ERIC DANILO PAULS SOTELO

Avaliação dos efeitos *in vitro* do Dimetilsulfóxido em células sinoviais de equinos e de sua utilização intra-articular como tratamento para sinovite aguda

São Paulo

2019

ERIC DANILO PAULS SOTELO

Avaliação dos efeitos *in vitro* do Dimetilsulfóxido em células sinoviais de equinos e de sua utilização intra-articular como tratamento para sinovite aguda

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Raquel Yvonne Arantes Baccarin

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3825
FMVZ

Sotelo, Eric Danilo Pauls
Avaliação dos efeitos in vitro do dimetilsulfóxido em células sinoviais de equinos e de sua utilização intra-articular como tratamento para sinovite aguda. / Eric Danilo Pauls Sotelo. – 2019.
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. DMSO. 2. LPS. 3. Equinos. 4. Líquido sinovial I. Título.

BIOÉTICA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos in vitro do Dimetilsulfóxido em células sinoviais de equinos e de sua utilização intra-articular como tratamento para sinovite aguda.", protocolada sob o CEUA nº 9265010817 (00 000208), sob a responsabilidade de **Raquel Yvone Arantes Baccarin** - 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 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 16/07/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the in vitro effects of Dimethyl sulfoxide on equine synovial cells and their intra-articular use as treatment for acute synovitis", utilizing 12 Equines (males and females), protocol number CEUA 9265010817 (00 000208), under the responsibility of **Raquel Yvone Arantes Baccarin** - 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 School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 07/16/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2017** a **08/2019** Área: **Clínica Médica Veterinária**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 a 22 anos**

N: **12**

Linhagem: **SRD**

Peso: **300 a 600 kg**

Local do experimento: HOVET/FMVZ/USP

São Paulo, 28 de janeiro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOTELO, Eric Danilo Pauls

Título: **Avaliação dos efeitos *in vitro* do Dimetilsulfóxido em células sinoviais de equinos e de sua utilização intra-articular como tratamento para sinovite aguda**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Minha MÃE, Erica Pauls, por me
orientar e apoiar para o meu
crescimento e busca dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo e professor Ivan Deconto, obrigado pela oportunidade de trabalhar e conviver ao seu lado, onde pude crescer na área profissional e pessoal, pela paciência e ensinamentos.

À minha orientadora Raquel Yvonne Arantes Baccarin, que aceitou o desafio de um novo projeto, acreditou e confiou no meu trabalho. Não posso esquecer do quanto pude crescer e aprender nesse tempo sob sua orientação, como também a sua paciência, ajuda e carinho no decorrer desses anos.

À professora Cristina Massoco, com quem pude aprender muito e que sempre me atendeu com muito carinho e paciência.

Aos meus amigos e professores, Carla B. Belli, Luís Claudio Lopes Correa da Silva, André L.V. de Zoppa, Julio Spagnollo.

À FMVZ-USP, pelos momentos e ensinamentos inesquecíveis do mestrado.

Às minhas companheiras de pós-graduação, Joice, Cynthia, Fernanda, Juliana, Sarah, Nubia, Fernando, que me ajudaram em todos os momentos, desde o cuidado com os cavalos, coletas e análises. Não posso dizer que alguém possui um carinho maior, mas também não posso deixar de reconhecer a atenção e os ensinamentos que recebi da Joice e da Cynthia nesse período de grandes conquistas e aprendizados.

Aos enfermeiros Marquinhos e Cícero pela amizade, companheirismo e ajuda nesses anos.

A minha Família e minha esposa, que sempre me ajudaram em todos os momentos.

Aos animais que, involuntariamente, ajudaram neste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento;” (Provérbios 3:13)

RESUMO

SOTELO, E. D. P. **Avaliação dos efeitos in vitro do Dimetilsulfóxido em células sinoviais de equinos e de sua utilização intra-articular como tratamento para sinovite aguda** 2019. f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

As lesões articulares na espécie equina causam inúmeras perdas econômicas e funcionais, com objetivo de minimizá-las vários estudos sobre técnicas e terapias são realizadas e se fazem necessárias. Acredita-se que o dimetilsulfóxido (DMSO) tenha ação moduladora nos processos inflamatórios articulares agudos e ação sobre radicais livres, porém sua eficácia ainda é dúbia. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do DMSO sobre células sinoviais e a lavagem articular com diferentes concentrações de DMSO (5% e 10%), em um modelo experimental de indução da sinovite aguda em equinos, com LPS. Para tanto, este estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa visou verificar o efeito do DMSO sobre células sinoviais, através da análise de viabilidade celular após a estimulação das células sinoviais pelo LPS e tratamento com o DMSO. Para a segunda etapa do estudo foram utilizadas 26 articulações tibiotársicas, distribuídas aleatoriamente em quatro grupos. Os grupos foram tratados e organizados da seguinte forma: grupo solução de ringer lactato; grupo DMSO 5% em solução de ringer lactato; grupo DMSO 10% em solução de ringer lactato; e Grupo controle (apenas indução da sinovite). Foram realizadas coletas do líquido sinovial (LS) antes da infiltração das articulações com LPS, na dose de 0,5 ng (M0), após 1h (M1), antes das lavagens (M8), e após 24h e 48h (M24 e M48) da indução da sinovite, as amostras de LS foram utilizadas para contagem total de células nucleadas e diferenciação celular, quantificação de PGE₂, interleucina-1 β , interleucina-6, TNF- α , AH, CS, ureia, proteína total e análise do *burst* oxidativo. As células sinoviais estimuladas por LPS e tratadas com DMSO 5% apresentaram menor porcentagem de células viáveis após vinte e quatro horas, entretanto após 48h somente as células tratadas com ringer lactato apresentaram menor porcentagem de células viáveis. O equipamento Lameness Locator® foi utilizado para verificar a presença de dor articular, previamente a todas coletas. Todos os grupos apresentaram aumento na contagem total de células nucleadas, concentração de PGE₂, IL-1 β , IL-6 e proteína total no M8. Sendo que os grupos DMSO 5% e DMSO 10% apresentaram diminuição da contagem total de células nucleadas após a

lavagem articular. A concentração de PGE₂ e IL-1 β no grupo DMSO 10% foi menor no M48 em relação ao M8, e o grupo ringer lactato apresentou menor concentração de IL-1 β que os grupos DMSO 5% e controle no M24. O grupo DMSO 10% apresentou menor concentração de IL-6 em relação aos grupos DMSO 5% e ringer lactato no momento 24. O TNF- α apresentou aumento em todos os grupos no M1. Os grupos DMSO 10% e controle apresentaram menor concentração de TNF- α nos M24 e M48 em relação ao M1. Os grupos DMSO 5% e controle não apresentaram diferença na concentração de IL-10, porém os grupos ringer lactato e DMSO 10% apresentaram maior concentração no M48. Os grupos DMSO 10% e ringer lactato apresentaram menor concentração de AH no M24. Todos os grupos apresentaram aumento da concentração de CS após as lavagens articulares. Não houve diferença na avaliação de dor articular, bem como na análise do *burst* oxidativo e concentração de ureia. Os diferentes grupos apresentaram similaridade de comportamento das células e citocinas estudadas no líquido sinovial ao longo do experimento, contudo o grupo DMSO 10% foi o que apresentou mais rapidamente o retorno próximo aos valores basais. Os resultados apresentados neste estudo permitem concluir que frente à necessidade de se realizar lavagens articulares a utilização de solução de ringer lactato com DMSO 10% é mais indicada que o uso de ringer lactato ou solução com DMSO a 5%. Entretanto, nenhum tratamento foi capaz de demonstrar efeito condroprotetor.

Palavras-chave: DMSO. LPS. Equinos. Sinovite. Líquido sinovial.

ABSTRACT

SOTELO, E. D. P. Evaluation of the in vitro effects of dimethyl sulfoxide on equine synovial cells and its intraarticular use as a treatment for acute synovitis 2019. f. Dissertation (Master of Science) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2019.

Joint injuries in the equine species cause numerous economic and functional losses, in order to minimize them, several studies on techniques and therapies are performed and are necessary. Dimethylsulfoxide (DMSO) is thought to have modulating action on acute joint inflammatory processes and action on free radicals, but its efficacy is still dubious. This study aimed to evaluate the effects of DMSO on synovial cells and joint lavage with different concentrations of DMSO (5% and 10%) in an experimental model of induction of acute synovitis in horses with LPS. Therefore, this study was divided into two steps. The first step aimed to verify the effect of DMSO on synovial cells by analyzing cell viability after stimulation of synovial cells by LPS and treatment with DMSO. For the second stage of the study, 26 tibiotarsal joints were used, divided into four groups. The groups were treated and organized as follows: ringer lactate solution group; 5% DMSO group in ringer lactate solution; 10% DMSO group in ringer lactate solution; and Control group (synovitis induction only). Synovial fluid (LS) was collected prior to infiltration of the joints with LPS at a dose of 0.5 ng (M0), after 1h (M1), before washes (M8), and after 24h and 48h (M24 and M48), from synovitis induction. LS samples were used for total nucleated cell count and cell differentiation, PGE₂ quantification, interleukin-1 β , interleukin-6, TNF- α , HA, CS, urea, total protein and *burst* oxidative analysis. The synovial cells stimulated by LPS and treated with DMSO 5% presented lower percentage of viable cells after 24 hours, however after 48h only the cells treated with Ringer lactate showed lower percentage of viable cells. Lameness Locator® equipment was used to verify the presence of joint pain, prior to all collections. All groups showed an increase in total nucleated cell count, PGE₂, IL-1 β , IL-6 and total protein in M8. The DMSO 5% and DMSO 10% groups showed a decrease in the total nucleated cell count after joint washing. The concentration of PGE₂ and IL-1 β in the 10% DMSO group was lower in M48 compared to M8, and the ringer lactate group presented lower IL-1 β concentration than the 5% DMSO and control groups in M24. The 10% DMSO group showed lower IL-6 concentration compared to the 5% DMSO and ringer lactate groups at time 24. TNF- α increased in all groups at M1. The 10% DMSO and control groups presented lower TNF- α concentration in M24 and M48 in relation to M1. The 5% DMSO and control groups showed no difference in IL-10 concentration, but the ringer lactate and 10%

DMSO groups showed higher concentration in M48. The DMSO 10% and ringer lactate groups presented lower HA concentration in M24. All groups showed increased concentration of CS after joint washes. There was no difference in joint pain evaluation, oxidative burst analysis and urea concentration. The different groups showed similarity of behavior of cells and cytokines studied in the synovial fluid throughout the experiment, however the 10% DMSO group showed the fastest return near basal values. The results presented in this study allow us to conclude that in view of the need to perform joint washes, the use of 10% DMSO lactated ringer's solution is better than the use of 5% DMSO lactated ringer's solution. However, no treatment was able to demonstrate chondroprotective effect.

Keywords: DMSO. LPS. Equine. Synovitis. Synovial fluid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coleta de líquido sinovial da articulação tibiotársica esquerda, pelo acesso medial no momento 8 horas. Fonte: SOTELO (2019).	42
Figura 2 - Momento 8 horas, posicionamento das agulhas para realização da lavagem da articulação tibiotársica esquerda. Fonte: SOTELO (2019).	43
Figura 3- Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 0, 1, 8 e 24 horas realizados em duplicata, do grupo controle. Fonte: SOTELO (2019)	58
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 48 horas realizados em duplicata (M48a: DMSO 10%; M48b: DMSO 5%; M48c: Ringer Lactato; M48d: DMSO 10%). Fonte: SOTELO (2019)	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média da soma de vetores na avaliação realizada pelo equipamento Lameness Locator®, (claudicação) dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo – 2019.....	50
Gráfico 2 - Média da contagem total de células nucleadas presentes no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	51
Gráfico 3 – Valor médio de leucócitos mononucleares presentes no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo – 2019	52
Gráfico 4 – Valor médio de leucócitos polimorfonucleares presentes no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo – 2019	52
Gráfico 5 - Concentração média de PGE ₂ presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	53
Gráfico 6 - Concentração média de IL-1 β presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	54
Gráfico 7 - Concentração média de IL-6 presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	55
Gráfico 8 - Concentração média de IL-10 presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	56
Gráfico 9 - Concentração média de TNF- α presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	57
Gráfico 10 - Concentração média de AH presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	59
Gráfico 11 - Concentração média de CS presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	60
Gráfico 12 – Média de intensidade de fluorescência de neutrófilos do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos, representação entre os grupos – São Paulo - 2019.....	61
Gráfico 13 - Média de intensidade de fluorescência de neutrófilos do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos, representação entre os momentos – São Paulo - 2019	61
Gráfico 14 – Média de intensidade de fluorescência de células mononucleares do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos, representação entre os grupos – São Paulo - 2019.....	61

Gráfico 15 - Média de intensidade de fluorescência de células mononucleares do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos, representação entre os momentos – São Paulo - 2019	62
Gráfico 16 – Concentração média de ureia presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	62
Gráfico 17 – Concentração média de proteína presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019	63

LISTA DE TABELAS

Quadro 1 - Tratamento instituído às células sinoviais – São Paulo – 2019.	38
Tabela 2– Randomização dos tratamentos e articulações utilizadas – São Paulo – 2019.	40
Tabela 3 – Porcentagem de células sinoviais viáveis após 24 horas do estímulo com LPS e respectivos tratamentos.....	49
Tabela 4 - Porcentagem de células sinoviais viáveis 48 horas após estímulo com LPS e respectivos tratamentos.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tratamento instituído às células sinoviais – São Paulo – 2019.	38
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
AH	Ácido hialurônico
CS	Condroitim sulfato
CD44	Molécula de adesão pertencente à família glicoproteínas transmembranas
Da	Dalton
DMB	Azul de 1,9-dimetilmetileno
DMSO	Dimetilsulfóxido
dl	Decilitro
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
EROs	Espécies reativas do oxigênio
GAG	Glicosaminoglicano
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IKK	Inibidor da quinase κB
IκB	Inibidor do NF-κB
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-1ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IRAK-M	Quinase associada ao receptor IL-1
kDa	Quilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LS	Líquido sinovial
M	Molar
MAP	Proteína ativada por mitógenos
MDA	Malondialdeído
MPK-1	Proteína quinase ativada por fosfatase -1
mg	Miligrama
MIF	Média de intensidade de fluorescência
ml	Mililitro
mm	Milímetros
MKP-1	Mitógeno da proteína quinase ativada fosfatase-1
MMP	Metaloproteinase
ng	Nanograma
NF-κB	Fator nuclear κB
OA	Osteoartrite
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Proteoglicanos

pH	Potencial de hidrogênio
TAK-1	Quinase 1 ativadora do fator de crescimento β
TLR4	Receptor <i>toll-like</i> 4
TRAF-6	Fator de necrose tumoral associado ao receptor do fator 6
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 ARTICULAÇÃO SINOVIAL	24
2.2 SINOVITE	25
2.3 SINOVITE EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA	26
2.4 DIMETILSÚLFOXIDO	27
2.5 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS.....	29
2.6 MEDIADORES ANTI-INFLAMATÓRIOS	31
2.7 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO	32
3 JUSTIFICATIVA	34
4 OBJETIVOS	35
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1 EXPERIMENTO 1	36
5.1.1 Coleta do líquido sinovial	36
5.1.2 Cultivo celular	36
5.1.3 Dissociação enzimática	37
5.1.4 Plaqueamento das células e tratamentos	37
5.1.5 Viabilidade celular	38
5.2 EXPERIMENTO 2	38
5.2.1 Animais	39
5.2.2 Critérios de inclusão	40
EXAME CLÍNICO PARA SELEÇÃO DOS ANIMAIS	40
AVALIAÇÃO CLÍNICA	40
EXAME ULTRASSONOGRÁFICO	41
EXAME RADIOGRÁFICO	41
5.2.3 Indução da sinovite com LPS	41
5.2.4 Lavagem articular	42
5.2.5 Análise do líquido sinovial	43
5.2.5.1 Coleta do líquido sinovial	43

5.2.5.2 <i>Processamento do líquido sinovial</i>	44
5.2.5.3 <i>Contagem total e diferencial de células</i>	44
5.2.5.4 <i>Determinação da PGE₂</i>	44
5.2.5.5 <i>Determinação dos glicosaminoglicanos (GAGs)</i>	45
5.2.5.6 <i>Análise do burst oxidativo por citometria de fluxo</i>	46
5.2.5.7 <i>Determinação da IL-1β, IL-6, IL-10 e TNF-α</i>	47
5.2.5.8 <i>Determinação de ureia e proteína total</i>	47
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
7 RESULTADOS	49
7.1 VIABILIDADE CELULAR	49
7.2 ANÁLISE DE CLAUDICAÇÃO	50
7.3 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS.....	50
7.4 PROSTAGLANDINA E ₂	53
7.5 DETERMINAÇÃO DA IL-1B.....	54
7.6 DETERMINAÇÃO DA IL-6.....	55
7.7 DETERMINAÇÃO DA IL-10.....	56
7.8 DETERMINAÇÃO DA TNF-A.....	57
7.9 DETERMINAÇÃO DOS GAGS	58
7.9.1 <i>Concentração de AH</i>	59
7.9.2 <i>Concentração de CS</i>	60
7.10 ANÁLISE DO BURST OXIDATIVO.....	61
7.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE UREIA	62
7.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	63
8 DISCUSSÃO	64
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICES	76

1 INTRODUÇÃO

A prevalência de lesões articulares em cavalos atletas representa enormes perdas econômicas, além da aposentadoria precoce destes animais. Estresses biomecânicos, oriundos de exercícios intensos, resultam frequentemente em lesões musculoesqueléticas, especialmente nas articulações sinoviais. Essas lesões tornam-se um desafio fisiológico, na medida em que ultrapassam os limites de capacidade do organismo em responder a tal estresse. Desta forma a prevenção, diagnóstico, tratamento e prognóstico de lesões articulares, demandam grande interesse científico.

O trauma articular frequente é tido como fator primário para sinovite e capsulite. Na presença de inflamação sinovial, os sinoviócitos podem liberar enzimas de degradação e citocinas, que alteram o ambiente articular. Atualmente a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a prostaglandina E₂ (PGE₂), são consideradas como os principais mediadores inflamatórios da doença articular em cavalos (SELLAM; BERENBAUM, 2010).

A relevância no tratamento da sinovite se deve a redução dos efeitos deletérios da inflamação, incluindo a dor e redução de função, como também a prevenção do desenvolvimento de osteoartrite (OA); uma das principais afecções que acometem os equinos, chegando a 60% das causas de claudicações e aposentadoria precoce em cavalos atletas (MCILWRAITH; FRISBIE; KAWCAK, 2013).

Além dos exames de imagem comumente utilizados para diagnosticar as doenças articulares, é crescente o emprego de análises do líquido sinovial (TULAMO; BRAMLAGE; GABEL, 1989; FONSECA et al., 2009; MACHADO et al., 2012). O uso desta ferramenta se justifica pelo papel fundamental no funcionamento e homeostase articular, como também sinalizar eventos metabólicos e inflamatórios do tecido articular (VAN DEN BOOM et al., 2004).

O Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente orgânico comum, utilizado em pesquisas *in vitro* e *in vivo*. Em 1961, relatou-se, pela primeira vez, sua capacidade de proteger sistemas celulares de efeitos radioativos, e dos efeitos de criopreservação (ASHWOOD-SMITH, 1967). Brayton (1986) afirma que o DMSO possui características antimicrobianas, analgésicas, anti-inflamatórias e ação contra radicais livres. Devido sua propriedade sobre os radicais livres, o DMSO pode atuar de forma positiva, neutralizando os efeitos citotóxicos e suprimindo a produção de PGE₂ pelo oxigênio derivado de radicais livres.

Poucos são os estudos que avaliam os efeitos do DMSO nas estruturas intra-articulares, apesar de ser um fármaco muito utilizado pelos médicos veterinários no tratamento de afecções

articulares. Os efeitos do uso intra-articular de DMSO em equinos foram inicialmente estudados em modelo de sinovite quimicamente induzida com monoiodoacetato de sódio em articulações intercápicas. Como tratamento foi utilizada solução a 40% de DMSO em ringer lactado, e comparado com o uso intra-articular de ringer lactato. Os autores observaram aumento do número de leucócitos e da concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial de ambos os grupos, sem diferença no grau de claudicação (WELCH et al., 1991). Outro estudo, utilizando articulações carpianas e társicas híginas de equinos, demonstrou que lavagens articulares com solução a 10% de DMSO em ringer lactato ou solução a 30% de DMSO em ringer lactato induziram alterações inflamatórias similares nas estruturas articulares, especificamente aumento do número de leucócitos e da concentração de proteína no líquido sinovial, sem evidências de alterações macroscópicas, histopatológicas e histoquímicas (ADAIR et al., 1991).

Já em outro modelo de sinovite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em articulações do intercápicas de equinos observou-se diminuição da contagem de leucócitos no líquido sinovial, principalmente neutrófilos, quando foi utilizada formulação de DMSO em gel tópico (15g; 90%) (SMITH et al., 1998).

Smith et al. (2000), em estudo *in vitro* usando cultura de explantes de cartilagem expostos à diferentes concentrações de DMSO (1% a 20%) observaram que lavagens com concentrações maiores que 5% de DMSO, causaram supressão do metabolismo da matriz cartilagínea.

Diante do exposto observamos que a concentração ideal de DMSO intra-articular a ser utilizada, para que sejam observados efeitos benéficos anti-inflamatórios e anti-oxidantes, e que ao mesmo tempo não apresentem danos ao metabolismo da matriz cartilagínea, ainda não é consensual e necessita ser estabelecida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARTICULAÇÃO SINOVIAL

As articulações sinoviais consistem em estruturas ósseas cobertas por cartilagem articular, fixadas por uma cápsula e ligamentos, sendo banhada pelo líquido sinovial. Quatro camadas histológicas compõem a cartilagem hialina; a camada superficial ou tangencial, a camada intermediária ou de transição, a camada profunda e a camada de cartilagem mineralizada (PALMER; BERTONE, 1994a). Cada camada possui um número variável de condrócitos em diferentes disposições, variando em formas, tamanhos e funções (MARTIN; BUCKWALTER, 2012). Outros componentes cartilagineos estão presentes, compondo sua estrutura e função, os proteoglicanos (PG), glicosaminoglicanos (GAG), colágeno e proteínas não colágenas (STEEL, 2008). Estes componentes conferem à cartilagem articular as características de resistência às cargas compressivas, sendo os principais responsáveis pela homeostase do ambiente articular (VAN WEEREN; BRAMA, 2003).

Os condrócitos orquestram a síntese, organização e regulação destes componentes na matriz extracelular (ECM). Estes processos são influenciados por diversos fatores, incluindo a composição da ECM, carga mecânica, fatores de crescimento e citocinas (MARTIN; BUCKWALTER, 2012). Semelhante às camadas articulares, os componentes da ECM determinam as propriedades físicas da cartilagem articular. O colágeno tipo II é o principal componente da ECM, sintetizado pelos condrócitos, confere à cartilagem articular propriedades de resistência e absorção de choque, o que a torna essencial para o equilíbrio articular.

Os PGs consistem em um núcleo de proteína de uma ou mais cadeias de GAGs, ocupando os espaços entre as fibras de colágenos, conferindo maior resistência a cargas compressivas (GARVICAN et al., 2010). Os PGs da ECM podem ser descritos em duas principais categorias: alto peso molecular, e baixo peso molecular. O agrecan é o proteoglicano de alto peso molecular de maior destaque na cartilagem hialina, composto por um centro proteico linear ao qual um grande número de cadeias de GAGs se liga (PALMER; BERTONE, 1994a; GARVICAN et al., 2010). Os PGs de baixo peso molecular são macromoléculas que se ligam a colágenos, fatores de crescimento e outras macromoléculas, desempenhando funções de estabilização e regulação dos espaços interfibrilares nas fibrilas de colágeno. Pertencem a esse grupo o decorin, biglican e o fibromodulin (BOSMAN; STAMENKOVIC, 2003).

Os GAGs encontrados na cartilagem articular compondo os agregados de PGs são o AH, condroitim sulfato (CS), queratam sulfato e dermatam sulfato. A principal característica

dos GAGs é a capacidade de expandir a matriz do colágeno com a presença de água, auxiliando na resistência de cargas compressivas. O CS é responsável pela alta concentração de GAG sulfatado no LS, sendo um importante biomarcador da síntese de agrecan (PALMER; BERTONE, 1994a). Já o AH é o único GAG não sulfatado, consistindo em uma molécula longa e sem cadeias. O AH é capaz de sinalizar alterações inflamatórias articulares. A sua diminuição no LS, é associada à diminuição da produção pelos sinoviócitos e sua degradação pela hialuronidase (PALMER; BERTONE, 1994a).

2.2 SINOVITE

A sinovite é uma condição inflamatória encontrada comumente em animais jovens e adultos em fase de treinamento e de competições, sendo caracterizada pelo edema articular, que pode surgir pelo espessamento da sinóvia ou efusão do líquido sinovial e dor, que pode estar presente com existência de claudicação (SELLAM; BERENBAUM, 2010). Em resposta à insultos agudos ou crônicos, a articulação sinovial sofre alterações na sua estrutura e em sua composição, representando respostas fisiológicas para reparação aos danos gerados pelos mesmos (PALMER; BERTONE, 1994a).

A membrana sinovial consiste em tecido conjuntivo composto por uma fina camada de sinoviócitos tipo A (células semelhantes aos macrófagos), responsáveis pela regulação das respostas inflamatórias e imunológicas, e os sinoviócitos tipo B (semelhantes aos fibroblastos), responsáveis pela secreção do AH, ambas atuam na manutenção dos componentes essenciais do líquido sinovial e controlando o tráfego de moléculas do espaço articular (PALMER; BERTONE, 1994a). Diante disso as agressões à membrana sinovial alteram a sua permeabilidade e comprometem suas funções secretoras, consequentemente alterando o líquido sinovial. É importante ressaltar que a membrana sinovial é fonte de liberação direta de PGE_2 , espécies reativas de oxigênio (EROs), metaloproteinases (MMPs), agrecanases e citocinas como $TNF-\alpha$ e interleucinas, que em resposta a uma agressão aumentam sua secreção, contribuindo para degradação da cartilagem articular (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; TEW; HOTCHKISS, 1981).

O líquido sinovial das articulações é considerado um ultrafiltrado do plasma, liberado pelas células sinoviais, que possui a função de carrear nutrientes celulares e citocinas, além de sua propriedade viscosa e elástica pela presença do ácido hialurônico (TEW; HOTCHKISS,

1981). Sendo assim, é possível dizer que seus componentes agem diretamente sobre a superfície articular e atividade de condrócitos (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

2.3 SINOVITE EXPERIMENTALMENTE INDUZIDA

A sinovite tem uma íntima relação com o desenvolvimento da OA, tal informação é atribuída a uma persistente liberação, acima do normal, dos mediadores inflamatórios, responsáveis pela degradação articular, como a PGE₂, MMPs, citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) (SELLAM; BERENBAUM, 2010). Modelos experimentais em equinos são utilizados há décadas, pela semelhança nas desordens articulares com humanos. A grande vantagem de se utilizar os equinos se dá pela facilidade em obter o líquido sinovial, sem necessidade de indução anestésica e lavagens articulares para sua obtenção. Diversos modelos experimentais de indução da sinovite em equinos foram avaliados, para elucidar potenciais benefícios terapêuticos. O uso de LPS, é um modelo bem estabelecido para indução de inflamação estéril localizada e transitória, bem como para estudar sinais clínicos, avaliação de tratamentos medicamentos e/ou dos seus efeitos (PALMER; BERTONE, 1994a; DE GRAUW; VAN DE LEST; VAN WEEREN, 2009; ROSS et al., 2012).

Com o objetivo de avaliar duas formulações de celecoxib, Cokelaere et al., (2018) utilizou modelo múltiplo de indução da sinovite com LPS, com três aplicações intra-articulares em um período de cinco semanas. Durante este período, análises do LS foram realizadas. Os resultados clínicos e biológicos evidenciaram uma resposta inflamatória persistente e de baixo nível, durante as cinco semanas.

Ross et al. (2012) comparou a indução da sinovite em doze éguas, utilizando 0.5 ng de LPS diluídas em 1 mL e outro grupo utilizando 100 ng de interleucina recombinante equina 1 β . Coletas de líquido sinovial foram realizadas com 0, 4, 8 e 240 horas após a indução inflamatória. Os resultados do estudo demonstraram que o modelo experimental de indução da sinovite com LPS ou reIL-1 β resultaram em inflamação transitória, expressando aumento na contagem total de células do líquido sinovial, contagem de neutrófilos, concentração de proteína total, concentração de PGE₂, e MMPs, após oito horas da injeção intra-articular, quando comparados ao grupo controle.

Outro estudo utilizando 6 cavalos com uma única injeção intra-articular de LPS 0.5 ng, foi realizado a fim de investigar os efeitos da inflamação induzida por LPS sobre os biomarcadores do líquido sinovial. Os autores observaram um pico de liberação de PGE₂ com

8 horas após a indução, enquanto a substância P, atividade de MMP e a concentração de bradicinina apresentaram maior aumento as 8 e 24 horas. Em 8 horas após a injeção intra-articular de LPS foi possível observar alterações de biomarcadores do líquido sinovial, alterações de marcha e sinais clínicos de sinovite, como claudicação e efusão articular (DE GRAUW, VAN DE LEST, & VAN WEEREN, 2009).

Neuenschwander (2016), utilizou o LPS em articulações de equinos com intuito de avaliar os efeitos da aplicação intra-articular de AH de difentes pesos moleculares. A aplicação de 0,25 ng de LPS, resultou em acréscimo significativo de biomarcadores articulares e alterações sistêmicas. Como observado por outros autores, o pico inflamatório, decorrente do uso de LPS intra-articular foi observado com 8 horas após a aplicação, sendo que as alterações sistêmicas observadas pelo autor, retornaram aos níveis basais após 48 horas.

2.4 DIMETILSÚLFÓXIDO

O Dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente orgânico comum, utilizado na indústria madeireira. A sua fórmula química é $(CH_3)_2SO$, formando uma estrutura piramidal e seu peso molecular é de 78 g/mol. A concentração do DMSO é de 99,9%, sendo que quando exposto ao ambiente, passa para concentrações de 66% a 67%, devido a sua característica higroscópica, derivada de sua atração por moléculas de hidrogênio (PATIL, 2013). Este composto é comumente utilizado em experimentos *in vitro* e *in vivo* (COLUCCI et al., 2008).

Apesar de ser conhecido desde o século XIX, onde era utilizado na indústria madeireira, somente em 1961, relatou-se, pela primeira vez, sua capacidade de proteger sistemas celulares de efeitos radioativos, e dos efeitos de criopreservação (ASHWOOD-SMITH, 1967; HILLIDGE, 1985).

O DMSO é capaz de atravessar barreiras celulares e membranas biológicas com facilidade, sendo utilizado em formulações tópicas e como adjuvante ou carreador de outras substancias terapêuticas (SMITH et al., 1998; COLUCCI et al., 2008). Desde então vem sendo utilizado em diversos estudos laboratoriais e clínicos, como no transporte através de membranas teciduais, criopreservação de células, terapêutica anti-inflamatória local e sistêmica, incluindo afecções sépticas (JOHN; LAUDAHN, 1967; SANTOS et al., 2003; ELMALI et al., 2006; KAY et al., 2015; PICOLI et al., 2015).

Diversos autores afirmam que o DMSO possui características crioprotetoras, antimicrobianas, analgésicas, anti-inflamatórias e ação contra radicais livres. O efeito do

DMSO sobre os radicais livres ocorre através da diminuição da vida de radical hidroxila (OH) e consequentemente menores efeitos deletérios (REPINE et al., 2008; NATARAJAN et al., 2010). Devido sua propriedade sobre os radicais livres, o DMSO pode atuar neutralizando os efeitos citotóxicos e suprimindo a produção de PGE₂ pelo oxigênio derivado de radicais livres. O seu uso intra-articular em equinos, justifica-se devido à sua propriedade anti-inflamatória e ação contra radicais livres em doenças articulares inflamatórias.

Poucos são os estudos que avaliam os efeitos do DMSO nas estruturas intra-articulares, apesar de ser um fármaco muito utilizado pelos médicos veterinários no tratamento de afecções articulares. Os efeitos do uso intra-articular de DMSO em equinos foram inicialmente estudados em modelo de sinovite quimicamente induzida com monoiodoacetato de sódio em articulações intercárpicas. Como tratamento foi utilizada solução a 40% de DMSO em ringer lactado, e comparado com o uso intra-articular de ringer lactato. Os autores observaram aumento do número de leucócitos e da concentração de ácido hialurônico no líquido sinovial de ambos os grupos, sem diferença no grau de claudicação (WELCH et al., 1991). Outro estudo utilizando articulações carpianas e társicas hígdas de equinos, demonstrou que lavagens articulares com ringer lactato, com solução a 10% de DMSO em ringer lactato e solução a 30% de DMSO em ringer lactato induziram alterações inflamatórias similares nas estruturas articulares, especificamente aumento do número de leucócitos e da concentração de proteína no líquido sinovial. Não foram encontradas alterações macroscópicas, histopatológicas e histoquímicas entre os grupos tratados e o controle (ADAIR et al., 1991).

Já em outro modelo de sinovite induzida por LPS em articulações intercárpicas de equinos observou-se diminuição do número de leucócitos no líquido sinovial, principalmente neutrófilos, quando foi utilizada formulação de DMSO em gel tópico (15g; 90%) a cada 12 horas por 60 horas (SMITH et al., 1998). A presença de DMSO no líquido sinovial foi confirmada por cromatografia gasosa, e os autores concluíram que a quantidade de DMSO presente foi suficiente para diminuir a inflamação articular.

Em um estudo *in vitro* usando cultura de explantes de cartilagem expostos à diferentes concentrações de DMSO (1% a 20%) foi observado que lavagens com concentrações maiores que 5% de DMSO, causaram supressão do metabolismo da matriz cartilágnea. Contudo, a supressão da síntese de proteoglicanos e do metabolismo de lactato foi reversível e não resultou em morte de condrócitos, ou seja, o metabolismo aparentemente retornou à sua normalidade (SMITH et al., 2000).

2.5 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

A liberação de diferentes moléculas no ambiente articular, é um processo natural do organismo, estas representam produtos derivados de processos anabólicos e catabólicos, sendo que em processos inflamatórios agudos ou crônicos, o catabolismo se torna mais presente (LEIJS et al., 2012). Estas moléculas, também denominadas biomarcadores, são utilizadas como ferramenta de estudo, uma vez que em situações anormais do tecido articular as concentrações destes biomarcadores podem estar aumentadas ou diminuídas. Os biomarcadores detectados no líquido sinovial são originários da cartilagem articular, osso subcondral e sinóvia (KAPOOR et al., 2011).

Dentre os biomarcadores utilizados, as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10), a PGE₂, e as MMP's tem grande envolvimento na degradação articular (MCILWRAITH, 2005). A IL-1 β e o TNF- α são consideradas como as principais citocinas envolvidas na patogenia da OA, e são encontradas em maiores concentrações em estágios iniciais quando comparadas à lesões crônicas (SELLAM; BERENBAUM, 2010). Elas são liberadas pelos sinoviócitos e células mononucleares, que se ligam a receptores sinalizando a ativação de outros mediadores inflamatórios e fatores de degradação da matriz extracelular.

A IL-1 β é atribuída à destruição da ECM e à formação de tecido de reparo articular inadequado, pois quando ativada em grandes concentrações sinaliza a síntese e liberação de MMP's pelos condrócitos na cartilagem articular, que suprime a produção do agregan e colágeno tipo II (KAMM; NIXON; WITTE, 2010). Em cultivos de condrócitos, em diferentes espécies, a IL-1 β reduziu a expressão de colágeno tipo II (KAPOOR et al., 2011). Além disso induz a produção de PGE₂ e óxido nítrico pelas células sinoviais (DYSON, S.; ROSS, M., 2011). A sua ativação é mediada através de receptores específicos da IL-1 (IL-1RI e IL-1RII). A atividade da IL-1, pode ser inibida pelo seu antagonista natural, o IL-1Ra, também produzido pelos condrócitos e fibroblastos (KAPOOR et al., 2011).

O TNF- α representa outra citocina inflamatória aguda, envolvida nos estágios iniciais da doença articular em equinos. Como a IL-1 β , pode ativar a produção de proteases como também suprimir a síntese de moléculas constituintes da ECM pelos condrócitos (KAPOOR et al., 2011; DYSON, S.; ROSS, M., 2011). O TNF- α parece ter um efeito menor que a IL-1 β quando comparados, porém, há uma possível potencialização quando combinados. A supressão do TNF- α em articulações com OA, diminui o dano na cartilagem, quando comparado às articulações com TNF- α ativo (FERNANDES et al., 2002).

A sinalização da IL-6 é realizada através de receptores específicos (IL-6R), à semelhança da IL-1 β . Os condrócitos produzem baixas quantidades de IL-6, em condições normais, entretanto a IL-1 β e o TGF- β , estimulam sua produção. Os efeitos da IL-6 ainda não são bem estabelecidos. Estudos apontam a presença da IL-6 no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide e OA, como também a sua relação na degradação de colágeno tipo II e regulação de MMPs (KAPOOR et al., 2011).

São descritos níveis elevados de PGE₂ no líquido sinovial de articulações inflamadas. Esse mediador está envolvido em diversos eventos fisiológicos e patofisiológicos. A síntese da PGE₂ ocorre a partir da liberação do ácido araquidônico, que por sua vez é convertido em PGG₂ e PGH₂ pelas cicloxigenases (COX). A ativação de IL-1 β , promove a expressão da cicloxigenase-2 (COX-2), aumentando a produção de PGE₂ pelos condrócitos. A PGE₂ foi relacionada à degradação da ECM como também a diminuição da sua produção, e estimulação de MMPs, quando adicionada por via exógena em testes *in vitro* (WATANABE et al., 2009; ATTUR et al., 2014). A sua mensuração é utilizada como marcador objetivo do grau de inflamação, que pode ser realizada por radioimunoensaio, espectrofotometria de massa e *kits* comerciais de ELISA. A PGE₂ contribui para o desenvolvimento da doença articular, uma vez que causa inflamação sinovial, destruição da ECM, cartilagem e osso subcondral (SELLAM; BERENBAUM, 2010). A sua produção é dependente de duas enzimas, a COX-2 e a prostaglandina E sintase, ambas induzidas pela IL-1 β .

As MMPs são as principais responsáveis pela degradação da matriz cartilágnea, agindo nos componentes da ECM. Elas podem ser divididas em três subgrupos: as collagenases (MMP-1, 8 e 13), as collagenases/gelatinases do tipo IV (MMP-2 e 9) e as estromelisinases/proteoglicanases (MMP-3 e 10). Esse grupo de proteases é capaz de digerir grande parte da MEC e em doenças articulares altas concentrações de MMPs estão presentes no líquido sinovial (DYSON, S.; ROSS, M., 2011; MCILWRAITH, 2005). Estudos revelam níveis significativamente altos de MMP-1, MMP-3, MMP-9 e MMP-13 no osso subcondral, cartilagem e membrana sinovial de animais com OA (KAMM; NIXON; WITTE, 2010; OZLER, 2015). A expressão de MMP-13 é correlacionada com a liberação de TNF- α , porém em estudo realizado por Ozler (2015) a liberação de TNF- α isoladamente, não foi capaz de estimular a liberação de MMP-13 pelos condrócitos, indicando que outras citocinas estejam envolvidas na sinalização, como a IL-1 β .

O CS e o AH também podem ser utilizados como biomarcadores de degradação de PG e de degradação da ECM. No LS de articulações com OA, a concentração e o tamanho do AH estão alterados, possivelmente pela ação de EROs (DAVID-RAOUDI et al., 2009). Alterações

na sua concentração e no peso molecular diminuem significativamente a viscoelasticidade do líquido sinovial, bem como resultam em alterações da composição da ECM e função articular (KILBORNE; HUSSEIN; BERTONE, 2017). Em estudos recentes, a quantificação de CS e AH de articulações com OCD demonstrou ser eficiente em identificar alterações articulares (MACHADO et al., 2012, MACHADO et al., 2019).

As concentrações destas moléculas encontram-se aumentadas à medida que processos inflamatórios se estabelecem na articulação, uma vez que outras moléculas podem desencadear a sua sinalização e expressão (DAVID-RAOUDI et al., 2009; MACHADO et al., 2019).

2.6 MEDIADORES ANTI-INFLAMATÓRIOS

Outras citocinas, caracterizadas como anti-inflamatórias, são tidas com potencial inibitório dos efeitos deletérios, controlando a resposta pró-inflamatória de outras citocinas. Elas são liberadas espontaneamente pela membrana sinovial e cartilagem articular. Sua ação se dá pela inibição e regulação das respostas imunes e inflamatórias. Esta capacidade anti-inflamatória é atribuída, uma vez que elas agem contrapondo as ações das citocinas pró-inflamatórias, inibindo a produção de MMPs, PGE₂ e EROs, além de aumentar a produção de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs).

A interleucina 4 (IL-4), a IL-10, a interleucina 13 (IL-13) e a IL-1ra, são exemplos de citocinas anti-inflamatórias (JORGENSEN et al., 1998; WANG; LOU, 2001).

A IL-1ra é um antagonista natural de receptor da IL-1, que sugere uma ação defensiva do organismo frente a respostas inflamatórias e consequente tentativa de resolução dos efeitos deletérios (BERTUGLIA et al., 2016). Sua ligação nos receptores de IL-1 é semelhante à da IL-1 α e da IL-1 β , de forma que sua competição pelos receptores não desencadeia a ativação destas células. Ativada por diversos mediadores naturais, sua transcrição acontece em condrócitos e macrófagos, especialmente ativados pela IL-1 β e a IL-6. Machado et al. (2019) constatou aumento de concentrações de IL-1ra em articulações tratadas com produtos derivados do sangue, após artroscopia, como também em um ensaio *in vitro*.

Concentrações altas de IL-1ra no líquido sinovial são tidas como uma resposta natural do organismo, como já demonstrado em estudos de artrite reumatoide e OA (LASARZIK et al., 2016; MACHADO et al., 2019).

Como evidência das propriedades anti-inflamatórias, a IL-4 pode suprimir a síntese de IL-1 β e TNF- α , e consequentemente há inibição da PGE₂ e EROs induzidas pela IL-1 β

(ALAAEDDINE et al., 1999). CHOWDHURY et al., (2006) conseguiram demonstrar os efeitos anti-inflamatórios da IL-4, quando estimulou a produção de NO e PGE₂, em condrócitos bovinos, pela IL-1 β . Com isso, a IL-4 compartilha os efeitos anti-inflamatórios com a IL-10, inibindo a destruição da cartilagem articular. Além disso, seus efeitos condroprotetores foram demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo*. (JORGENSEN et al., 1998; WANG; LOU, 2001).

Os efeitos anti-inflamatórios da IL-10 são caracterizados pela inibição da síntese de citocinas inflamatórias, como a IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α . Em estudo realizado por Wang; Lou (2001), a IL-10 inibiu a síntese de citocinas inflamatórias como também apresentou efeito protetor em condrócitos de ratos cultivados *in vitro*. Em estudo abordando os efeitos da IL-10 em artrites reumatóides, a produção de IL-1 β e TNF- α aumentou, no momento em que a IL-10 endógena foi neutralizada, utilizando um antagonista da IL-10 (anti-IL-10). Em contrapartida, o aumento da IL-10 suprimiu significativamente a produção destas citocinas (ISOMAKI et al., 1996).

2.7 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO

As EROs são classificadas como moléculas compostas por radicais livres de oxigênio (superóxido e radical hidroxila) e seus derivados não radicais (peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e ozônio) (HALLIWELL, 1993). Também compõem o grupo de moléculas da inflamação articular, envolvidas na degradação do AH, processos catabólicos da cartilagem articular e depleção dos efeitos antioxidantes. A capacidade de degradar diretamente componentes da ECM, foi sustentada por afetar o colágeno. O óxido nítrico (ON) e o ânion superóxido (O₂) são as principais EROs produzidas pelos condrócitos (HENROTIN; BRUCKNER; PUJOL, 2003). A produção de EROs foi demonstrada em processos inflamatórios e injúrias físico/mecânicas de articulações de equinos e humanos (DIMOCK; SICILIANO; MCILWRAITH, 2000). Estudos *in vitro* demonstraram a produção de EROs, por citometria de fluxo. Utilizando células oriundas do líquido sinovial de equinos, os autores conseguiram mimetizar uma resposta inflamatória aguda, quando as células foram expostas ao LPS ou forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (BROSSI; BACCARIN; MASSOCO, 2012; MACHADO et al., 2019).

A sua produção também é atribuída ao TNF- α e a IL-1 β , como também a expressão de enzimas antioxidantes que atuam nas EROs (KAPOOR et al., 2011). O TNF- α desencadeia a produção de radicais nos condrócitos, pela ativação do metabolismo oxidativo em neutrófilos,

já a IL-1 β aumenta a produção de superóxido nas células mononucleares (RATHAKRISHNAN et al., 1992). Durante o processo inflamatório articular, a homeostase destas moléculas pode modular o estresse oxidativo, uma vez que estão em uma relação íntima com os condrócitos.

3 JUSTIFICATIVA

Apesar do DMSO ser frequentemente utilizado, seja por via intravascular, oral, tópica ou nas lavagens peritoneais e articulares, poucos são os estudos científicos focados nos efeitos sobre as estruturas articulares. Sabe-se que seu emprego acontece a despeito de lacunas no conhecimento dos métodos ideais de administração intra-articular em equinos, bem como de seus mecanismos de ação sobre a cartilagem articular.

Estas lacunas, somadas à escassez de estudos verificando os múltiplos aspectos dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante da aplicação intra-articular do DMSO em equinos motivaram a realização deste trabalho.

4 OBJETIVOS

Baseando-se nas propriedades anti-inflamatória e antioxidante do DMSO, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de DMSO, frequentemente utilizadas no tratamento de doenças articulares de equinos, sobre biomarcadores inflamatórios e de degradação de cartilagem articular presentes no líquido sinovial; bem como sobre a produção de espécies reativas de oxigênio.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Após a indução experimental de sinovite e tratamento intra-articular com soluções de diferentes concentrações de DMSO, pretende-se:

- Realizar a contagem total das células nucleadas do líquido sinovial.
- Quantificar as concentrações de PGE₂, AH, CS, IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α no líquido sinovial.
- Analisar o *burst* oxidativo das células presentes no líquido sinovial.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme o protocolo de número 9265010917.

As análises foram realizadas no Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da EPM – UNIFESP-SP.

5.1 EXPERIMENTO 1

Avaliação dos efeitos *in vitro* do DMSO sobre o cultivo de células-tronco mesenquimais oriundas de líquido sinovial de equinos desafiadas com LPS, por meio da análise de viabilidade celular.

5.1.1 Coleta do líquido sinovial

As amostras de LS foram coletadas por artrocentese. O local de punção foi previamente preparado a partir de antissepsia com clorexidine degermante a 2% e clorexidine alcoólico. Para a punção foi utilizada agulha hipodérmica estéril 30 x 8. O LS obtido foi armazenado em isopor com gelo triturado e levado imediatamente ao laboratório de cultivo celular para processamento.

5.1.2 Cultivo celular

Após a coleta o LS foi processado no laboratório de cultivo celular, em fluxo laminar vertical, iniciando a cultura primária, o isolamento e a expansão das células. O LS foi transferido para frascos de cultivo¹ de 25 cm², preenchidos com 5 ml de meio de cultivo DMEM – F12², suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de glutamina (200Mmol), 1% de ácido pirúvico e 0,25% de anfotericina B, incubadas a uma temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. A primeira troca de meio de cultura foi realizada após visualização ao microscópio

¹ Frasco de cultivo celular marca TPP

² Dulbecco's modified eagle medium

invertido da formação de primeiras colônias de células aderidas ao plástico. Seguidamente, as trocas de meio de cultura foram realizadas a cada 48 horas, até atingirem 70 a 80% de confluência celular.

5.1.3 Dissociação enzimática

Após confluência celular de aproximadamente 70 a 80%, as células passaram por tratamento enzimático (tripsinização) para removê-las do frasco de cultura. Para tanto, o meio de cultivo foi removido, e as células lavadas com 2 mL de PBS. Posteriormente foi adicionado 1 mL de tripsina 0,25%, e as amostras foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2 mL de meio de cultivo suplementado com SFB para inativação da tripsina. A suspensão celular foi aspirada e transferida para tubo cônico de 15 mL, centrifugada durante 10 minutos a 300 X g. O botão celular foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM suplementado, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em seguida.

5.1.4 Plaqueamento das células e tratamentos

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços³ a uma concentração de 1×10^5 células por poço, utilizando 20 poços e recolocadas na estufa a 37°C com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ por 24 horas. Após 24 horas do plaqueamento das células, a placa foi retirada da estufa e analisada em microscopia invertida para avaliar a adesão celular à placa. Em dez poços o meio foi substituído por 1 mL de meio DMEM suplementado, contendo 20 ng de LPS. A placa foi novamente colocada em estufa por três horas. Posteriormente os dez poços foram lavados com 1 mL de PBS, e em seguida todos os poços receberam 1 mL de meio DMEM suplementado, com adição dos tratamentos.

Foram avaliadas duas concentrações de DMSO, 5% e 10%, ringer lactato, e um controle negativo utilizando-se anti-inflamatório não-esteroidal e fenilbutazona 10 µg/mL. Cada tratamento foi realizado em duplicata, de maneira que o sobrenadante foi coletado após 24 e 48 horas de incubação. Os diferentes tratamentos seguem descritos no Quadro 1.

³ Placa de 24 poços para cultivo celular marca TPP

Quadro 1 - Tratamento instituído às células sinoviais – São Paulo – 2019.

	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
A	Controle Meio 24h	Controle Ringer Lactato 24h	LPS + Fenilbutazona 24h	Controle DMSO 10% 48h	LPS + DMSO 5% 48h	
B	Controle DMSO 5% 24h	Controle LPS 24h	LPS + Ringer Lactato 24h	Controle Fenilbutazona 48h	LPS + DMSO 10% 48h	
C	Controle DMSO 10% 24h	LPS + DMSO 5% 24h	Controle Meio 48h	Controle Ringer Lactato 48h	LPS + Fenilbutazona 48h	
D	Controle Fenilbutazona 24h	LPS + DMSO 10% 24h	Controle DMSO 5% 48h	Controle LPS 48h	LPS + Ringer Lactato 48h	

Representação esquemática da disposição dos tratamentos avaliados. Poços em azul referentes a avaliação em 24 horas; poços em amarelo referentes a avaliação em 48 horas. Controle: meio DMEM suplementado.

5.1.5 Viabilidade celular

Após o processo de tripsinização, as amostras foram transferidas para microtubos, homogeneizadas e retirados 10 µL acrescidos de 30 µL de azul de Trypan a 0,2 %, para contagem em Câmara de Neubauer. O número de células viáveis foi determinado pela técnica de exclusão de células não viáveis coradas pelo corante azul de Trypan.

5.2 EXPERIMENTO 2

Verificou-se a eficácia da lavagem articular com DMSO, em articulações com sinovite experimentalmente induzidas por LPS, ao minimizar a degradação da cartilagem articular por meio da determinação da concentração de CS e AH. A eficácia dos efeitos anti-inflamatório e antioxidante do DMSO foi avaliada por meio da quantificação de prostaglandina E₂, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e EROS.

5.2.1 Animais

Foram utilizadas 26 articulações tibiotársicas de 13 equinos hígidos, sem histórico de doenças articulares, não atletas, machos e fêmeas, com idade entre 2 e 7 anos alojados pelo Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os animais foram mantidos em cocheiras sob condições naturais de luz, umidade e temperatura. Receberam ração balanceada e feno de gramínea *coastcross* (*Cynodumdactylum*). Água foi fornecida *ad libitum*.

As articulações foram divididas aleatoriamente em quatro grupos. Para isso foram organizados cartões com possíveis tratamentos e articulações a serem utilizadas. Os cartões foram mantidos em uma caixa, e para cada cavalo, o cartão foi retirado no momento do experimento, para que não houvesse conhecimento do tratamento e articulação que seria utilizada (Tabela 1). Os grupos foram tratados e organizados da seguinte forma: grupo A, solução de ringer lactato; grupo B, DMSO 5% em solução de ringer lactato; grupo C, DMSO 10% em solução de ringer lactato; e Grupo D controle (apenas indução da sinovite).

Cada articulação foi submetida a uma aplicação intra-articular de LPS (0,5ng) no momento 0 hora. Após oito horas o tratamento designado foi realizado, ou seja, lavagem articular com solução de ringer lactato, DMSO 5% em solução de ringer lactato, DMSO 10% em ringer lactato ou controle.

Amostras de LS foram coletadas das articulações nos momentos 0, 1, 8, 24 e 48 horas para contagem total de células nucleadas, determinação de PGE₂, quantificação de IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , AH, CS, ureia, proteína total e análise do *burst* oxidativo.

O intervalo entre as utilizações das articulações tibiotársicas do mesmo animal foi de no mínimo três semanas.

Tabela 1— Randomização dos tratamentos e articulações utilizadas – São Paulo – 2019.

Cartão	Articulação	
	Direita	Esquerda
1	A	B
2	C	D
3	B	A
4	D	C
5	B	C
6	A	D
7	B	D
8	A	C
9	C	A
10	D	B
11	C	B
12	A	C
13	B	A

A: Ringer lactato; B: DMSO 5%; C: DMSO 10%; D: Controle.

5.2.2 Critérios de inclusão

Exame clínico para seleção dos animais

Os animais selecionados não deveriam apresentar histórico de doenças articulares, bem como alterações nos exames físico, ultrassonográfico e radiográfico.

Avaliação clínica

Os animais incluídos no experimento foram avaliados previamente às coletas nos momentos 0, 1, 8, 24 e 48 horas, para presença de claudicação induzida por dor articular.

A presença de claudicação nos cavalos foi avaliada de forma objetiva, utilizando equipamento⁴ capaz de indicar o membro de origem e quantificar a claudicação. O equipamento é composto por sistema via *bluetooth*, que recebe informações de três sensores sem fio, não invasivos, colocados na cabeça (acelerômetro), face dorsal do membro torácico direito

⁴LamenessLocator®

(giroscópio) e pelve (acelerômetro). Os movimentos captados são convertidos em vetores e interpretados pelo programa, que atribui um número ao vetor resultante. Para os membros pélvicos, a amplitude total da movimentação da pelve não pode exceder ≥ 3 .

Exame ultrassonográfico

Para a realização do exame ultrassonográfico, os equinos foram contidos em tronco apropriado para espécie. As articulações tibiotársicas foram tricotomizadas e foi utilizado gel para condução. O aparelho utilizado foi o ultrassom ESAOTE MyLab 30 VETGOLD®, com transdutor linear de 7,5 a 12 MHz, utilizando a frequência de 12 MHz.

Exame radiográfico

Para realização do estudo radiográfico, foi utilizado o aparelho Sound EKLIN Mark 2®. Foram realizadas quatro projeções da articulação tibiotársica, sendo elas: dorso-plantar, latero-medial, dorsolateral-plantoromedial oblíqua e dorsomedial-plantorolateral oblíqua.

5.2.3 Indução da sinovite com LPS

Foi utilizado o produto comercial Lipopolysaccharide E.coli O55:B5. A partir da solução estoque de 1 mg/mL de LPS em RPMI 1640 Medium (GIBCO), foi feita nova diluição em 50 mL de PBS estéril, atingindo a concentração de 20 ng/mL e armazenada essa solução intermediária em frasco de vidroborocilicato a 4°C. A solução de trabalho foi obtida através da fórmula $C_i \times V_i = C_f \times V_f$ (C_i : Concentração inicial; V_i : Volume inicial; C_f : Concentração final; V_f : Volume final) ou seja, cada 50 µL em 2 mL de PBS estéril, obtendo assim, a quantidade desejada de 0,5 ng em 2 mL. Todas as etapas foram realizadas em cabine de segurança biológica, com materiais estéreis.

A aplicação da solução de LPS ocorreu imediatamente após a coleta de LS no momento 0 hora (M0).

5.2.4 Lavagem articular

A lavagem articular foi realizada com os animais em estação, contidos em tronco para espécie, sob sedação com Detomidina 1% na dose de 20 $\mu\text{g/Kg}$, imediatamente após a coleta de LS no momento 8 horas (M8) (figura 1). Para a lavagem foram realizados dois acessos articulares, dorsomedial e dorsolateral, utilizando agulhas hipodérmicas 40 x 12². O primeiro acesso, também utilizado para a coleta do LS, foi realizado medialmente à veia safena, logo abaixo do maléolo medial da tíbia, e então realizada distensão articular para o acesso dorsolateral, como portal de saída da solução infundida (Figura 2). As soluções de DMSO (5% e 10%), foram preparadas em frascos de um litro de ringer lactato. Todas as soluções foram preparadas dentro do fluxo laminar para minimizar o risco de contaminação.

Figura 1 - Coleta de líquido sinovial da articulação tibiotársica esquerda, pelo acesso medial no momento 8 horas. Fonte: SOTELO (2019).

5.2.5 Análise do líquido sinovial

5.2.5.1 Coleta do líquido sinovial

Foram coletadas amostras de LS das articulações tibiotársicas nos momentos M0, antes da aplicação de LPS, 1 (M1), M8, 24 (M24) e 48 (M48) horas após a indução da sinovite. O acesso escolhido foi medialmente à veia safena, logo abaixo do maléolo medial da tíbia, na face dorsomedial do tarso, utilizando agulhas hipodérmicas 30 x 8⁵ (Figura 1). No local de punção foi feita assepsia com clorexidine degermante a 2% e clorexidine alcoólico 0,5%. O LS foi imediatamente processado no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

Figura 2 - Momento 8 horas, posicionamento das agulhas para realização da lavagem da articulação tibiotársica esquerda. Fonte: SOTELO (2019).

⁵ Agulha descartável BD – PrecisionGlide

5.2.5.2 Processamento do líquido sinovial

Após cada coleta, as amostras de LS foram imediatamente centrifugadas⁶ a 4°C e 2000 G, durante 15 minutos. O sobrenadante foi aliquotado em tubos de 2 mL e congelado a -80°C para futuras análises.

5.2.5.3 Contagem total e diferencial de células

A contagem total de células nucleadas foi realizada em câmara de Neubauer⁷, com alíquotas de líquido sinovial *in natura*. As amostras contaminadas com sangue foram diluídas na proporção de 10 µL de LS para 90 ou 190 µL de solução fisiológica 0,9%, e o número de células viáveis foi ajustado para x 10 e x 20, respectivamente. Para o diferencial celular foram confeccionados esfregaços corados com Rosenfeld.

5.2.5.4 Determinação da PGE₂

A quantificação de PGE₂ do LS foi realizada por ELISA, com o *kit* Prostaglandin E₂ EIA Kit – Monoclonal da empresa Cayman Chemical Company (EUA). O LS utilizado estava acondicionado em microtubos sem anticoagulante, mantidos à temperatura de -80°C.

EIA Buffer foi adicionado aos poços de ligação inespecífica (100 µL) e aos poços de máxima ligação (50 µL). A curva padrão foi feita em duplicata, adicionando 50 µL em cada poço das fileiras 2 e 3 da placa. Em seguida, 50 µL das amostras de LS foram adicionadas em cada poço, em duplicata. Com exceção dos poços de atividade total e branco, todos os demais receberam 50 µL de PGE₂ *tracer*, contendo acetilcolinesterase (AChE). O anticorpo monoclonal anti-PGE₂ foi adicionado na quantidade de 50 µL aos poços, com exceção dos poços de atividade total, ligação inespecífica e branco. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e em seguida lavada⁸ cinco vezes com *Wash Buffer*. Foram adicionados 200 µL de *Ellman's Reagent*, preparado imediatamente antes de sua utilização, em todos os poços, e apenas o poço de atividade total recebeu também 5 µL de *tracer*. A placa foi protegida da luz e mantida no

⁶ Centrífuga 5417 R - Eppendorf

⁷ Neubauer – Hirschmann – EM – Techcolor

⁸ 405 LS - Biotek

agitador⁹ por 60 a 90 minutos. A absorbância da amostra foi lida à 412 nm em leitor¹⁰ de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 7.8 a 1000 pg/mL pelo programa Gen5. Foram utilizadas duas amostras de LS de articulações com artrite séptica para validação do teste.

As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

5.2.5.5 Determinação dos glicosaminoglicanos (GAGs)

Para a determinação das GAGs foram utilizadas as amostras acondicionadas em microtubos sem anticoagulante a -80°C.

Cinquenta microlitros de cada amostra foram adicionados a 100 µL de protease alcalina P126 maxatase (4 mg/mL Tris HCl 0,05 M pH 8,0) e incubados em banho-maria a 50°C, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas¹¹ em temperatura ambiente a 3000 G por 15 minutos para a remoção de resíduos insolúveis. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 600 µL e seco em vácuo¹² por pelo menos 2 horas a 45°C. As amostras foram ressuspensas em 25 µL de água destilada.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,55%, em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05 M e pH 9 (PDA), em cuba refrigerada, por aproximadamente uma hora, como descrito por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976). Foram utilizados 5 µL de um padrão de CS e um padrão de AH, ambos na concentração de 1 mg/mL. O corante vermelho de cresol foi adicionado como indicador da distância percorrida. Após a eletroforese os GAGs foram fixados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1% pelo tempo mínimo de duas horas. Em seguida o gel foi coberto com papel filtro e seco sob corrente de ar aquecida. O CS foi corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% em etanol 50% por 15 minutos. O excesso de corante foi removido pela solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Ato contínuo, o AH foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M.

⁹ Mini Shaker PSU-2T - Biosan

¹⁰ ELx808 - Biotek

¹¹ Centrífuga 5418 - Eppendorf

¹² Vacufugevacuum concentrator - Eppendorf®

As lâminas foram escaneadas¹³ e as imagens editadas para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas¹⁴.

5.2.5.6 Análise do *burst* oxidativo por citometria de fluxo

Após a coleta do LS, as amostras foram divididas em alíquotas para análises subsequentes. Cada amostra foi dividida em 2 tubos de ensaio de 12 x 75mm, em poliestireno cristal transparente: branco e *burst* basal. Para o *burst* oxidativo dos momentos 8, 24 e 48 horas, 30 µL de amostra foram adicionados em cada tubo de ensaio, uma vez que após o estímulo com LPS a celularidade no líquido sinovial aumenta consideravelmente. Para o *burst* basal foram adicionados 200 µL do reagente DCFH, na concentração final de 55 µM, o qual fluoresce em verde na presença de EROS e quando excitado em 488 nm. Em todos os tubos foi adicionado PBS suficiente para completar o volume final de reação de 1 mL. Os tubos foram então incubados em estufa a 37°C por 20 minutos. Após a incubação as amostras foram lavadas com 2 mL de PBS, centrifugadas a 400 X g por 7 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido em 200 µL de PBS, para a análise por citometria de fluxo.

As amostras foram verificadas por meio de citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience), por meio do software de aquisição Cell Quest (BD Bioscience). As populações de células foram definidas em gráficos de tamanho por complexidade (FSCxSSC) em escala linear. A população de maior tamanho e complexidade foi caracterizada como os neutrófilos e foi utilizada para definir parâmetros de aquisição e posterior análise. Tubos brancos foram usados para determinar ausência de fluorescência, enquanto tubos de *burst* basal foram aplicados para definir positividade de fluorescência verde no detector FL1, sem ultrapassar os limites possíveis. Foram salvos 20000 eventos da população de células mononucleares e células polimorfonucleares para cada arquivo (animal/tempo). Os arquivos foram então analisados em *software* FlowJo versão 7.6.4 para Windows (Treestar, Inc.). Foi solicitado ao programa o cálculo de média geométrica de fluorescência (geomean) no canal FL1 e os valores obtidos foram exportados para planilhas de Microsoft Excel.

¹³Densitômetro Epson Perfection V700 Photo scanner da Epson America, Inc. (Long Beach, CA, USA)

¹⁴Software QuickScan 2000 da Helena Laboratories (Beaumont, TX, USA)

5.2.5.7 Determinação da IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α

A quantificação das citocinas foi realizada por meio do kit MILLIPLEX[®] MAP (Equine Cytokine/Chemokine Panel) da EMD Millipore Corporation, baseada na tecnologia Luminex xMAP[®]. O LS utilizado foi acondicionado em microtubos sem anticoagulante, mantidos à temperatura de -80°C.

5.2.5.8 Determinação de ureia e proteína total

Para a análise da concentração de ureia e proteína total, o LS armazenado à temperatura de -80°C em tubo tipo eppendorf sem anticoagulante foi descongelado e analisado pelo método do biureto, com a utilização do analisador bioquímico automático¹⁰.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida utilizou-se o modelo de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey-Kramer, para verificar o efeito de momentos. Para investigar a diferença entre os grupos utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O grau de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$)

7 RESULTADOS

7.1 VIABILIDADE CELULAR

No M24 as células estimuladas com LPS e tratadas com DMSO 5% apresentaram porcentagem menor de células viáveis em relação às células estimuladas com LPS. Na comparação entre os grupos controles não houve diferença estatística ($P>0,05$), como também na comparação entre grupos controle e grupos com LPS.

No M48 as células estimuladas com LPS e tratadas com ringer lactato apresentaram menor porcentagem de células viáveis em relação às células estimuladas com LPS. Na comparação entre os grupos controle não houve diferença estatística ($P>0,05$), como também na comparação entre os grupos controle e grupos estimulados com LPS.

Tabela 2 – Porcentagem de células sinoviais viáveis após 24 horas do estímulo com LPS e respectivos tratamentos.

Animal	Controle	Controle 5%	Controle 10%	Controle Fenil	Controle Ringer	Controle LPS	5% + LPS	10% + LPS	Fenil + LPS	Ringer + LPS
1	100	50	67	67	75	75	50	*	100	100
2	100	88	67	25	*	*	*	60	80	100
3	80	60	25	80	75	100	67	77	75	93
4	96	72	41	69	86	90	73	75	100	100
5	89	86	100	50	92	87	50	100	88	67
6	91	100	80	100	100	82	80	50	75	75
Média	93	76	63	65	86	87a	64b	72ab	86a	89a
DP	7,69	18,80	26,90	25,67	10,88	9,31	13,58	19,01	11,60	14,55

letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P<0,05$).

Tabela 3 - Porcentagem de células sinoviais viáveis 48 horas após estímulo com LPS e respectivos tratamentos.

Animal	Controle	Controle 5%	Controle 10%	Controle Fenil	Controle Ringer	Controle LPS	5% + LPS	10% + LPS	Fenil + LPS	Ringer + LPS
1	50	*	*	50	67	*	50	*	100	40
2	100	100	*	*	*	100	*	50	33	33
3	60	50	100	*	33	75	100	*	63	67
4	100	91	100	100	95	100	100	100	86	91
5	87	75	100	100	100	100	73	50	71	80
6	94	78	100	95	91	80	100	75	100	75
Média	82	79	100	86	77	91a	85a	69a	76a	64b
DP	21,56	18,99	0,00	24,28	27,77	12,45	22,60	23,94	25,67	23,03

letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P<0,05$).

7.2 ANÁLISE DE CLAUDICAÇÃO

Observou-se claudicação em 46% dos animais oito horas após a indução da sinovite, sendo 28% no grupo ringer lactato, 42% nos grupos DMSO 5% e DMSO 10% e 40% no grupo controle. Após 24 horas somente 26% dos animais apresentaram claudicação, sendo 28% no grupo ringer lactato, 42% no grupo DMSO 10% e 40% no grupo controle. No M48 15% dos animais ainda apresentavam claudicação, ou seja, 28% no grupo ringer lactato e 28% no grupo DMSO 10%.

Apesar do Lameness Locator® ter evidenciado claudicação durante o estudo, não houve diferença estatística significativa na média da soma de vetores entre os grupos ($P>0,05$). Também não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$) entre os diferentes momentos de um mesmo tratamento (Gráfico 1) (Apêndice A).

Gráfico 1 - Média da soma de vetores na avaliação realizada pelo equipamento Lameness Locator®, (claudicação) dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo – 2019.

Considera-se a presença de claudicação a soma de vetores ≥ 3 .

7.3 CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE CÉLULAS

Todos os grupos apresentaram aumento da contagem total de células no M8 em relação aos momentos 0 e 1 hora ($P<0,05$). Os grupos ringer lactato, DMSO 5% e controle demonstraram aumento M24 em relação ao M0 ($P<0,05$), e os grupos ringer lactato e DMSO 5% em relação ao M1. Os grupos DMSO 5% e DMSO 10% apresentaram diminuição

significativa no M48 em relação ao M8 ($P<0,05$). Na comparação entre grupos não houve diferença estatística ($P>0,05$) (Gráfico 2) (Apêndice B).

Houve diminuição na porcentagem de células mononucleares nos grupos ringer lactato, DMSO 10% e controle nos momentos 24 e 48 horas, quando comparados aos momentos 0, 1 e 8 horas ($P<0,05$). Na comparação entre os grupos, o grupo tratado com DMSO 10% apresentou menor média em relação ao grupo controle, DMSO 5% e ringer lactato no M48 ($P<0,05$) (Gráfico 3) (Apêndice B).

Houve aumento da porcentagem de células polimorfonucleares nos grupos ringer lactato, DMSO 10% e controle nos momentos 24 e 48 horas, quando comparados aos momentos 0, 1 e 8 horas ($P<0,05$). Na comparação entre os grupos, o grupo tratado com DMSO 10% apresentou maior média em relação aos grupos ringer lactato, controle e DMSO 5% no M48 ($P<0,05$) (Gráfico 4) (Apêndice B).

Gráfico 2 - Média da contagem total de células nucleadas presentes no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

× diferença em relação aos valores iniciais e M1; f diferença em relação ao M0; ≠ diferença em relação ao M8.

Gráfico 3 – Valor médio de leucócitos mononucleares presentes no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo – 2019

† diferença em relação aos valores iniciais, M1 e M8; ‡ diferença em relação aos outros grupos.

Gráfico 4 – Valor médio de leucócitos polimorfonucleares presentes no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo – 2019

† diferença em relação aos valores iniciais, M1 e M8; ‡ diferença em relação aos outros grupos.

7.4 PROSTAGLANDINA E₂

Houve aumento significativo ($P < 0,05$) dos valores da concentração de PGE₂ em todos os grupos no M8 em relação ao M0. Nos grupos ringer lactato e controle também houve aumento dos valores da PGE₂ no M1 em comparação ao M0 ($P < 0,05$). O grupo DMSO 10% apresentou diminuição significativa ($P < 0,05$), no M48 em relação ao M8, contudo na comparação entre os grupos não houve diferença significativa ($P > 0,05$) (Gráfico 5) (Apêndice C).

Gráfico 5 - Concentração média de PGE₂ presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

* diferença em relação aos valores iniciais; ≠ diferença em relação ao M8.

7.5 DETERMINAÇÃO DA IL-1 β

O grupo ringer lactato apresentou aumento da concentração de IL-1 β no M1 em relação ao M0 ($P<0,05$). Todos os grupos apresentaram aumento significativo ($P<0,05$) dos valores de IL-1 β no M8 em relação ao M0. Houve aumento significativo no grupo DMSO 5% no M24 em comparação ao M0 ($P<0,05$). O grupo DMSO 10% apresentou diminuição significativa ($P<0,05$), no M48 em relação ao M8. O grupo ringer lactato apresentou menor concentração de IL-1 β no M24 em comparação aos grupos DMSO 5% e controle ($P<0,05$) (Gráfico 6) (Apêndice D).

Gráfico 6 - Concentração média de IL-1 β presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

* diferença em relação aos valores iniciais; + diferença em relação ao M8; ≠ diferença em relação aos grupos DMSO 5% e controle.

7.6 DETERMINAÇÃO DA IL-6

Todos os grupos apresentaram aumento da concentração de IL-6 no M8 em relação aos momentos 0 e 1 hora ($P<0,05$). Com exceção do grupo controle, todos os grupos apresentaram aumento da concentração de IL-6 no M24 em relação ao M0. Na comparação entre os grupos, no M8 o grupo DMSO 5% apresentou maior média em relação aos grupos DMSO 10% e controle ($P<0,05$). No M24 os grupos DMSO 5% e ringer lactato apresentaram maior média, quando comparados ao grupo DMSO 10% ($P<0,05$) (Gráfico 7) (Apêndice E).

Gráfico 7 - Concentração média de IL-6 presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

* diferença em relação aos valores iniciais; x diferença em relação aos valores iniciais e M1; + diferença em relação ao grupo DMSO 5%; ¥ diferença entre o grupo DMSO 10%.

7.7 DETERMINAÇÃO DA IL-10

Os grupos DMSO 5% e controle não apresentaram diferença estatística entre os momentos ($P>0,05$). O grupo ringer lactato apresentou aumento da concentração de IL-10 no M0 em relação aos momentos 1 e 48 horas ($P<0,05$). O grupo DMSO 10% apresentou maior concentração de IL-10 no M48 em relação aos momentos 0, 8 e 24 horas. Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos ($P>0,05$) (Gráfico 8) (Apêndice F).

Gráfico 8 - Concentração média de IL-10 presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

* diferença em relação aos valores iniciais; 'T' diferença em relação a M0, M8 e M24.

7.8 DETERMINAÇÃO DA TNF- α

Todos os grupos apresentaram aumento da concentração de TNF- α no M1 em relação ao M0 ($P<0,05$). Os grupos DMSO 10% e controle apresentaram diminuição significativa ($P<0,05$), nos momentos 24 e 48 horas em relação ao M1. Na comparação entre os grupos não houve diferença estatística ($P>0,05$) (Gráfico 9) (Apêndice G).

Gráfico 9 - Concentração média de TNF- α presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

* diferença em relação aos valores iniciais; × diferença em relação a M1.

7.9 DETERMINAÇÃO DOS GAGS

A identificação de GAGs no LS, realizada por eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, da articulação tibiotársica do grupo controle está representada pela figura 3. A figura 4 representa as GAGs do M48 das articulações tratadas com DMSO 10%, DMSO 5% e ringer lactato.

Figura 3- Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 0, 1, 8 e 24 horas realizados em duplicata, do grupo controle. Fonte: SOTELO (2019)

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 48 horas realizados em duplicata (M48a: DMSO 10%; M48b: DMSO 5%; M48c: Ringer Lactato; M48d: DMSO 10%). Fonte: SOTELO (2019)

7.9.1 Concentração de AH

O grupo ringer lactato apresentou diminuição da concentração de AH no M24 em relação ao M1 ($P<0,05$). Também houve diminuição da concentração de AH no grupo DMSO 10% no M24 em relação aos momentos 0 e 1 hora ($P<0,01$). Na comparação entre os grupos não houve diferença estatística ($P>0,05$) (Gráfico 10) (Apêndice H).

Gráfico 10 - Concentração média de AH presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

* diferença em relação aos valores iniciais; x diferença entre os valores iniciais e M1.

7.9.2 Concentração de CS

Os grupos tratados com ringer lactato e DMSO 10% apresentaram aumento da concentração de CS nos momentos 24 e 48 horas quando comparados aos momentos 0, 1 e 8 horas ($P<0,001$). O grupo DMSO 5% apresentou aumento dos valores de CS no M24 em relação aos momentos 0, 1 e 8 horas ($P<0,01$). No M48 a concentração de CS no grupo DMSO 5% ainda permanecia aumentada, contudo, menor comparativamente ao M24. O grupo controle apresentou maior média no M48 horas quando se comparou com os momentos 0, 1 e 8 horas ($P<0,01$). Na comparação entre os grupos não houve diferença estatística ($P>0,05$) (Gráfico 11) (Apêndice I).

Gráfico 11 - Concentração média de CS presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

* diferença em relação aos valores iniciais;

7.10 ANÁLISE DO *BURST* OXIDATIVO

Não houve diferença estatística significativa na média de intensidade de fluorescência entre os grupos ou entre os momentos no mesmo grupo ($P>0,05$) (Gráficos 12 e 13) (Apêndice J).

Gráfico 12 – Média de intensidade de fluorescência de neutrófilos do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos, representação entre os grupos – São Paulo - 2019

Gráfico 13 - Média de intensidade de fluorescência de neutrófilos do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos, representação entre os momentos – São Paulo - 2019

Gráfico 14 – Média de intensidade de fluorescência de células mononucleares do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos, representação entre os grupos – São Paulo - 2019

Gráfico 15 - Média de intensidade de fluorescência de células mononucleares do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos, representação entre os momentos – São Paulo - 2019

7.11 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE UREIA

Não houve diferença estatística significativa na concentração dos valores de ureia entre os grupos ou entre os momentos no mesmo grupo ($P > 0,05$) (Gráfico 14) (Apêndice L).

Gráfico 16 – Concentração média de ureia presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

7.12 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

Todos os grupos apresentaram aumento na concentração dos valores de proteína total nos momentos 8 e 24 horas em relação ao M0 ($P < 0,01$). Como também, aumento na concentração de proteína total no M48 em relação ao M1. Não houve diferença estatística significativa na concentração dos valores de proteína total entre os grupos ($P > 0,05$) (Gráfico 15) (Apêndice M).

Gráfico 17 – Concentração média de proteína presente no LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais submetidos aos tratamentos – São Paulo - 2019

* diferença em relação aos valores iniciais; × diferença em relação a M1.

8 DISCUSSÃO

A sinovite é uma condição inflamatória encontrada comumente em animais jovens e adultos em fase de treinamento e de competições, sendo caracterizada pelo edema articular, que pode surgir pelo espessamento da sinóvia ou efusão do líquido sinovial, com ou sem presença de dor (SELLAM; BERENBAUM, 2010). Uma vez que a sinovite causa efeitos deletérios à cartilagem articular, como também está associada ao desenvolvimento da OA, diversos estudos, a fim de esclarecer sua mecânica e terapêutica, são realizados.

O uso do modelo experimental de indução da sinovite com LPS em equinos, é frequentemente utilizado por diversos autores para elucidar os mecanismos da sinovite, seus efeitos deletérios, bem como os efeitos terapêuticos de diferentes fármacos sobre os componentes articulares (MOSES et al., 2001; DE GRAUW; VAN DE LEST; VAN WEEREN, 2009; ROSS et al., 2012; COKELAERE et al., 2018).

Com base nos resultados deste trabalho, o uso intra-articular de LPS na dose de 0,5ng, induziu claudicação e aumento na contagem total de células nucleadas do líquido sinovial, indicando resposta inflamatória como demonstrado em trabalhos anteriores (PALMER; BERTONE, 1994; CAMPEBELL et al., 2004; ROSS et al., 2012; COKELAERE et al., 2018).

Apesar da análise estatística não apresentar diferença estatística, a claudicação foi observada com o uso do Lameness Locator®, sendo que todos os grupos apresentaram aumento da soma dos vetores, no M8, representando a presença de claudicação. Este resultado corrobora com trabalhos que utilizaram o LPS como indutor da sinovite em equinos. Após 48 horas todos os grupos apresentaram médias próximas aos níveis basais, o que pode estar relacionado com o fator auto limitante e transitório do LPS (CAMPEBELL et al., 2004). Neste momento, as citocinas estudadas, que contribuem no carreamento dos sinais de dor, como o TNF- α , a IL-1 β e a IL-6, excitando as fibras C que agem na resposta neural (MILLER; MILLER; MALFAIT, 2014), já apresentavam diminuição da concentração no líquido sinovial.

Alguns estudos demonstraram que o uso de DMSO em lavagens articulares não causam destruição da cartilagem articular ou alterações histológicas, e ainda apresentam um possível efeito anti-inflamatório, devido à diminuição dos níveis de leucócitos no líquido sinovial (WELCH ET AL., 1991; WELCH et al., 1989; ALDAIR et al., 1991). Outro estudo, realizado *in vitro*, indicou que a utilização de DMSO em concentrações maiores que 5%, poderia induzir estado de dormência nos condrócitos, sem, contudo, a destruição dos mesmos (SMITH et al., 2000).

A contagem total de células nucleadas do líquido sinovial é uma ferramenta valiosa no diagnóstico e classificação de artropatias inflamatórias e não-inflamatórias, sendo que a quantidade normal de leucócitos é de até 1000 cel/ μ L, com predominância de células mononucleares (90%) e poucos poliformonucleares (10%) (MACWILLIAMS; FRIEDRICH, 2003). Neste trabalho a contagem total de células nucleadas aumentou significativamente uma hora após a aplicação intra-articular de LPS, sendo que após oito horas houve acréscimo significativo na quantidade de células do líquido sinovial em todos os grupos avaliados, demonstrando reprodutibilidade do modelo experimental e corroborando com achados de pesquisas anteriormente citadas. A contagem total de células ainda permaneceu estatisticamente aumentada às 24 horas em relação aos valores basais nos grupos ringer lactado, DMSO 5% e controle, diferentemente do grupo DMSO 10%. Além disso, os grupos tratados com DMSO 5% e 10% apresentaram diminuição significativa do número de células nucleadas no M48 em relação ao M8.

Observou-se também diminuição da porcentagem de células mononucleares e aumento da porcentagem de células polimorfonucleares as 24 e 48 horas comparativamente às 0, 1 e 8 horas nos grupos ringer lactato, DMSO 10% e controle, sendo que o grupo tratado com DMSO 10% apresentou maior média de polimorfonucleares no M8 quando comparado aos outros grupos. Welch et al. (1991) observou valores aumentados de contagem celular do líquido sinovial, após injeção intra-articular de monoiodoacetato. Porém, quando realizada lavagem articular com DMSO 40% observou diminuição significativa dos valores, em comparação ao grupo não tratado.

Aldair et al. (1991) também observou aumento na contagem total de células no líquido sinovial de articulações saudáveis submetidas a lavagem articular, com soluções de DMSO 10%, 30% e ringer lactato. No estudo realizado por Aldair et al. (1991), os autores utilizaram articulações não inflamadas, além de realizarem a lavagem articular com três litros de solução final, e distensão articular intermitente, durante a lavagem. Tal metodologia pode estar relacionada ao aumento na contagem total de células independentemente do grupo, uma vez que a distensão articular em lavagens articulares provoca uma rápida resposta inflamatória transitória (ROSSETI et al., 2012; BERTONE et al., 1986).

Os valores de proteína encontrados no LS de cavalos considerados normais variam de $1,8 \pm 0,3$ g/dL (STEEL, 2008). O aumento da concentração de proteína está relacionado ao aumento da permeabilidade vascular da membrana sinovial, uma vez que o líquido sinovial consiste em um ultrafiltrado do plasma. Assim, como esperado, os valores de proteína total aumentaram significativamente em todos os grupos, o que também é descrito por diversos

autores, quando avaliaram processos inflamatórios articulares (TULAMO; BRAMLAGE; GABEL, 1989; PALMER; BERTONE, 1994b; STEEL, 2008).

Com o estabelecimento do processo inflamatório, induzido pelo LPS no presente trabalho, os fatores inflamatórios produzidos pelo tecido articular foram liberados no líquido sinovial, e consequentemente foi possível aferir o aumento da concentração das citocinas. Em estudo recente de indução experimental de OA em equinos, os valores de citocinas inflamatórias aumentaram consideravelmente à medida que a OA se estabelecia (MA et al., 2017), o que reforça a utilização do modelo experimental empregado em nosso estudo.

A sinovite aguda induziu aumento significativo da IL-1 β no M1 no grupo ringer lactato, contudo a maior concentração desta citocina foi encontrada no M8, quando todos os grupos apresentaram aumento significativo. A presença desta molécula é detectada em altas concentrações no líquido sinovial de articulações doentes. A IL-1 β participa na degradação da ECM através da ativação de MMPs e agrecanases, como também a sinalização de PGE₂ e NO (WATANABE et al., 2009; ROSS et al., 2012).

Neste estudo o grupo tratado com DMSO 5% manteve o aumento da concentração de IL-1 β no M24, diferentemente do grupo DMSO 10%. É possível que o DMSO tenha uma ação dose dependente, no caso a concentração mais baixa, de 5%, não foi capaz de inibir a estimulação de IL-1 β , como visto no estudo realizado por Xing; Remick, (2005). Essa afirmação é ainda mais sustentada, quando observamos o comportamento do grupo tratado com DMSO 10%, o qual apresentou diminuição significativa no M48 em comparação ao M8.

A IL-1 β modula a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e IL-8, além de sua ativa participação nos processos catabólicos, citados acima (FRISBIE et al., 2008; MA et al., 2017).

A quantidade de IL-6 liberada no ambiente articular, em situações fisiológicas, é baixa e não está relacionada a alterações ou degradação da cartilagem articular. No entanto, quando os condrócitos são estimulados a liberar uma quantidade além do normal, ocorrem alterações cartilagíneas, principalmente a inibição do colágeno tipo II (MA et al., 2017). Alguns estudos correlacionaram a presença de IL-6 à presença de OA e osteófitos (LEY et al., 2007; BERTUGLIA et al., 2016). A análise da concentração de IL-6 neste trabalho, evidenciou aumento significativo após 8h da indução da sinovite com LPS, em todos os grupos. À semelhança do comportamento da IL-1 β , o grupo DMSO 10% apresentou menor concentração em relação ao grupo DMSO 5% no M8, além disso o grupo DMSO 10% mostrou menor concentração ao grupo DMSO 5% e ringer lactato no M24. Isso pode ser explicado pelo fato da IL-1 β agir na sinalização e expressão da IL-6.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória com potencial inibitório de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias (ISOMAKI et al., 1996; HAWKINS et al., 1998). Sabendo de suas capacidades naturais de auxiliar na homeostase articular, este trabalho avaliou seus níveis no líquido sinovial. Os níveis da IL-10 aumentaram significativamente no M1 e M48 no grupo ringer lactato em relação ao M0 e no M48 no grupo DMSO 10% comparativamente ao M0, M8 e M24. Os grupos DMSO 5% e controle não apresentaram diferença estatística. É importante ressaltar que a IL-10 possui a potencial de reduzir a produção de citocinas inflamatórias, como a IL-1 β e TNF- α , responsáveis pela depleção articular, portanto a IL-10 tem um papel importante no processo inflamatório articular (WANG; LOU, 2001).

Em um estudo conduzido por Bertuglia et al., (2016), a análise do TNF- α no líquido sinovial foi capaz de antecipar lesões radiográficas, em articulações com OA, mais precisamente do que outros mediadores inflamatórios. Como observado no presente estudo, após uma hora da indução da sinovite nas articulações tibiotársicas, todos os grupos apresentaram aumento significativo da concentração de TNF- α no líquido sinovial, sendo o primeiro biomarcador a apresentar um pico. Campebell et al., (2004), também observaram aumento nos valores de TNF- α , após uma hora e meia de indução da sinovite com LPS, com retorno aos valores basais após três horas. Como sugerido por Palmer; Bertone, (1994) o TNF- α está presente em processos inflamatórios agudos, e apesar de apresentar meia vida curta, sua função está relacionada à sinalização de sinoviócitos e condrócitos, incitando em liberação de outras citocinas responsáveis pela degradação articular. Ainda que não tenha sido possível afirmar alguma diferença proposta entre os tratamentos, pode-se observar que no M24 e no M48 o grupo DMSO 10% apresentou diminuição estatística da concentração de TNF- α em relação aos valores de M1, assim como o grupo controle.

A liberação da PGE₂ é estimulada quando processos inflamatórios estão presentes. No ambiente articular, ela é liberada rapidamente por células sinoviais e condrócitos. Em estudos experimentais, sua concentração pode aumentar em duas a nove horas, após indução inflamatória (GRONBLAD et al. 1988; HAWKINS et al. 1993; OWENS et al. 1996; HARDY et al. 1998). No presente estudo a PGE₂ aumentou consideravelmente após oito horas da indução da sinovite em todos os grupos, o que corrobora com Boom et al. (2007) que sugerem que a PGE₂ possa ser um indicador sensível de mudanças articulares.

Ao contrário do que foi observado por Moses et al., (2001) o grupo tratado com DMSO 10% apresentou diminuição significativa dos valores de PGE₂ no momento 48h. Este resultado era esperado, uma vez que, como sugerido por diversos autores o DMSO possui efeito anti-inflamatório e analgésico (BRAYTON, 1986; ADAIR et al., 1991; WELCH et al., 1991;

SMITH et al., 2000; FORNEY, 2007). Apesar disso, no estudo conduzido por Moses et al., (2001), alterações na produção de PGE₂ em membranas sinoviais cultivadas *in vitro*, não foram observadas quando tratadas com DMSO 10%, e o autor identificou alterações histomorfológicas. Outros estudos, como o realizado por Welch et al. (1991) não identificaram tais alterações.

A citometria de fluxo foi utilizada neste trabalho para analisar os efeitos do DMSO sobre a produção de radicais livres produzidos pelas células sinoviais estimuladas com LPS. Embora este trabalho não indique efeito sobre a EROs, foi possível verificar menor valor de MIF de neutrófilos no grupo tratado com DMSO 10%. Como visto em outros estudos o DMSO em concentrações altas podem inibir a degradação articular (AUER et al., 1991; EINERTSON, 2007)

Os GAGs são biomarcadores eficientes do metabolismo articular como já demonstrado por (MACHADO et al., 2012), e podem ser utilizados como indicadores de degradação de matriz cartilaginosa. Um estudo avaliando o DMSO como crioprotetor de condrócitos humanos, demonstrou que a concentração de 20% de DMSO possui baixa toxicidade para os condrócitos, como também foi capaz de manter a produção de GAGs (KAY et al., 2015).

No presente estudo a concentração de AH diminuiu no M24 em todos os grupos, mas estatisticamente nos grupos ringer lactato e DMSO 10%. Esta diminuição pode ser atribuída à lavagem articular ou quebra da molécula de ácido hialurônico, ao contrário do proposto por Auer et al. (1991), ou seja, que o DMSO possui efeito protetor cartilaginosa. Entretanto, ao observar os valores no M48, é notório que os valores retornam à normalidade.

As concentrações de CS aumentaram significativamente em todos os grupos entre 24 e 48 horas após a aplicação intra-articular de LPS. Os achados deste trabalho corroboram com o que foi observado por outros autores, onde na presença de um processo inflamatório, decorrente tanto de processos naturais da articulação, como em processos inflamatórios induzidos, houve aumento dos valores de CS no LS (NEUENSCHWANDER, 2016; MACHADO et al., 2012; MORAES et al., 2015; MOREIRA et al., 2015).

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo permitem concluir que frente à necessidade de se realizar lavagens articulares, a utilização de solução com DMSO a 10% é mais indicada que o uso de ringer lactato ou solução com DMSO a 5%. Entretanto, nenhum tratamento foi capaz de demonstrar efeito condroprotetor.

É importante ressaltar que todos grupos apresentaram efeito pró-inflamatório após a lavagem articular, supostamente devido à distensão da cápsula articular.

REFERÊNCIAS

- ALAAEDDINE, N. et al. Inhibition of tumor necrosis factor α -induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: Distinct targeting in the signaling pathways. **Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 4, p. 710–718, 1999.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Radioprotective and Cryoprotective Properties of Dimethyl Sulfoxide in Cellular Systems. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 141, n. 1, p. 45–62, 1967.
- ATTUR, M. et al. Prostaglandin E2 Exerts Catabolic Effects in Osteoarthritis Cartilage: Evidence for Signaling via the EP4 Receptor. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 5082–5088, 2014.
- AUER, D. E. et al. Anti-inflammatory drugs inhibit degradation of equine synovial fluid induced by free radicals. **Australian veterinary journal**, v. 68, n. 12, p. 403–405, 1991.
- BERTUGLIA, A. et al. Pro-inflammatory cytokines and structural biomarkers are effective to categorize osteoarthritis phenotype and progression in Standardbred racehorses over five years of racing career. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12917-016-0873-7>>.
- BOOM, R. et al. Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 and glycosaminoglycans in healthy equine joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 250–256, 2007.
- BOSMAN, F. T.; STAMENKOVIC, I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. **Journal of Pathology**, v. 200, n. 4, p. 423–428, 2003.
- BROSSI, P. M.; BACCARIN, R. Y. A.; MASSOCO, C. O. Do blood components affect the production of reactive oxygen species (ROS) by equine synovial cells in vitro? **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1355–1360, 2012.
- CAMPEBELL, R. C. et al. Effects of lidocaine on lipopolysaccharide-induced synovitis in horses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 281–291, 2004.
- CHOWDHURY, T. T.; BADER, D. L.; LEE, D. A. Anti-inflammatory effects of IL-4 and dynamic compression in IL-1 β stimulated chondrocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 1, p. 241–247, 2006.
- COKELAERE, S. M. et al. Sustained intra-articular release of celecoxib in an equine repeated LPS synovitis model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 128,

- p. 327–336, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.001>>.
- COLUCCI, M. et al. New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. **Pharmacological Research**, v. 57, n. 6, p. 419–425, 2008.
- DAVID-RAOUDI, M. et al. Chondroitin sulfate increases hyaluronan production by human synoviocytes through differential regulation of hyaluronan synthases: Role of p38 and Akt. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 3, p. 760–770, 2009.
- DE GRAUW, J. C.; VAN DE LEST, C. H. A.; VAN WEEREN, P. R. Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after a single inflammatory insult: A longitudinal experimental study. **Arthritis Research and Therapy**, v. 11, n. 2, p. 1–8, 2009.
- DIMOCK, A. N.; SICILIANO, P. D.; MCILWRAITH, C. W. Evidence supporting an increased presence of reactive oxygen species in the diseased equine joint. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 5, p. 439–443, 2000.
- EINERTSON, E. L. R. Evidence-based Clinical Question Evidence for dimethyl sulphoxide (DMSO) use in horses . anti-inflammatory agent. **Equine Veterinary Education**, n. november, p. 545–546, 2007.
- ELMALI, N. et al. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. **Inflammation**, v. 30, n. 1–2, p. 1–6, 2006.
- FRISBIE, D. D. et al. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 10, p. 1196–1204, 2008.
- GARVICAN, E. R. et al. Biomarkers of cartilage turnover. Part 2: Non-collagenous markers. **Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 43–49, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.012>>.
- HAWKINS, D. L. et al. Human interleukin 10 suppresses production of inflammatory mediators by LPS-stimulated equine peritoneal macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 66, n. 1, p. 1–10, 1998.
- HENROTIN, Y. E.; BRUCKNER, P.; PUJOL, J. P. L. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 11, n. 10, p. 747–755, 2003.
- HILLIDGE, C. J. The case for dimethyl sulphoxide (DMSO) in equine practice. **Equine Veterinary Journal**, v. 17, n. 4, p. 259–261, 1985.
- ISOMAKI, P. I. A. et al. Interleukin-10 Functions As an. v. 39, n. 3, p. 386–395, 1996.
- JOHN, H.; LAUDAHN, G. Clinical Experiences With the Topical Application of DmsO in Orthopedic Diseases: Evaluation of 4180 Cases. **Annals of the New York Academy of**

Sciences, v. 141, n. 1, p. 506–516, 1967.

JORGENSEN, C. et al. Interleukin-4 and interleukin-10 are chondroprotective and decrease mononuclear cell recruitment in human rheumatoid synovium in vivo. **Immunology**, v. 93, n. 4, p. 518–523, 1998.

KAMM, J. L.; NIXON, A. J.; WITTE, T. H. Cytokine and catabolic enzyme expression in synovium, synovial fluid and articular cartilage of naturally osteoarthriticequine carpi. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 8, p. 693–699, 2010.

KAPOOR, M. et al. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 1, p. 33–42, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>>.

KAY, A. G. et al. Evaluation of dmso transport in human articular cartilage: Vehicle solutions and effects on cell function. **Cryo-Letters**, v. 36, n. 3, p. 187–194, 2015.

KILBORNE, A. H.; HUSSEIN, H.; BERTONE, A. L. Effects of hyaluronan alone or in combination with chondroitin sulfate and N-acetyl-d-glucosamine on lipopolysaccharide challenge-exposed equine fibroblast-like synovial cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 5, p. 579–588, 2017.

LASARZIK, J. et al. Interleukin-1 Receptor Antagonist and Interleukin-1 Beta Levels in Equine Synovial Fluid of Normal and Osteoarthritic Joints: Influence of Anatomic Joint Location and Repeated Arthrocentesis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 42, p. 67–72, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.017>>.

LEIJS, M. J. C. et al. Effect of arthritic synovial fluids on the expression of immunomodulatory factors by mesenchymal stem cells: An explorative in vitro study. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, 2012.

LEY, C. et al. Interleukin-6 and tumour necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 54, n. 7, p. 346–351, 2007.

MA, T. W. et al. Changes in synovial fluid biomarkers after experimental equine osteoarthritis. **Journal of Veterinary Research (Poland)**, v. 61, n. 4, p. 503–508, 2017.

MACHADO, T. S. L. et al. Synovial fluid chondroitin sulphate indicates abnormal joint metabolism in asymptomatic osteochondritic horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 4, p. 404–411, 2012.

MACHADO, T. S. L. et al. Effects of blood-derived products and sodium hyaluronate on equine synovial fluid cells and on synovial fluid from osteochondrotic joints of horses after arthroscopy and administration of treatment. **American Journal of Veterinary Research**, v. 80, n. 7, p.

646–656, 2019.

MACWILLIAMS, P. S.; FRIEDRICH, K. R. Laboratory evaluation and interpretation of synovial fluid. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 33, n. 1, p. 153–178, 2003.

MARTIN, J. A.; BUCKWALTER, J. A. Articular cartilage biology. **Sports Injuries: Prevention, Diagnosis, Treatment, and Rehabilitation**, v. 11, n. 6, p. 685–692, 2012.

MCILWRAITH, C. W. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. **Equine veterinary journal**, v. 37, n. 5, p. 473–82, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16163952>>.

MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. **Bone & Joint Research**, v. 1, n. 11, p. 297–309, 2013.

MILLER, R. E.; MILLER, R. J.; MALFAIT, A. M. Osteoarthritis joint pain: The cytokine connection. **Cytokine**, v. 70, n. 2, p. 185–193, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.06.019>>.

MOSES, V. S. et al. Effects of anti-inflammatory drugs on lipopolysaccharide-challenged and -unchallenged equine synovial explants. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 54–60, 2001.

NATARAJAN, A. T. et al. Influence of DMSO on Carbon K ultrasoft X-rays induced chromosome aberrations in V79 Chinese hamster cells. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 691, n. 1–2, p. 23–26, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.06.008>>.

OZLER, K. Serum and Knee Synovial Fluid Matrixmetalloproteinase-13, Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels in Patients With Late Stage Osteoarthritis. **ACTA ORTHOPAEDICA et TRAUMATOLOGICA TURCICA**, v. 50, n. 3, p. 356–361, 2015. Disponível em: <<http://www.aott.org.tr/index.php/aott/article/view/2953/4073>>.

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L. **Joint structure, biochemistry and biochemical disequilibrium in synovitis and equine joint disease** *Equine Veterinary Journal*, 1994a. .

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L. Experimentally-induced synovitis as a model for acute synovitis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 6, p. 492–495, 1994b.

PATIL, M. Pharmacology and Clinical Use of Dimethyl Sulfoxide (DMSO): A Review. **International Journal of Molecular Veterinary Research**, v. 3, n. 6, p. 2013, 2013.

PICOLI, T. et al. Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (dmso) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (mdbk). **Science and Animal Health**, v. 3, n. 2, p. 159–168, 2015. Disponível em:

<<https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/veterinaria/article/view/6585>>.

RATHAKRISHNAN, C. et al. Release of oxygen radicals by articular chondrocytes: A study of luminol-dependent chemiluminescence and hydrogen peroxide secretion. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 10, p. 1139–1148, 1992.

REPINE, J. E. et al. Generation of Hydroxyl Radical by Enzymes, Chemicals, and Human Phagocytes In Vitro. **Journal of Clinical Investigation**, v. 64, n. 6, p. 1642–1651, 2008.

ROSS, T. N. et al. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: A comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 12, p. 1583–1590, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.08.008>>.

SANTOS, N. C. et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035–1041, 2003.

SELLAM, J.; BERENBAUM, F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 11, p. 625–635, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2010.159>>.

SMITH, C. L. et al. In vitro evaluation of the effect of dimethyl sulfoxide on equine articular cartilage matrix metabolism. **Veterinary Surgery**, v. 29, n. 4, p. 347–357, 2000.

SMITH, G. et al. Anti-inflammatory effects of topically applied dimethyl sulfoxide gel on endotoxin-induced synovitis in horses. **American Journal of Veterinary Research**, 1998.

STEEL, C. M. Equine Synovial Fluid Analysis. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 24, n. 2, p. 437–454, 2008.

TEW, W. P.; HOTCHKISS, R. N. Synovial fluid analysis and equine joint disorders. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 1, n. 5, p. 163–170, 1981. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0737-0806\(81\)80030-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0737-0806(81)80030-5)>.

TULAMO, R. -M; BRAMLAGE, L. R.; GABEL, A. A. Sequential clinical and synovial fluid changes associated with acute infectious arthritis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. 5, p. 325–331, 1989.

VAN DEN BOOM, R. et al. The influence of repeated arthrocentesis and exercise on matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor alpha activities in normal equine joints. **Equine veterinary journal**, v. 36, n. 2, p. 155–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15038439>>.

VAN WEEREN, P. R. AND BRAMA; J., P. A. Equine joint disease in the light of new developments in articular cartilage research. **Pferdeheilkunde**, v. 19, n. 4, p. 336–344, 2003.

WANG, Y.; LOU, S. Direct protective effect of interleukin-10 on articular chondrocytes in

vitro. **Chinese Medical Journal**, v. 114, n. 7, p. 723–725, 2001.

WATANABE, Y. et al. IL-1 β stimulates the expression of prostaglandin receptor EP4 in human chondrocytes by increasing production of prostaglandin E2. **Connective Tissue Research**, v. 50, n. 3, p. 186–193, 2009.

XING, L.; REMICK, D. G. Mechanisms of Dimethyl Sulfoxide Augmentation of IL-1 β Production. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 10, p. 6195–6202, 2005.

APÊNDICES

Apêndice A - Detecção de claudicação dos membros pélvicos dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos, pelo aparelho Lameness Locator® – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	0,5	3	0	1,5	0	0	4,6	8,3	0	0
2	1,5	0,4	65	1,4	1,9	0,7	1,4	7,6	2,9	6
3	0	0	0	0	0	0,4	5	3,6	2,5	0
4	1	0	0	0	0	0	0	53,4	0	0
5	2,5	3,8	25,9	19,5	9,1	1,2	1,1	0,4	2,5	0,8
6	0	0	0	5,4	3	0	0	0	0	0
7	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	1,1	1,3	13,0	4,0	2,0	0,3	1,7	10,5	1,1	1,0
DP	1,0	1,6	24,9	7,1	3,4	0,5	2,2	19,3	1,4	2,2

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	1,3	1,4	3,9	4,1	1,7	0	0	1,6	0	0
2	0	0	0	0	0	2,4	2,9	8,1	6,3	2,1
3	1,8	2,7	4,6	2,5	0	0	0	8,1	0	0
4	1	2,6	6	7,2	4,5	1,7	0,8	3,7	3,2	0,6
5	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0
6	0,4	3,6	7,2	3,4	2,2					
7	1,8	4,3	0	2,6	3,3					
Média	1	2	3	3	2	1	1	4	2	1
DP	1	2	3	2	2	1	1	4	3	1

Apêndice B - Valores médios e desvio padrão (DP) da contagem total de células nucleadas (células/ μ l) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	125	175	88400	8800	2000	260	465	51250	12450	6500
2	175	350	34600	3550	3250	60	700	59850	19050	4300
3	200	7350	38100	11650	3300	34	2700	46600	24500	45500
4	150	75	13500	17300	2900	100	150	33250	7800	5350
5	50	475	60650	24600	8350	150	150	39550	14300	4150
6	900	300	61150	22150	6425	50	75	52550	29300	5500
7	150	125	21650	9550	3150	375	375	33950	31650	13550
Média	250a	1264b	45436c	13943c	4196abc	147a	659b	45286c	19864c	12121ab
DP	290	2687	26081	7651	2292	127	926	10070	8959	15068

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	175	438	42000	11150	7250	175	150	35750	8800	1900
2	*	300	8750	15700	1350	105	375	35050	10050	6200
3	775	400	62400	12550	7700	225	725	97500	44200	13450
4	650	350	23600	12550	6150	225	200	20600	29400	8550
5	43	100	4950	13100	5600	650	50	18250	25400	17100
6	50	175	34100	18450	11050					
7	300	250	4650	7650	9550					
Média	332a	288a	25779b	13021ab	6950a	276a	300b	41430c	23570bc	9440abc
DP	312	122	21789	3402	3110	215	265	32357	14696	5977

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Apêndice B - Valores médios e desvio padrão (DP) da porcentagem de células mononucleadas (células/ μ l) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	90	92	88	73	67	10	11	88	70	73
2	89	90	92	76	67	92	97	91	80	84
3	93	94	94	80	60	94	95	91	50	85
4	92	89	92	66	44	92	88	95	62	41
5	91	82	66	75	52	93	80	79	67	40
6	76	80	84	75	43	86	83	96	71	80
7	91	93	91	81	64	93	70	87	80	59
Média	89a	89a	87a	75b	57bAB	80	75	90	69	66A
DP	6	5	10	5	10	31	30	6	10	19

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	93	66	91	58	36	93	92	81	72	27
2	*	95	88	70	27	92	91	88	67	47
3	84	80	91	75	46	94	85	96	87	31
4	93	88	82	63	37	85	85	94	63	56
5	86	86	90	57	22	87	88	80	71	40
6	92	93	90	58	28					
7	54	93	95	63	52					
Média	84a	86a	90a	63b	35bB	90a	88a	88a	72b	40bA
DP	15	10	4	7	11	4	3	7	9	12

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Apêndice B - Valores médios e desvio padrão (DP) da porcentagem de células polimorfonucleadas (células/ μ l) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	10	8	12	27	33	90	89	12	30	27
2	11	10	8	24	33	8	3	9	20	16
3	7	6	6	20	40	6	5	9	50	15
4	8	11	8	32	45	8	12	5	38	59
5	9	18	34	25	48	7	20	21	33	60
6	24	20	16	25	57	14	17	4	29	20
7	9	7	9	19	36	7	30	13	20	41
Média	11a	11a	13a	25b	42bA	20	25	10	31	34A
DP	6	5	10	4	9	31	30	6	10	19

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	7	*	9	48	64	7	8	19	28	73
2		5	12	30	73	8	9	12	34	53
3	16	20	9	25	54	6	15	4	13	69
4	7	12	18	37	63	15	15	6	37	44
5	14	14	10	43	68	13	12	20	29	60
6	8	7	10	42	72					
7	46	7	5	37	48					
Média	16a	11a	10a	37b	63bB	10a	12a	12a	28b	60bA
DP	15	6	4	8	9	4	3	7	9	12

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Apêndice C - Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de PGE₂ (pg/ml) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	34,7	132,4	867,2	229,6	63,8	14,5	*	*	216,7	96,2
2	8,3	710,7	500,0	86,1	56,3	37,8	46,3	671,4	157,6	23,1
3	10,9	436,0	536,9	119,8	58,6	18,8	879,6	258,0	175,4	137,3
4	*	*	65,3	57,6	47,1	38,8	310,0	*	815,5	144,6
5	10,6	368,0	*	607,4	259,3	22,6	46,7	337,0	119,7	76,1
6	31,6	426,5	98,8	84,2	65,5	157,6	426,5	182,6	52,3	73,0
7	25,9	21,6	45,4	30,4	20,2	18,6	19,7	56,3	17,5	33,6
Média	20,3a	349,2b	352,3b	173,6ab	81,6ab	44,1 ^a	288,1ab	301,1b	222,1ab	83,4ab
DP	11,7	244,4	335,2	201,5	79,8	50,9	334,1	231,4	270,7	46,7

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	7,3	90,6	202,5	85,1	46,1	15,1	79,8	265,7	159,9	38,3
2	15,8	241,0	146,1	48,7	18,3	3,2	241,0	42,5	16,6	8,4
3	38,3	*	196,2	63,2	70,7	67,3	578,8	*	301,4	78,7
4	20,7	19,9	77,1	79,0	33,5	26,9	22,1	91,2	25,7	41,5
5	22,9	23,4	48,5	70,8	49,4	23,3	106,6	210,8	68,3	35,5
6	16,3	19,4	282,9	87,8	84,8					
7	17,0	17,0	28,3	57,4	33,6					
Média	19,8a	68,5ab	140,2b	70,3ab	48,1a	27,2a	205,6b	152,5b	114,4ab	40,5ab
DP	9,5	89,1	93,3	14,6	23,0	24,2	223,5	103,3	118,9	25,1

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos (P<0,05).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos (P<0,05).

Apêndice D - Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de IL-1 β (pg/ml) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	8,4	12,1	30,7	5,2	4,2	8,9	*	184	10,1	9,6
2	6,4	22,7	76	9,9	5	4,9	12,4	2145	159	12,4
3	5,3	191	120	10,1	9	5,3	99,7	488	27,4	8,5
4	4,5	*	85,1	22,3	9	6,6	42,5	233	12,4	1089
5	5,7	99,7	257	17,7	10,1	7	9	55,5	14,9	11,2
6	8,0	35,1	89,8	11,8	10,1	5,3	7	13,0	441	8,04
7	4,5	6,1	128	13,6	8	7	9	55,5	14,9	11,2
Média	6,1a	61,1b	112,3c	13,0abcA	7,96abc	6,4a	29,9ab	453,4b	97,1bB	164,3ab
DP	1,5	72,0	71,2	5,6	2,37	1,3	36,6	763,1	160,8	407,7

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	6,3	8,2	21,4	9,6	4,8	7	11,7	89,8	21,1	9,6
2	7	245	213	27,4	9	5	30,5	47,4	129	7,2
3	8	48,2	33,1	7	9	7	114	441	26,5	146
4	9	7	342	58,1	8	8	10,1	131	14,9	7
5	6,1	7	63,3	11,2	11,2	10,1	16,3	59,4	29,3	33,1
6	6,1	9	79	7	6,6					
7	5,3	5,7	58,1	17,7	6,1					
Média	6,9a	47,2a	115,7b	19,7abAB	7,8a	7,4a	36,5ab	153,7b	44,2abB	40,6ab
DP	1,2	88,5	118,1	18,3	2,1	1,8	44	163,7	47,7	59,9

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos (P<0,05).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos (P<0,05).

Apêndice E - Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de IL-6 (pg/ml) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	5,7	20,6	1049	480	91,4	3,4	*	1767	434	266
2	1,7	31	2099	303	31	5,3	10,8	2950	482	28,6
3	5,3	260	956	318	62,4	4,3	28,6	972	653	285
4	8,7	*	812	35,1	8,3	4	8,2	2484	690	301
5	4	13,6	1806	816	336	5,3	10,8	2950	482	28,6
6	4,6	17	458	192	116	4	3,4	217	359	15,6
7	4	13,6	1806	816	336	9,1	9,5	111	43,9	15,6
Média	4,9a	59,3a	1283,7bAB	422,8bA	140,1ab	5a	11,9a	1635,8bB	449,1bA	134,3ab
DP	2,1	98,5	616	300,3	138,4	1,9	8,6	1222,6	213,7	140,4

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	8,2	4,9	268	128	29,8	2,9	3,7	645	218	60,2
2	5,3	34	667	132	12,6	2,5	6,7	111	80,2	2,2
3	6,3	8,2	205	27,3	6,7	5,3	42,9	858	778	162
4	5,3	5,3	121	129	12,6	7,5	6	124	21,1	8,3
5	4	7,4	126	83,9	21,1	6,7	6,7	275	72,8	15,6
6	5,3	6,7	946	142	72,7					
7	4,3	4,6	13,6	121	18,9					
Média	5,5a	10,2a	335,2bA	109bB	24,9ab	5a	13,2a	402,6bA	234abAB	49,7ab
DP	1,4	10,6	341	40,4	22,3	2,2	16,6	333,5	312,7	66,8

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Apêndice F - Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de IL-10 (pg/ml) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	80,8	210	133	49,8	99,5	74,1	*	54	74,9	215
2	86,4	211	172	157	212	49,6	90	875	233	179
3	56,6	250	69,7	117	176	169	562	201	199	173
4	32,1	*	82,9	53,1	230	43	82,7	201	193	472
5	64,9	142	164	213	301	77,6	82,7	152	155	39
6	95,4	305	80,6	118	165	63,1	75,6	74,6	91,1	72,6
7	63,1	23,8	90	39	54,9	59,4	66,9	89,2	58,5	66,9
Média	68,5a	190,3b	113,2ab	106,7ab	176,9b	76,5	160	235,2	143,5	173,9
DP	21,2	97,5	42,4	64,2	82,1	42,5	197	288,2	68,7	147,4

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	157	90,2	87,7	120	357	268	349	212	418	290
2	91,1	277	142	204	211	240	686	102	87,7	254
3	58,5	76,6	118	88,9	206	54	142	52,2	203	276
4	76,6	67,8	118	64,9	150	61,3	89,2	151	123	11,5
5	48,8	59,4	68,7	79,6	194	32,8	34,3	56,7	55,8	70,8
6	123	77,6	82,7	69,7	64,9					
7	72,6	63,1	96,4	52,2	86,8					
Média	89,6a	101,7ab	101,9a	97a	181,4b	131,2	260,1	114,8	177,5	180,4
DP	38,1	77,9	25,2	51,8	96,5	112,9	266,1	67,4	145,1	129,5

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Apêndice G - Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de TNF- α (pg/ml) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	2,1	226	2,3	2,2	2,2	2	*	4,6	2,4	2
2	2	647	5,1	4,1	4,6	1,4	565	120	25,1	5,2
3	1,8	743	3,5	1,9	1,4	2,1	778	5,9	3	2,5
4	3,1	*	3,6	4,5	3,1	16,7	1184	15	1,4	17,1
5	1,9	1011	14,4	2,5	3,7	1,8	232	5,9	2,5	1,8
6	2,1	587	3	1,9	2,1	1,4	3	1,4	30,2	2,1
7	1,8	3	3,5	2,1	2,5	2,6	4,5	7,8	3,1	3,6
Média	2,1a	536,1b	5ab	2,7ab	2,8ab	4a	461b	22,9ab	9,7ab	4,9ab
DP	0,4	364,3	4,1	1	1	5,6	470	42,9	12,4	5,5

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	2,3	95,3	13,8	2,3	3,8	3,9	537	6,3	5,7	3,5
2	2,5	1961	5,9	3	1,9	2,7	579	4,9	1,1	4,2
3	17,1	1243	3	1,1	2,5	38,2	1074	3,5	3,1	4,5
4	1,4	2,5	6,6	3	1,9	3,6	14,3	14,3	4,2	2,2
5	1,4	361	2,5	2,5	2,5	1,8	54,3	4,8	2,2	2,6
6	2,1	3	2,5	2,5	1,8					
7	2,1	198	28,8	1,8	1,8					
Média	4,1a	552b	9ab	2,3a	2,3a	10a	451,7b	6,8ab	3,2a	3,4a
DP	5,7	756,7	9,5	0,6	0,7	15,7	435,8	4,3	1,7	0,9

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Apêndice H – Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de AH ($\mu\text{g/ml}$) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	707,7	884	775,4	707,3	543	1114	*	594,6	1097,8	1176
2	590,1	389	377,1	307	300,5	528,2	598,8	442	202,2	525,4
3	479,6	519	390,9	119,7	311,3	306	288,9	265,2	261,8	253,8
4	*	*	539,4	350,1	525,5	568,9	628,2	343,4	256,6	343
5	417,2	416,9	237,6	108	461,4	206,6	*	376	343,3	600
6	419,1	685,2	256,6	316,4	272,3	468	448,4	480,9	217,3	360
7	503,7	628,5	281,9	254,2	300,8	651,7	659,6	718,1	282	*
Média	519,6ab	587,1a	408,4ab	309b	387,8ab	549,1	524,8	460	380,1	543
DP	112	185,6	192	199,8	117,5	292,5	154,7	154,9	319,7	335

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	540,1	470,7	444,8	350,5	*	705	672,4	477,7	430,5	561,4
2	*	*	405,9	320,8	359,1	775,6	655,9	518,1	623,7	570,1
3	463,9	402,3	407,6	293,2	518,7	330	270,2	359,6	265	318,2
4	473,8	460,1	418,8	223	279,5	687,3	623,8	340,3	268,4	351,4
5	585,5	636	383,3	255	624,7	645,5	729,7	552,1	519,8	354,3
6	781,7	839,7	680,6	187,1	555,8					
7	459	422,6	379,3	182,3	279					
Média	550,7a	538,6a	445,8ab	258,8b	436,1ab	628,7	590,4	449,6	421,5	431,1
DP	123,7	169,1	105,8	65,4	149,5	173,4	183	94,8	156,9	123,7

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Apêndice I - Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de CS ($\mu\text{g/ml}$) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	49,9	59,5	144,9	200,1	207	19	*	86,4	213,2	231,4
2	21,8	47	89	299,9	111,1	30,6	41,1	97,5	512,7	157,8
3	22,3	30,9	150,2	194,5	186,6	33,7	18,7	98,1	303,4	114,5
4	*	*	103,1	234,2	184,1	35	49,6	82,8	241,1	133
5	23,4	14,1	70,5	278,3	205,7	32,8	*	83,7	214,4	15,6
6	9,5	18,5	38,9	151,1	93,4	50,8	23,1	80,2	230,1	118,8
7	19,9	13,4	46,7	95,9	183	60,3	63,1	37,8	63	*
Média	24,5a	30,6a	91,9a	207,7b	167,2b	37,4a	39,1a	80,9a	254b	128,5c
DP	13,4	19	44	70,8	45,7	13,7	18,4	20,3	135,2	70

Animal	DMSO 10%					CONTROLE				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	78,7	43,3	60,7	247,3	175,2	66,4	58,4	104,2	194,2	*
2	*	*	161,1	172,4	161,1	28,6	28	32,6	223,2	137,5
3	23,1	36,9	39,7	230,3	288,4	23,5	25,1	156,5	195,8	210,9
4	34,7	32,3	74,3	250	310	31,6	32,5	44,4	100,7	108,5
5	43,4	56,1	74,5	312,8	161,9	57,8	68,4	29,6	91,2	384,5
6	37,9	58,9	177,9	297,4	264,6					
7	42,3	61	48,7	79,1	106,4					
Média	43,40a	48,12a	91a	227b	209,6b	41,6a	42,5a	73,5a	161ab	210,3b
DP	18,78	12,23	55,3	79,7	77,2	19,2	19,6	55,4	60,5	123,8

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).

Apêndice J - Valores médios e desvio padrão (DP) das medias da intensidade de fluorescência de neutrófilos do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato			DMSO 5%		
	8	24	48	8	24	48
1	2216	142	436	5111	388	952
2	209	540	537	281	309	555
3	167	290	293	147	300	334
4	248	367	223	89	140	134
5	114	192	40	176	166	45
6	305	90	133	171	290	295
7	416	207	316	*	186	232
Média	525	261	283	996	254	364
DP	752	153	170	2017	91	306

Animal	DMSO 10%			Controle		
	8	24	48	8	24	48
1	477	156	386	714	5243	327
2	440	279	293	235	729	742
3	128	227	218	131	142	138
4	174	141	161	350	117	57
5	272	219	173	358	263	192
6	128	114	175			
7	449	360	349			
Média	295	214	251	358	1299	291
DP	157	86	92	220	2219	270

*: amostra insuficiente para análise.

Apêndice J - Valores médios e desvio padrão (DP) das medias da intensidade de fluorescência de neutrófilos do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato			DMSO 5%		
	8	24	48	8	24	48
1	4519	269	614	5562	505	532
2	298	730	625	319	387	762
3	334	367	418	213	493	447
4	225	407	311	165	282	268
5	175	318	233	276	304	186
6	452	161	44	184	412	403
7	672	334	99	*	336	384
Média	954	369	335	1120	388	426
DP	1581	177	231	2177	88	187

Animal	DMSO 10%			Controle		
	8	24	48	8	24	48
1	434	298	505	497	7769	199
2	420	528	299	351	911	735
3	223	382	389	214	278	289
4	292	256	304	357	231	93
5	370	299	333	362	348	266
6	223	238	328			
7	483	529	446			
Média	349	361	372	356	1907	316
DP	105	123	78	100	3288	246

*: amostra insuficiente para análise.

Apêndice L - Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de ureia ($\mu\text{g/ml}$) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	59,7	52,4	55,4	53,5	51,8	36,5	*	37,4	37	27,5
2	37,7	44	42,7	45,8	47,3	35,8	33	36,3	34,1	35,1
3	55	38	38,7	36,8	36,1	27,9	33,4	42	48,4	53,6
4	47,3	45,6	42,7	42,9	50,2	45,5	43,6	41	46,2	39,2
5	43,1	43,4	52	51,8	46,9	*	*	49,2	46,4	44,4
6	23,4	19,5	26,5	28,6	25,4	18,3	17	20,8	23,2	23,3
7	25,4	25	27,1	29,8	31,3	32	27,7	30,1	26,5	27,1
Média	41,6	38,2	40,7	41,3	41,2	32,6	30,9	36,6	37,4	35,7
DP	13,8	11,8	11,1	9,9	10,3	9,1	9,6	9,1	10	10,8

Animal	DMSO 10%					Controle				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	37,2	38	42	40,1	41,3	41,3	40,8	37,2	38,7	42,9
2	42,6	35,5	40,9	64,1	52,6	36,7	39,8	45	37,9	42,4
3	*	*	61,7	70,4	61	45,4	41,2	35,7	36,3	36,8
4	41	40,7	42,9	40,9	40,2	30,6	28	32,1	36	37,1
5	27,3	27,7	36,9	34,6	39	24,7	24,6	26,9	26,3	23,9
6	30,2	29,4	31,8	33,6	37,3					
7	28,8	28,7	28,6	27,8	29,1					
Média	34,5	33,3	40,6	44,5	42,9	35,7	34,8	35,3	35	36,6
DP	6,6	5,4	10,7	16,2	10,5	8,2	7,9	6,6	5	7,6

*: amostra insuficiente para análise.

Apêndice M - Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de proteína ($\mu\text{g/ml}$) do LS coletado das articulações tibiotársicas dos animais durante os diferentes momentos dos tratamentos – São Paulo – 2019

Animal	Ringer Lactato					DMSO 5%				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	0,8	0,9	4,3	4,7	3	0,8	*	4,6	4	2
2	0,3	1,1	4	3,9	2,8	0,6	0,7	3,1	2,4	2,2
3	0,6	2,1	4,2	3,5	2,7	0,4	0,6	3,3	3,9	3
4	1	1,2	2,2	1,9	1,4	0,9	1,1	4,4	5,2	3,5
5	1	1,3	5,5	5,7	4,2	*	*	2,8	2,9	4,9
6	0,8	0,5	2,8	2,4	2,9	0,4	0,3	1,5	2,7	2
7	0,7	0,6	1,6	1,1	1,4	0,5	0,5	1,1	1,8	1,8
Média	0,7ac	1,1a	3,5b	3,3b	2,6bc	0,6ac	0,7a	3b	3,3b	2,8bc
DP	0,2	0,5	1,3	1,6	0,9	0,2	0,3	1,3	1,1	1,1

Animal	DMSO 10%					Controle				
	0	1	8	24	48	0	1	8	24	48
1	0,9	1,2	3,5	2,7	2,8	0,8	0,7	3	3,7	2,7
2	1,9	0,9	4,1	3,1	2,3	0,8	1	2,9	2,5	1,7
3	*	*	3,3	3	2,4	1	1,5	5,3	5,2	3,5
4	1,3	1,3	3,2	4,0	2,7	0,5	0,4	1,4	1,3	1,9
5	0,6	0,8	3,5	2,7	2,7	0,5	0,6	1,7	2,1	1,6
6	0,9	0,7	3,7	3,2	2,9					
7	0,6	0,6	0,8	1,7	1,8					
Média	1ac	0,9a	3,1b	2,9b	2,5bc	0,7ac	0,8a	2,9b	3b	2,3bc
DP	0,4	0,2	1	0,7	0,3	0,2	0,4	1,5	1,5	0,8

*: amostra insuficiente para análise. letras minúsculas denotam diferença estatística entre momentos ($P < 0,05$).

letras maiúsculas denotam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$).