e a resposta inflamatória em camundongos com artrite aguda do joelho. Modalidade: pôster. I Congresso Internacional e II Congresso Brasileiro da ABRAFITO, Brasília. Revista Inspirar –

- movimento & saúde (ISSN 2175-537X). Suplemento 1. Vol. 9. N°3. Ed43. Pág 244, JUL/AGO/SET, 2017.
- **Barbosa, G.M.**; Cunha, J.E.; Martinho, L.B.; Machanocker, D.H.; Castro, P.A.T.S.; Salvini, T.F. A crioterapia não altera a nocicepção, função e inflamação na osteoartrite do joelho de ratos induzida por transecção do ligamento cruzado anterior. Modalidade: pôster. I Congresso Internacional e II Congresso Brasileiro da ABRAFITO – Brasília. Revista Inspirar – movimento & saúde (ISSN 2175-537X). Suplemento 1. Vol. 9. N°3. Pág 64 Ed43. JUL/AGO/SET, 2017.
 - Luiz, B.L.F.; Martinho, L.B.; **Barbosa, G.M.**; Castro, P.A.T.S.; Cunha, J.E.; Silva, A.C.A.; Salvini, T.F. Sinais e sintomas inflamatórios da osteoartrite do joelho de rato induzida por transecção do ligamento cruzado anterior. Modalidade: pôster. XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar, São Carlos, São Paulo, 2018. Publicado nos Anais do XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar (ISBN: 978-85-94099-04-4).
 - Martinho, L.B.; **Barbosa, G.M.**; Luiz, B.L.F.; Cunha, J.E.; Silva, A.C.A.; Castro, P.A.T.S.; Salvini, T.F. A crioterapia reduz a inflamação sinovial no joelho de rato com osteoartrite. Modalidade: pôster. XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar, São Carlos, São Paulo, 2018. Publicado nos Anais do XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar (ISBN: 978-85-94099-04-4).
 - Breda, C.C.; Dantas, L.O.; Serrao, P.R.M.S.;Albuquerque-Sendín F.; Jorge, A.E.S.; **Barbosa, G.M.**; Salvini, T.F. A crioterapia e o placebo a curto prazo melhoram a dor e a função física em indivíduos com osteoartrite do joelho – Ensaio Clínico Randomizado Placebo Controlado. Modalidade: pôster. XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar, São Carlos, São Paulo, 2018. Publicado nos Anais do XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar (ISBN: 978-85-94099-04-4).
 - Cunha, J.E.; **Barbosa, G.M.**; Castro, P.A.T.S.;Russo, T.L.; Vasilceac, F.A.; Cunha, T.M.; Salvini, T.F. Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. OARSI World Congress on Osteoarthritis. Toronto/Canadá. Osteoarthritis and Cartilage 27 (2019) S373 – S516.
 - **Barbosa, G.M.**; Cunha, J.E.; Castro, P.A.T.S.; Cunha, T.M.; Oliveira, F.F.B.; Cunha, F.Q.; Ramalho, F.S.; Salvini, T.F. Clinical-like Cryotherapy Improves gait function and reduces synovial inflammation in rats with knee osteoarthritis. OARSI World Congress on Osteoarthritis. Toronto/Canadá. Osteoarthritis and Cartilage 27 (2019) S373 – S516.

- Cunha, J.E.; **Barbosa, G.M.**; Castro, P.A.T.S.; Cunha, T.M.; Salvini, T.F. Osteoartrite do joelho induz atrofia e remodelamento da junção neuromuscular de rato após a transecção do ligamento cruzado anterior. Pôster eletrônico. II Congresso Internacional e III Congresso Brasileiro da ABRAFITO – Belo Horizonte/MG. In: Anais do Congresso Internacional e Congresso Brasileiro da ABRAFITO, 2019.
- **Barbosa, G.M.**; Cunha, J.E.; Cunha, T.M.; Castro, P.A.T.S.; Martinho, L.B.; Salvini, T.F. Trinta dias após a transecção do ligamento cruzado anterior são suficientes para induzir a dor, déficits funcionais e aumento de sinais inflamatórios relacionados a osteoartrite do joelho de rato. II Congresso Internacional e III Congresso Brasileiro da ABRAFITO – Belo Horizonte/MG. Pôster eletrônico. In: Anais do Congresso Internacional e Congresso Brasileiro da ABRAFITO, 2019.

ANEXO I



Germanna de Medeiros Barbosa <germannamb@gmail.com>

Receipt of Manuscript SREP-18-49895 > Caixa de entrada x



scirep.admin@nature.com

31 de dez de 2018 14:15 ☆ ↶ ⋮

para eu ▾

Dear Ms Barbosa,

Thank you for uploading your manuscript files to [Scientific Reports](#). We have successfully received your files and your manuscript has been assigned the tracking number: SREP-18-49895. Please quote this tracking number in the subject line of any correspondence.

Your manuscript is now at our initial Quality Check stage where we check for adherence to the journal's submission guidelines, including any relevant editorial and publishing policies, prior to approval of your submission. This is to ensure that all information required by the Editorial Board Member and for the peer review process is present. If there are any points that need to be addressed prior to submission you will receive a detailed email shortly. Once your manuscript has been approved for submission, you will receive email confirmation.

Many thanks,
Manuscript Administration
[Scientific Reports](#)
4 Crinan Street
London N1 9XW
E-mail: SciRep.admin@nature.com



Germanna de Medeiros Barbosa <germannamb@gmail.com>

Manuscript SREP-18-49895 peer review > Caixa de entrada x



scientificreports@nature.com

qua, 20 de mar 08:20 ☆ ↶ ⋮

para eu ▾

Dear Ms Barbosa,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Clinical-like cryotherapy improves gait function and reduces synovial inflammation in rats with knee osteoarthritis" to [Scientific Reports](#). I am pleased to inform you that, after an initial assessment, your manuscript will be peer reviewed. We are now in the process of contacting referees.

We will contact you after we have received our referees' comments.

Best regards,

Manuscript Administration
[Scientific Reports](#)
4 Crinan Street
London N1 9XW
E-mail: scientificreports@nature.com



Germanna de Medeiros Barbosa <germannamb@gmail.com>

Manuscript SREP-18-49895A with reviewers > Caixa de entrada x



scientificreports@nature.com

sex, 14 de jun 06:13 ☆ ↶ ⋮

para eu ▾

Dear Ms Barbosa,

Thank you for submitting your revised manuscript entitled "Clinical-like cryotherapy improves footprint patterns and reduces synovial inflammation in rats with knee osteoarthritis" to [Scientific Reports](#). I am pleased to inform you that we have returned it to our Editorial Board Member for further consideration.

Best regards,

Manuscript Administration
[Scientific Reports](#)
4 Crinan Street
London N1 9XW
E-mail: scientificreports@nature.com

ANEXO II



Germanna de Medeiros Barbosa <germannamb@gmail.com>



INRE-D-19-00345 - Submission Confirmation >

ter, 30 de jul 13:23 (há 20 horas) ☆ ↶ ⋮

Inflammation Research (INRE) <em@editorialmanager.com>

para eu ▾

Dear Mrs Barbosa,

Thank you for submitting your manuscript, Thirty days after anterior cruciate ligament transection is sufficient to induce pain, functional impairment and synovial inflammation related to knee osteoarthritis in rats, to Inflammation Research.

The submission id is: INRE-D-19-00345

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's website.

Your username is: germanna

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/inre/>

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,
Springer Journals Editorial Office
Inflammation Research

ANEXO III



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DA CRIOTERAPIA NA OSTEOARTRITE DO JOELHO DE RATOS INDUZIDA POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR: AVALIAÇÃO DA HIPERALGESIA, FUNÇÃO E MARCADORES INFLAMATÓRIOS", protocolada sob o CEUA nº 7949291116, sob a responsabilidade de **Tânia de Fátima Salvini** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 08/02/2017.

We certify that the proposal "EFFECTS OF CRYOTHERAPY ON KNEE OSTEOARTHRITIS IN RATS INDUCED BY ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT TRANSECTION: EVALUATION OF HYPERALGESIA, FUNCTION AND INFLAMMATORY MARKERS", utilizing 90 isogenic rats (90 males), protocol number CEUA 7949291116, under the responsibility of **Tânia de Fátima Salvini** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 02/08/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 01/2017 a 01/2018

Área: **Centro de Ciências Biológicas E da Saúde**

Origem: **Biotério Central da UFSCar**

Espécie: **Ratos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **7 a 8 semanas**

N: **90**

Linhagem: **wistar**

Peso: **120 a 250 g**

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos