

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E  
SAÚDE ANIMAL - PPS

BRUNA LUIZA CARELLI TEIXEIRA ESTRALIOTO

FATOR NECROSE TUMORAL ALFA EM LÍQUIDO SINOVIAL EM CÃES COM  
LUXAÇÃO DE PATELA

UMUARAMA

AGOSTO/2021

BRUNA LUIZA CARELLI TEIXEIRA ESTRALIOTO

Fator de Necrose Tumoral Alfa em Líquido Sinovial de Cães com Luxação de Patela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária.

Área de concentração: Saúde Animal

Umuarama

2021

## FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUNA LUIZA CARELLI TEIXEIRA ESTRALIOTO

Fator de Necrose Tumoral Alfa em Líquido Sinovial de Cães com Luxação de Patela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

### COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Juliano Bortolo de Conti

Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profa. Dr. Marilda Onghero Taffarel

UEM (Membro)

Prof. Dr. Renato Herdina Erdemann

PUC PR (Membro externo)

Aprovada em: 27 de agosto de 2021 .

Local da defesa: Defesa realizada de forma remota através do Google Meet.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

BRUNA LUIZA CARELLI TEIXEIRA ESTRALIOTO – nascida em 06 de maio de 1987, na cidade de Cascavel, Paraná. Graduou-se em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário FAG em dezembro de 2011. Realizou pós-graduação em clínica e cirurgia de pequenos animais pelo Instituto Qualittas, e na sequência pós-graduação em Oncologia Veterinária de Pequenos Animais pela Faculdade Unileya. Foi professora das disciplinas de Técnica Hospitalar e Técnica Cirúrgica no Centro Universitário FAG, além de professora no aprimoramento em clínica e cirurgia de pequenos animais ofertado pela mesma instituição. Atualmente é aluna regular do Programa de Pós-graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, nível mestrado, da Universidade Estadual de Maringá – UEM – *Campus* de Umuarama, sob orientação do Prof. Dr. Juliano Bortolo de Conti.

Glória ao Pai, ao Filho e ao Espírito Santo, como era no  
princípio agora e sempre!

Dedico esta dissertação ao meu Deus, meu marido e filhos,  
meus pais e colegas veterinários, que de uma  
maneira ou de outra contribuíram para essa  
conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus primeiramente pelo dom da vida e às oportunidades que me brindou pelo meu caminho. Tudo o que vem Dele é Graça, e eu mesmo sou pequena e não merecedora, agradeço profundamente.

Agradeço ao meu marido pelo companheirismo nos momentos de dificuldade, no cuidado com nossos filhos durante minhas ausências e momento de dedicação exclusiva ao mestrado e a esse propósito.

Agradeço aos meus pais me proporcionando tempo para execução dos trabalhos, aulas e de todo o contexto que envolveu escrever esta dissertação.

Agradeço ao meu orientador por ter confiado em mim, e permitido que eu pudesse, mesmo aparentemente sem condições, fazer este mestrado e este projeto de vida.

Também um agradecimento especial a meus colegas veterinários Rodrigo Neca Ribeiro e Rennê Leonardo Sant'Ana Gomiero por me incentivarem a realizar o mestrado e auxiliando na minha oportunidade.

Meu colega de mestrado Artur Eustáquio da Silva pelo coleguismo e empatia ao contribuir com sua experiência.

E também importante o agradecimento a toda equipe do Programa de Mestrado de Produção Sustentável e Saúde Animal que estiveram envolvidos no programa, entre professores e colaboradores, que trabalharam de forma a permitir o programa seguisse mesmo em condições adversas como o estado de pandemia que se assolou durante os anos de 2020 e 2021.

## RESUMO

### FATOR NECROSE TUMORAL ALFA EM LÍQUIDO SINOVIAL DE CÃES COM LUXAÇÃO DE PATELA

A luxação de patela é uma das causas mais comuns de claudicação em cães. Pode ser uni ou bilateral, medial ou lateral, sendo esta última menos comum e é considerada uma das principais causas de doença degenerativa do joelho de cães. Marcadores inflamatórios já são estudados há alguns anos nos casos de doenças inflamatórias crônicas e o aprofundamento de seu estudo é de grande valia, pois permite o conhecimento mais abrangente sobre a patogênese das afecções, e abre horizontes para as estratégias de tratamento. O objetivo do trabalho foi mensurar o Fator de Necrose Tumoral (TNF) no líquido sinovial da articulação fêmoro-tíbio-patelar e relacioná-lo com outros marcadores já consolidados deste tipo de afecção articular: como o escore clínico da luxação patelar, escore de claudicação e grau de osteoartrose articular. Foram selecionados 15 (n=15) animais para o estudo, sendo 10 previamente diagnosticados clinicamente com luxação patelar, agrupados no Grupo Doente (GD), e 5 animais não doentes (sem luxação patelar evidenciada clinicamente), considerados Grupo Controle (GC). Os animais do GD foram clinicamente avaliados em sua luxação patelar de acordo com os seguintes critérios: grau de luxação, grau de claudicação e grau de osteoartrite evidenciado na imagem radiográfica. Para avaliação radiográfica todos os animais foram sedados em neuroleptoanalgesia (midazolam + metadona + acepromazina), quando também foi coletada amostra de líquido sinovial para dosagem do TNF $\alpha$  através de ensaio imunoenzimático. Por fim todos os dados foram entrecruzados para avaliação de sua correlação. A correlação foi avaliada de acordo com o fator de correlação de Postos de *Spearman* ( $\sigma$ ). Como resultado, encontramos uma correlação positiva forte entre o grau de claudicação (GCI) e o grau de osteoartrite (GOA) ( $\sigma=0,8251$ ,  $p=0,0001$ ) e entre o grau de luxação (GL) e o grau de claudicação ( $\sigma=0,8172$ ,  $p=0,0002$ ), porém, não se encontrou correlação positiva importante quando correlacionados ao TNF $\alpha$  (GCI  $\sigma=-0,0078$ ,  $p=9780$ ; GL  $\sigma=-0,1354$ ,  $p=0,6304$ ; GOA  $\sigma=-0,2971$ ,  $p=0,2822$ ). Sugere-se mais estudos para a conclusão da correlação deste biomarcador sinovial e a luxação patelar em cães.

**Palavras-chave:** Cão, Citocinas, Inflamação, Osteoartrite.

## ABSTRACT

### TUMOR NECROSIS FACTOR ALFA IN SYNOVIAL FLUID IN DOGS WITH PATELLAR LUXATION

Patellar luxation is one of the most common causes of dog lameness. It can be unilateral or bilateral, medial or lateral, being this last one the less common, and it is one of the most important causes of articular knee degeneration in dogs. Inflammatory markers have been studied for years in cases of inflammatory diseases, and its study has a main importance in the knowledge of its pathogenesis, and it opens up the possibilities for new treatments. In this study, ten dogs with patellar luxation were analyzed in order to correlate their proved radiographic and clinical luxation grade with inflammatory markers such as Tumoral Necrosis Factor and their clinical lameness score, those results were confronted with the results of 5 dogs considered control. The aim of this study was to measure the Tumor Necrosis Factor (TNF) in the synovial fluid of the knee, and relate with other yet consolidated markers of this type of condition, such as clinical score of patellar luxation, lameness score and radiographic osteoarthritis score. There was selected 15 dogs (n=15) for this study, 10 of them were previously clinically diagnosed with patellar luxation and were considered Disease Group (GD), and the other 5 not affected dogs (those who did not clinically showed patellar luxation) were considered Control Group (GC). The GD animals were then clinically evaluated for their patellar luxation according to the criteria: luxation grade, lameness grade and radiographic osteoarthritis grade. For the radiographic evaluation the dogs were put on sedation with methadone, midazolam and acepromazin, and then the synovial liquid was obtained. In the end, this liquid was sent for TNF $\alpha$  dosage by ELISA. The correlation was evaluated by the correlation factor of Pearson. The results found have shown a strong positive correlation between the lameness score (GCI) and the osteoarthritis score (GOA) ( $\sigma=0,8251$ ,  $p=0,0001$ ) and the lameness score and luxation score (GL) ( $\sigma=0,8172$ ,  $p=0,0002$ ), however there was no positive or important correlation with TNF $\alpha$  (GCI  $\sigma=-0,0078$ ,  $p=9780$ ; GL  $\sigma= -0,1354$ ,  $p=0,6304$ ; GOA  $\sigma= -0,2971$ ,  $p=0,2822$ ). It is suggested that more studies should be developed in order to get a definite conclusion to the relation between this biomarker and patellar luxation in dogs.

**Keywords:** Dog, cytokines, inflammation, osteoarthritis.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1. Luxação patelar .....	1
1.1. Etiologia e patogênese .....	2
1.2. Apresentação clínica .....	2
1.3. Diagnóstico clínico e de imagem .....	3
2. Inflamação e seus marcadores .....	4
2.1 Osteoartrite e marcadores inflamatórios .....	5
3. Líquido Sinovial .....	9
OBJETIVOS .....	9
Objetivo geral .....	9
Objetivos específicos .....	10
MATERIAL E MÉTODOS .....	10
1. Seleção dos pacientes e divisão dos grupos experimentais .....	10
2. Coleta clínica de dados, exame radiográfico e coleta de amostras de líquido sinovial .....	12
3. Avaliação do TNF $\alpha$ canino .....	13
3.1 Princípio do teste .....	13
4. Estatísticas .....	16
RESULTADOS .....	17
DISCUSSÃO .....	21
CONCLUSÃO .....	23
REFERENCIAS .....	23
ANEXOS .....	27

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática de uma articulação saudável em a. Em b observa-se esquematicamente membrana sinovial em articulação com osteoartrite. Nota-se hiperplasia da camada sinovial e infiltrado de células inflamatórias. (MONTES, 2016)..... 6
- Figura 2 - Incubadora Bioplus IT-2002 do Laboratório LEACLAB (São Paulo) onde foi realizado o exame de ELISA para dosagem de TNF $\alpha$  em líquido sinovial de cães com luxação de patela. FONTE: LEACLAB - SP..... 14
- Figura 3 – Placa de ELISA e reagentes para ensaio imunoenzimático. FONTE: LEACLAB – SP..... 15
- Figura 4 – Modelo de realização do teste de ELISA pela adição do substrato e momento STOP. FONTE: LEACLAB - SP ..... 15

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação clínica dos graus de luxação de patela	5
Tabela 2 Classificação da Claudicação de cães com osteoartrite, adaptado de Pollmeier et al (2006).	11
Tabela 3 Classificação radiográfica da osteoartrite	11
Tabela 4. Dados gerais dos pacientes do grupo controle do estudo clínico de avaliação da osteoartrite na luxação patelar canina e sua relação com a quantificação de TNF $\alpha$ canino no líquido sinovial do joelho doente.	15
Tabela 5 Frequência de distribuição dos graus de luxação patelar nos animais do Grupo Doente (n=10) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação patelar, imagem radiológica e TNF $\alpha$ sinovial.	16
Tabela 6 Frequência de distribuição dos graus de claudicação nos animais do Grupo Doente (n=10) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação patelar, imagem radiológica e TNF $\alpha$ sinovial.	16
Tabela 7 Frequência de distribuição dos graus de osteoartrite nos animais do Grupo Doente (n=10) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação, patelar imagem radiológica e TNF $\alpha$ sinovial.	16
Tabela 8 Resultados das concentrações de TNF $\alpha$ (pg/mL) no Grupo Doente (1 a 10, n=10) e no Grupo Controle (11 a 15, n=5) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação patelar, imagem radiológica e TNF $\alpha$ sinovial.	17
Tabela 9. Resultados da Correlação de Postos de Spearman entre os Graus de Luxação de Patela, Graus de Claudicação, Graus de Osteoartrite (OA) e Valores de TNF $\alpha$ canino em líquido sinovial de cães com luxação de patela.	17
Tabela 10. Interpretação dos resultados no teste de Correlação de Postos de Spearman segundo Mukaka (2012).	18
Tabela 11. Teste de normalidade dos resíduos (W) de Shapiro-Wilk para Graus de Luxação de Patela, Graus de Claudicação, Graus de Osteoartrite (OA) e Valores de TNF $\alpha$ canino em líquido sinovial de cães com luxação de patela.	18

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 Curva Padrão (Standard curve) da avaliação das absorvâncias do kit ELISA Cloud-Clone de TNF $\alpha$  canino utilizado para mensurar a concentração do mesmo no líquido sinovial de cães com luxação de patela. 19

## LISTA DE ABREVIATURAS

COX	Ciclooxigenase
GC	Grupo Controle
GCl	Grau de claudicação
GD	Grupo Doente
GL	Grau de Luxação patelar
GOA	Grau de Osteoartrite
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
HRP	<i>Horseradish</i> peroxidase
IL	Interleucina
TMB	Tetrametilbenzidina
Nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
Pg	Picogramas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
mL	Mililitros

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Luxação patelar

O joelho é uma articulação complexa formada por duas articulações, a tíbio-femoral, e a patelo-femoral (JIBRI et al., 2019). A primeira é principalmente responsável pelo suporte do peso corpóreo, já a articulação patelo-femoral tem duas principais funções: a primeira é a de trabalhar como uma polia, gerando vantagem mecânica para os mecanismos de extensão; e segundo para diminuir a fricção entre os mecanismos extensores e o fêmur e permitir amplitude de movimento (JIBRI et al., 2019; VESPOLI et al., 2021). A patela em si tem formato de triângulo invertido e é embutida no tendão do quadríceps, o que a transforma no maior osso sesamóide do corpo (JIBRI et al., 2019). Distalmente a patela está fixada ao tubérculo tibial através do tendão patelar (JIBRI et al., 2019). A musculatura do quadríceps em combinação com o tendão patelar e a patela forma o mecanismo de extensão do joelho (SCHUEDA et al., 2021). A estabilidade da patela depende da relação entre a anatomia óssea regional, da atividade muscular e ligamentar (CASTRO; VIERA, 2012).

A luxação patelar é uma das causas mais comuns de claudicação em cães, e pode acometer cães de raças grandes e pequenas, sendo uma das afecções mais comuns dos joelhos de cães (ESTELITA et al., 2018; SOUZA et al., 2011). É uma doença típica de cães jovens, porém os sinais clínicos vão se tornando mais evidentes com o crescimento, e como consequência tem-se que a maioria dos casos é diagnosticada em jovens adultos, por volta dos três anos de idade (SOUZA et al., 2011; DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

A luxação pode ser medial, lateral ou bidirecional, porém a luxação lateral é menos comum, sendo mais diagnosticada em cães de raças grandes ou gigantes, e a luxação medial mais comum em raças pequenas (MORTARI et al., 2009). Fêmeas são mais predispostas a desenvolver a luxação do que machos, animais castrados a apresentam com maior incidência do que inteiros e a maioria dos cães acometidos apresenta a doença em apenas um membro pélvico (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

As raças mais comumente acometidas são: Poodle, Spitz Alemão, Yorkshire Terrier, Chihuahua, Bulldog Francês, Lhasa Apso, King Charles Cavalier, Bichón Frisé, Pug, Bulldog, West Highland White Terrier, Jack Russel Terrier e Shihtzu (SOUZA et al., 2011; DI DONA;

DELLA VALLE; FATONE, 2018). Autores ainda relatam haver estudos que identificaram anormalidades cromossômicas implicadas na luxação patelar de algumas raças específicas, sendo elas Dutch Flat-coated Retriever e Spitz Alemão (LAVRIJSEN et al., 2014; DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

### **1.1. Etiologia e patogênese**

A luxação patelar é normalmente uma desordem congênita de desenvolvimento, porém, pode ser secundária a um acidente traumático que cause ruptura ou afrouxamento da cápsula e fásia articular, levando à instabilidade femoro-patelar (DAL-BÓ et al., 2010). Ocasionalmente a luxação patelar pode ser secundária a uma complicação cirúrgica associada ao tratamento da ruptura do ligamento cruzado cranial, da própria ruptura do ligamento cruzado cranial ou fraturas envolvendo o fêmur e a tíbia (SOUZA et al., 2011; DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

Independentemente da causa, a luxação patelar ainda não é completamente entendida, uma vez que se considera que o mau alinhamento do quadríceps femoral e de um conjunto complexo de anormalidades esqueléticas (LARA et al., 2018). Segundo Di Dona et al (2018), qualquer anormalidade naquele grupo muscular, ligamento patelar, sulco troclear e tuberosidade tibial durante o crescimento do indivíduo, pode levar à instabilidade patelar. Entretanto, os mesmos autores afirmam que se há luxação patelar preexistente, ela pode afetar o quadríceps femoral, e desta maneira, levar a alterações ósseas secundárias. A luxação está associada a anormalidades anatômicas como aumento do ângulo de anteversão do colo femoral, articulação fêmoro-tíbio-patelar valga, torção medial distal do fêmur, hipoplasia do músculo vasto medial, torção lateral da tíbia, rotação externa do pé, postura curvada com alteração da marcha e displasia coxofemoral (FILHO et al., 2005; MORTARI et al., 2009; DAL-BÓ et al., 2010). Ainda, a ausência da pressão fisiológica que a patela implica na cartilagem articular do sulco troclear durante o crescimento, levar ao crescimento inadequado do mesmo em amplitude e profundidade, gerando hipoplasia troclear (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

### **1.2. Apresentação clínica**

A apresentação da doença pode variar de acordo com o temperamento de cada animal, e em partes com o grau de luxação além da gravidade da deformidade esqueléticas concomitantes (PINHEIRO et al., 2019).

A claudicação pode ser intermitente ou contínua, e normalmente é de leve a moderada, com levantamento ocasional do membro. Outro achado comum durante a avaliação é uma extensão do membro pélvico caudalmente, na tentativa de reposicionar a patela no sulco quando luxada. O deslocamento lateral produz uma sintomatologia mais grave do que a medial (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

De acordo com Di Dona et al (2018), cães com luxação patelar grau 1 são geralmente assintomáticos, entretanto ocasionalmente podem apresentar um quadro de claudicação semelhante aos pacientes com grau 2, nos quais evitam apoiar o membro durante a passada. Os mesmos autores ainda colocam que pacientes com luxação grau 2 podem evoluir para grau 3 decorrentes de erosão progressiva da crista tibial e levar a sinais clínicos mais evidentes como resultado da degeneração articular crônica. Graus 2 e 4 de luxação patelar são caracterizados por claudicação persistente e postura anormal (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018). Em alguns casos o membro pode tornar-se impotente (ESTELITA et al., 2018).

Alguns cães com luxação patelar subclínica podem desenvolver grave claudicação aguda decorrente de ruptura de ligamento cruzado cranial resultante da instabilidade articular e do processo degenerativo (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018)

### **1.3. Diagnóstico clínico e de imagem**

A avaliação ortopédica consiste na avaliação da marcha, movimentos de flexão e extensão do membro, amplitude de movimento, avaliação da tendência de luxação da patela, além da graduação (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018). Pelo caminhar e trotar é possível determinar o grau de claudicação bem como avaliar anormalidades esqueléticas mais evidentes (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

Durante a manipulação é possível determinar a instabilidade, localização da patela, possibilidade ou não de reposicionamento patelar, presença ou não de crepitação, amplitude



de movimento, dor, e presença ou ausência de movimento de gaveta (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

A pesquisa radiográfica do joelho auxilia na confirmação da luxação e avaliação de alterações degenerativas presentes na articulação, sendo também necessária avaliação de todas as estruturas esqueléticas para determinação de anormalidades e osteoartrite (SOUZA et al., 2009; DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018; JIBRI et al., 2019). É considerada o padrão ouro para avaliar as lesões articulares, e no caso da osteoartrite, é muito eficiente ao demonstrar a diminuição do espaço articular, além da presença de osteófitos, característica da doença (ISHIJIMA et al., 2011; FINAN et al., 2013).

Projeções laterais permitem avaliar a correta posição da patela no sulco troclear, e, em caso de deslocamento, a patela aparece sobreposta nos côndilos femorais, em uma posição posterior (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018). Projeções craniocaudais permitem a identificação da patela medial ou lateral à porção distal do fêmur, bem como avaliar se o paciente é valgo ou varo (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018). Pacientes com luxação em grau elevado podem apresentar dificuldades para o posicionamento ventrodorsal, uma vez que a extensão completa do joelho pode estar comprometida (MORTARI et al., 2009). Nestes casos, sugere-se a centralização da fabela para que o posicionamento do fêmur seja adequado, já que a patela não pode ser centralizada (MORTARI et al., 2009).

## **2. Inflamação e seus marcadores**

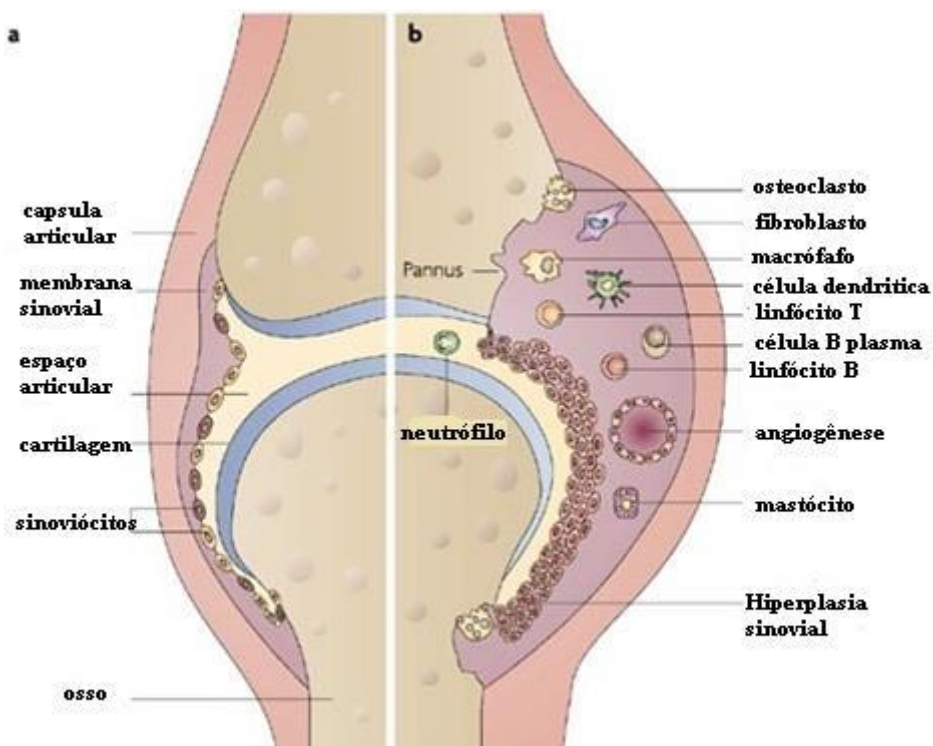
A inflamação é uma resposta protetora do organismo, que tem por finalidade eliminar corpos estranhos – microrganismos, toxinas, partículas e alérgenos – através da migração de células e da ação de células leucocitárias (BRAGA et al., 2007). O tecido que foi danificado inicia diversos eventos bioquímicos, imunológicos e celulares que devem culminar na recuperação do tecido juntamente com a sua função (BRAGA et al., 2007).

Por outro lado se a ativação da resposta for muito intensa, pode acontecer morte celular massiva, o que causa danos teciduais que podem comprometer o funcionamento dos sistemas (BRAGA et al., 2007). Se mantido o gatilho que desencadeou o processo inflamatório, a reação inflamatória resulta em um processo cronicado de lesão tecidual permanente (BRAGA et al., 2007). A inflamação é um evento intrinsecamente benéfico que

culmina na remoção dos fatores de agressão e à restauração da estrutura tecidual e função fisiológica (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). É um processo fisiológico decorrente da indução de agentes infecciosos ou de lesão tecidual, quando monócitos ativados secretam citocinas como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1(IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) que informam aos hepatócitos a necessidade de produzir proteínas de fase aguda, como por exemplo, a albumina, fibrinogênio, proteína C reativa (PCR), proteína sérica amiloide e haptoglobina (GUIMARÃES et al., 2015). É a resposta do sistema imune à infecção e lesão e tem sido envolvida na patogênese de uma série de doenças crônicas como o câncer, infarto, artrite, além de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

## **2.1 Osteoartrite e marcadores inflamatórios**

A osteoartrite é o tipo de artrite mais comum em homens e animais (MOBASHERI; HENROTIN, 2011; FINAN et al., 2013; WOJDASIEWICZ; PONIATOWSKI; SZUKIEWICZ, 2014). É uma doença crônica, degenerativa que gera dor, rigidez, diminuição de mobilidade, edema, crepitação e incapacidade, sendo a dor o sinal clínico mais proeminente da afecção (ISHIJIMA et al., 2011; SAETAN et al., 2011; FINAN et al., 2013). Sempre se considerou ser causada por alterações biomecânicas e pelo processo de envelhecimento (YUAN et al., 2003). Entretanto, ultimamente novos estudos têm demonstrado papel do processo inflamatório na sua patogênese, o que pode ser refletido nos diversos sinais clínicos da osteoartrite (YUAN et al., 2003; STANNUS et al., 2010; AKTAS; SENER; GOCUN, 2011; JAYASURIYA; CHEN, 2013). Atualmente é descrita como um processo ativo e dinâmico, com destruição e reparo acionados por fatores mecânicos e bioquímicos (BAYYURT et al., 2016).



**Figura 1** - Representação esquemática de uma articulação saudável em **a**. Em **b** observa-se esquematicamente membrana sinovial em articulação com osteoartrite. Nota-se hiperplasia da camada sinovial e infiltrado de células inflamatórias. (MONTES, 2016).

A cartilagem articular é formada pelos condrócitos e pelos seus produtos, chamados de matriz extracelular, sendo, portanto, os condrócitos as únicas estruturas celulares da cartilagem (YUAN et al., 2003). A matriz extracelular é composta primariamente de colágeno, proteoglicana e proteínas acessórias (YUAN et al., 2003). Muitos dos peptídeos antigênicos que são responsáveis pela indução da resposta imune, estão presentes nas articulações afetadas pela osteoartrite (YUAN et al., 2003).

Baseado em suas características estruturais e nutricionais, a cartilagem articular é regida por um complexo mecanismo de metabolismo cartilaginoso e síntese de proteoglicanos (YAMAMOTO et al., 2016). Os eventos patológicos são resultado da interação entre a cartilagem articular e dos tecidos adjacentes em resposta à lesão dos condrócitos ou da sua matriz extracelular (MEL et al., 2003; GONÇALVES et al., 2008). Uma vez ocorrida a lesão, inicia-se a degradação a matriz por enzimas e mediadores da inflamação (MEL et al., 2003).

A osteoartrite é caracterizada patologicamente pela perda da cartilagem, esclerose do osso subcondral e formação osteofítica (SAETAN et al., 2011). Encontram-se na maioria dos líquidos sinoviais das articulações afetadas pela doença, um grande aumento no número de células mononucleares e aumento dos níveis de imunoglobulinas e do complemento (YUAN et al., 2003; JAYASURIYA; CHEN, 2013). A membrana sinovial também demonstra alterações crônicas decorrentes da inflamação, que incluem hiperplasia das células sinoviais de revestimento com infiltração de células inflamatórias (YUAN et al., 2003; JAYASURIYA; CHEN, 2013).

Biomarcadores são definidos como uma característica que pode ser mensurada objetivamente e avaliada como um indicador de um processo biológico normal, patogênico ou pela resposta farmacológica à uma intervenção terapêutica (MOBASHERI; HENROTIN, 2011). Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, produzidas pelas células teciduais bem como por leucócitos, e são responsáveis pela comunicação entre as células do sistema imunológico, levando à acumulação de células inflamatórias e resposta imune no sítio inflamatório (SAETAN et al., 2011; IMAMURA et al., 2015). As prostaglandinas e tromboxanas são mediadores lipídicos que servem como substrato para a síntese de mediadores de defesa e reguladores homeostáticos, e são liberadas através da lesão da membrana celular frente à injúria tecidual (TILLEY; COFFMAN; KOLLER, 2001). São decorrentes da metabolização do ácido aracônico pela ciclooxigenases (COX) e isomerases específicas (TILLEY; COFFMAN; KOLLER, 2001).

Diversos estudos relacionam o aumento de citocinas como IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) em doenças como a osteoartrite de joelho e outras doenças musculares (ALFIERI et al., 2014). Citocinas proinflamatórias, como por exemplo, IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$ , induzem a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e de óxido nítrico sintase (NOS), especialmente de sua isoforma induzida (iNOS) (BRENNER et al., 2004). COX-2 e iNOS são responsáveis pelo aumento dos níveis de Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO), e ambos desempenham papel importante na inflamação e dor (BRENNER et al., 2004). Nos quadros de osteoartrites as metaloproteinases da matriz extracelular e as citocinas IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  incorrem neste tipo de processo inflamatório (AKTAS; SENER; GOCUN, 2011). Por outro lado, citocinas antiinflamatórias como a interleucina-10 (IL-10)

tem papel oposto, e tem função de gerar estímulo antinociceptivo (MALCANGIO; CLARK; OLD, 2013).

O TNF $\alpha$  é um mediador da resposta inflamatória aguda, sendo produzido por macrófagos, células dendríticas, células T e B, fibroblastos, entre outros tipos celulares (CÁO et al., 2021; OPOLSKI, 2019). Apresenta diversas funções em quase todas as células nucleadas promovendo quimiotaxia, alterações vasculares, regula crescimento celular, entre outras funções (CÁO et al., 2021). Em se tratando da regulação do crescimento celular é responsável pela promoção de sinais que promovem ativação, diferenciação e indução da morte celular (MARTÍNEZ-REZA; DÍAZ; GARCÍA-BECERRA, 2017). O aumento de sua concentração sérica normalmente está relacionada, em humanos, a doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatoide, doença de Crohn, aterosclerose, psoríase, sepse, diabetes e obesidade (OPOLSKI, 2019). Opolski (2019) diz que o TNF $\alpha$  tem papel de “mestre-regulador” da produção de citocinas inflamatórias, e por este motivo é utilizada como alvo terapêutico, onde drogas anti-TNF $\alpha$  são utilizadas no tratamento de doenças como artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal. Além disso, seu papel de biomarcador é muito estudado como agente promotor, de migração e invasão em pacientes com câncer de mama (MARTÍNEZ-REZA; DÍAZ; GARCÍA-BECERRA, 2017).

Dentre as artrites sinoviais, a osteoartrite do joelho é uma das mais comuns. (BRENNER et al., 2004; IMAMURA et al., 2015). Acredita-se que a sinovite em articulações com artrite desempenham um papel dominante no desenvolvimento da dor, inflamação articular e destruição da cartilagem (BRENNER et al., 2004). Além disso, a PGE<sub>2</sub> e o NO tem sido descritos como mediadores inflamatórios da destruição da cartilagem (BRENNER et al., 2004). Alterações degenerativas geram fragmentos de colágeno e proteoglicanos, que são biomarcadores potenciais que podem ser detectados no sangue, fluido sinovial e urina (MOBASHERI; HENROTIN, 2011).

Imamura et al (2015), revelam que valores aumentados de citocinas proinflamatórias são relacionadas com o desenvolvimento e progressão da osteoartrite decorrentes da regulação positiva da expressão de genes de metaloproteinases, alterações do metabolismo de condrócitos e aumento da reabsorção óssea por ação osteoclástica. De acordo com Stannus et al (2010), a IL-6 na articulação do joelho estimula a proliferação dos sinoviócitos e ativação osteoclástica formando um *pannus* sinovial e produção de metaloproteinases da matriz, que

por fim induz à destruição da cartilagem e da articulação. O mesmo autor, através de seu estudo onde avaliou valores séricos de IL-6 e TNF  $\alpha$ , com alterações radiográficas de joelhos em humanos, sugere que a IL-6 esteja envolvida no processo de perda da cartilagem articular já nos primeiros estágios da osteoartrite.

### **3. Líquido Sinovial**

O líquido sinovial, é, em condições normais, claro, viscoso, de coloração amarelo-palha, com pH entre 7 e 7,8 (DE BIASI et al., 2001). Trata-se de um dialisado do sangue, que recebe mucoproteínas produzidas pelos sinoviócitos (BORGES et al., 1999). Pode conter uma série de elementos celulares como células mononucleares (94-100%) e neutrófilos (0-6%) (BORGES et al., 1999; DE BIASI et al., 2001). O volume médio de líquido sinovial no joelho do cão é de 0,24mL, mas o mesmo pode variar conforme alterações patológicas (DE BIASI et al., 2001). Alterações na cor e turbidez do líquido indicam, respectivamente, presença de sangue ou aumento de celularidade (DE BIASI et al., 2001). A avaliação do líquido sinovial é um método prático para diagnosticar processos patológicos articulares (BORGES et al., 1999).

A membrana sinovial tem papel importante na evolução da osteoartrose, suas alterações na doença articular degenerativa variando de inflamação média a moderada, e incluem hipertrofia e hiperplasia das células sinoviais, infiltração linfoplasmocitária, aumento de vascularização tecidual e fibrose subsinovial (MEL et al., 2003).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Confirmar a presença do TNF $\alpha$  na inflamação articular nos casos de luxação patelar, avaliando se esta citocina pode ser utilizada como biomarcador de luxação patelar em cães.

## **Objetivos específicos**

Mensurar através do ELISA o Fator de Necrose Tumoral (TNF $\alpha$ ) no líquido sinovial da articulação fêmoro-tíbio-patelar e correlacioná-las com os escores de claudicação, luxação patelar e grau de osteoartrite evidenciado na imagem radiográfica.

Correlacionar os escores acima descritos entre si para qualificar o grau de claudicação e relacioná-lo com o processo inflamatório bem como quantificar o processo inflamatório nos diferentes graus da luxação de patela em cães.

Avaliar se o TNF $\alpha$  é um bom biomarcador para avaliar o processo inflamatório intrarticular em processos de luxação patelar.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Seleção dos pacientes e divisão dos grupos experimentais**

A execução deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá através do número do protocolo 5177210820 (ANEXO 2). Para o experimento foram selecionados 15 cães provenientes do atendimento clínico de rotina de diversas clínicas veterinárias da cidade de Cascavel - PR e Maceió - AL, sem distinção de raça e sexo, com idade entre 2 a 11 anos, pesando de 2,0 a 32 kg. Foram, então, divididos em dois grupos experimentais, sendo que 10 animais do Grupo Doente (GD, n = 10) apresentavam sabidamente luxação patelar previamente diagnosticada através da avaliação clínica, feita pelo próprio examinador em outro momento, ou por outro médico veterinário. Os demais animais fizeram parte do Grupo Controle (GC, n = 5). Os pacientes do GC deveriam apresentar grau de claudicação zero de acordo escala na sequência descrita. Os pacientes foram avaliados sempre por apenas dois observadores, um médico veterinário ortopedista, e outro clínico geral.

Para participar dos grupos de avaliação os pacientes deveriam se enquadrar nos seguintes critérios:

- No caso de fêmeas: não poderiam estar gestantes ou em estro.
- Pacientes não poderiam ter utilizado medicação analgésica e/ou anti-inflamatória nos últimos 15 dias até o momento da coleta dos dados.
- Pacientes não poderiam apresentar outras alterações ortopédicas não relacionadas ou não à luxação patelar.
- Pacientes não poderiam ter diagnóstico de outra doença sistêmica inflamatória ou infecciosa concomitantes ao momento da coleta de dados.

As coletas foram realizadas entre os meses de janeiro a novembro de 2020.

**Tabela 1** *Classificação clínica dos graus de luxação de patela*

<b>Grau 1</b>	Patela pode ser luxada manualmente, mas retorna à posição normal quando solta.
<b>Grau 2</b>	Patela luxa com flexão do joelho ou por manipulação manual e mantém-se luxada até a extensão do joelho ou quando recolocada manualmente.
<b>Grau 3</b>	Patela se mantém luxada continuamente e pode ser manualmente recolocada, mas irá luxar novamente espontaneamente quando a pressão manual é removida.
<b>Grau 4</b>	Patela fica luxada continuamente e não pode ser manualmente reposicionada.

(DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018)

**Tabela 2** *Classificação da Claudicação de cães com osteoartrite, adaptado de Pollmeier et al (2006).*

<b>Grau 0</b>	Sem claudicação
<b>Grau 1</b>	Pequena claudicação (anormalidade de marcha ocasional)
<b>Grau 2</b>	Claudicação moderada (anormalidade de marcha evidente e/ou não apoio do membro ocasional)
<b>Grau 3</b>	Claudicação severa (continuamente não apoia o membro)

(POLLMEIER et al., 2006)

**Tabela 3** *Classificação radiográfica da osteoartrite*

<b>Grau 0</b>	Articulação normal
<b>Grau 1</b>	Evidência radiográfica de instabilidade; sem alterações degenerativas
<b>Grau 2</b>	Pequenas alterações degenerativas (osteófitos ocasionais)



<b>Grau 3</b>	Alterações degenerativas moderadas (osteófitos, esclerose subcondral)
<b>Grau 4</b>	Severa alteração degenerativa (osteófitos, esclerose subcondral, remodelamento ósseo)

(BLACK et al., 2007)

**Tabela 4** Interpretação dos resultados no teste de Correlação de Postos de Spearman segundo Mukaka (2012).

VALORES DO COEFICIENTE ( $\rho$ )	CORRELAÇÃO	FORÇA DA CORRELAÇÃO
0,9 a 1	Positiva ou Negativa	Muito Forte
0,7 a 0,9	Positiva ou Negativa	Forte
0,5 a 0,7	Positiva ou Negativa	Moderada
0,3 a 0,5	Positiva ou Negativa	Fraca
0 a 0,3	Positiva ou Negativa	Desprezível

FONTE: (MUKAKA, 2012)

## 2. Coleta clínica de dados, exame radiográfico e coleta de amostras de líquido sinovial

Todos pacientes foram então submetidos à avaliação clínica da luxação patelar, pelo examinador, para graduação da luxação e grau de claudicação de acordo com Di Dona et al (2018) (Tabela 1) e de acordo com a escala de Pollmeier et al. (2009) (Tabela 2) respectivamente. Estes animais também tiveram seus joelhos avaliados em avaliação radiográfica conforme classificação de acordo com Black et al (2007) (Tabela 3). Para exame radiográfico os pacientes foram submetidos à neuroleptoanalgesia. Para tanto, foi utilizada acepromazina (0,05 mg/Kg), e metadona (0,2 mg/Kg), associados ao midazolam (0,3mg /Kg), todos por via intramuscular (IM). As radiografias foram realizadas em duas projeções (craniocaudal e médio-lateral) do membro afetado, com aparelho digital.

O líquido sinovial foi coletado com paciente sob neuroleptoanalgesia nas mesmas condições descritas para a realização do exame radiográfico. Foi realizada tricotomia da articulação afetada, com introdução da agulha (25 mm x 0,7 mm acoplada à seringa de 3 mL)

entre a patela e a tuberosidade da tíbia, lateralmente ao ligamento patelar, sempre utilizando-se da técnica asséptica. O volume de líquido coletado variou de 0,2 a 0,3 mL, de acordo com o tamanho do animal. O material foi então armazenado em tubos tipo *ependorf* de pressão de 1,5mL, identificado na tampa, e alocado em botijão de nitrogênio líquido a temperaturas menores a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até envio para laboratório para análise do TNF $\alpha$  canino.

### **3. Avaliação do TNF $\alpha$ canino**

A análise do TNF $\alpha$  canino foi realizada pela área técnica do laboratório Leac, situado na Av. Gal. Ataliba Leonel, número 93, 10º andar – Conjunto 101/102, Santana, São Paulo – SP.

Para o transporte os *ependorfs* foram colocados em uma caixa do tipo colméia que continha grades internas e manteve os frascos na posição vertical durante todo o percurso. A caixa foi então colocada em sacola tipo *Specimen Bag* e esta posteriormente colocada em caixa de isopor forrada com papel absorvente contendo 5 kg de gelo seco padrão criogênico, que manteve a temperatura no interior do recipiente em torno de  $-78^{\circ}\text{C}$ .

Uma vez no laboratório, o material foi descongelado a temperatura ambiente para análise e as amostras de líquido sinovial foram tratadas com hialuronidase. O kit ELISA utilizado foi o Kit TNF Canine ELISA da marca *Cloud-Clone Corporation*, Cat. # SEA133Ca – Lot C210204841 – Exp. Fev/2022, fornecido pela *Cloud-Clone* (Texas-Estados Unidos da América).

#### **3.1 Princípio do teste**

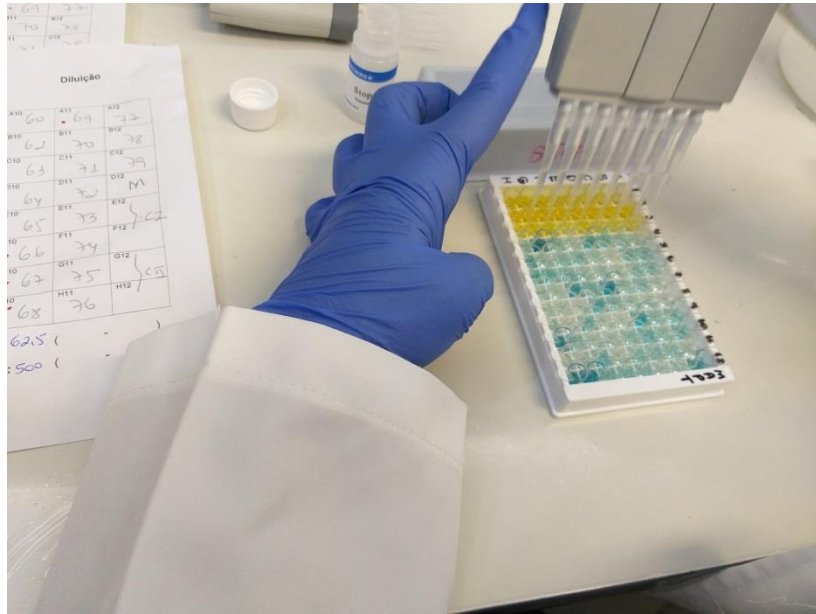
A placa fornecida pelo kit do teste utilizado é pré-revestida por anticorpos específicos para TNF $\alpha$ . Os controles e amostras são adicionados aos poços da placa com um anticorpo específico para TNF $\alpha$  conjugado com biotina. Na sequência, avidina conjugada à horseradish peroxidase (HRP) é adicionada a cada poço da microplaca e o conjunto fica incubado. Com a inclusão da solução cromogênica de tetrametilbenzidina (TMB), os poços que continham TNF $\alpha$ , anticorpo conjugado à biotina e avidina conjugada à HRP apresentam alteração de cor. A reação enzimática é finalizada quando se faz a adição de solução de ácido sulfúrico e a

alteração da cor é mensurada espectrofotometricamente pelos comprimentos de onda mensurados entre  $450\text{nm} \pm 10\text{nm}$ . A concentração da  $\text{TNF}\alpha$  nas amostras é então determinada pela comparação entre as densidades ópticas das amostras e a curva padrão.

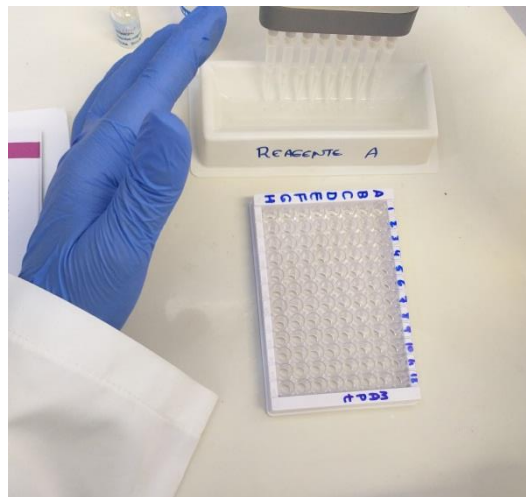
A sensibilidade do kit utilizado foi de  $6,1 \text{ pg/mL}$ , sendo que o desvio da curva foi de  $15,6$  a  $1.000 \text{ pg/mL}$ . Os desvios de controle têm como objetivo informar a validação da curva e a performance do kit (Gráfico 1), e neste caso foram  $\text{CI} = 20,3$  a  $42,1$  e  $\text{CII} = 162,5$  a  $337,5 \text{ pg/mL}$ , sendo o controle de qualidade do kit. A curva padrão é utilizada para detectar a concentração das amostras, e é uma análise da absorvência versus as concentrações padrão.



**Figura 2** - Incubadora Bioplus IT-2002 do Laboratório LEACLAB (São Paulo) onde foi realizado o exame de ELISA para dosagem de  $\text{TNF}\alpha$  em líquido sinovial de cães com luxação de patela. FONTE: LEACLAB - SP

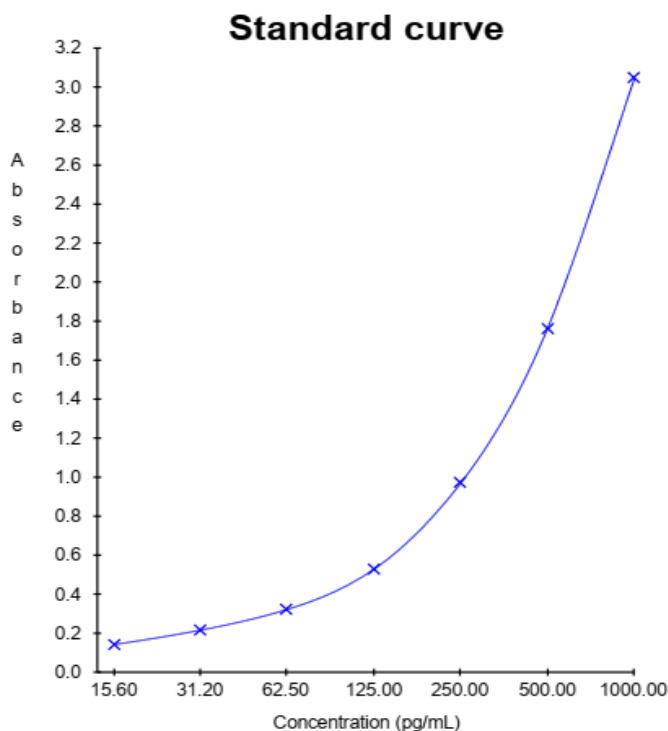


**Figura 3** – Placa de ELISA e reagentes para ensaio imunoenzimático. FONTE: LEACLAB – SP.



**Figura 4** – Modelo de realização do teste de ELISA pela adição do substrato e momento STOP. FONTE: LEACLAB – SP

**Gráfico 1** Curva Padrão das absorvâncias do kit ELISA Cloud-Clone de TNF $\alpha$  canino utilizado para mensurar a concentração do mesmo no LS de cães com luxação de patela.



#### 4. Estatísticas

A análise estatística dos resultados para a comparação entre os grupos foi realizada através da avaliação do Coeficiente de Correlação de Postos de *Spearman* entre todas as variáveis estudadas (grau de claudicação, indicações radiográficas de osteoartrite, grau de luxação patelar), do grupo controle e do grupo doente, e a concentração de TNF $\alpha$  do líquido sinovial.

Os dados foram inicialmente tratados para avaliar a normalidade, prerrogativa para utilização do tipo de teste selecionado. O teste utilizado para avaliação da normalidade foi Jarque- Bera.

A correlação é uma forma de avaliar a força de associação entre duas variáveis feita através da avaliação do coeficiente de correlação, trata-se de uma medida adimensional que pode variar de -1 a +1 (MUKAKA, 2012). Quando o coeficiente é zero indica que não há relação linear, se entre -1 e +1 indica grande correlação negativa (inversamente proporcionais)

ou positiva (diretamente proporcionais), respectivamente (MUKAKA, 2012). Há uma grande variedade de técnicas estatísticas que examinam amostras independentes do formato de sua distribuição, chamadas de testes não paramétricos, como por exemplo, os testes de Wilcoxon e o coeficiente de Spearman (MIOT, 2017).

## RESULTADOS

Foram analisados inicialmente 32 animais (n=32) com o intuito de utilizá-los para o estudo. Destes, 17 foram excluídos por enquadrarem-se dentro do critério de exclusão. Dentre os animais aptos para o estudo, analisou-se no grupo doente (n=10) que 60% (6) eram fêmeas, e 40% (4) eram machos, com idade média de 5,3 anos, e peso médio de 7,1kg. A raça mais acometida pela patologia neste estudo foram Yorkshire e SRD, que representaram cada um, 20% (2) dos animais do grupo. As demais raças estão descritas conforme Tabela 5, e representaram cada uma 10% (1) do grupo amostral.

A maior parte dos animais que apresentavam a doença foram diagnosticados com grau 2 e 3 de luxação patelar, conforme classificação de Di Dona et al (2018), representando 80% (8) dos animais estudados (Tabela 6). O grau de claudicação acompanhou positivamente o grau de luxação patelar, uma vez que os animais com maior grau de luxação patelar apresentaram maior frequência de claudicação.

**Tabela 5** Dados gerais dos pacientes do grupo controle do estudo clínico de avaliação da osteoartrite na luxação patelar canina e sua relação com a quantificação de TNF $\alpha$  canino no líquido sinovial do joelho doente.

ANIMAIS	GRAU LUX. <sup>1</sup>	GRAU CLAUD. <sup>2</sup>	GRAU OA <sup>3</sup>	SEXO <sup>4</sup>	PESO (Kg)	IDADE (anos)	RAÇA
1	2	0	1	F	2,6	3	Yorkshire
2	1	0	0	M	2	3	Spitz
3	3	2	2	M	6,9	5	SRD
4	2	1	1	M	4	4	Bulldog Francês
5	3	2	1	F	8	5	Pug
6	2	3	2	F	9,2	9	Poodle

<b>7</b>	3	3	2	M	13	11	SRD
<b>8</b>	4	3	1	F	19	2	Huskye
<b>9</b>	2	0	0	F	2	2	Yorkshire
<b>10</b>	3	1	0	F	4	9	Pinscher

<sup>1</sup>GRAU LUX.: Grau da luxação patelar evidenciada clinicamente, de acordo com Di Dona et al (2018); <sup>2</sup>GRAU CLAUD.: Grau de claudicação do membro afetado, adaptado de Pollmeier et al (2006); <sup>3</sup>GRAU AO: Grau de osteoartrite evidenciada pela radiografia, de acordo com Black et al (2007); <sup>4</sup>F: fêmeas/ M: machos. Fonte: acervo pessoal.

Por outro lado, a 30% (3) dos pacientes doentes, sequer apresentaram algum sinal de claudicação, ou quando apresentavam o faziam em grau mais elevado (grau 3) (Tabela 7).

Com relação a evidencia radiográfica de osteoartrite, considerando apenas os animais doentes, a maioria (26,67% - 4) apresentaram grau de osteoartrite 2 (Tabela 8).

Analisou-se então, conforme descrito anteriormente através do exame de ELISA a concentração média de TNF $\alpha$ , que foi aferida nos joelhos dos animais doentes e do grupo controle (Tabela 8). A média do valor de TNF $\alpha$  para o grupo doente foi de 37,02pg/mL (n=10). Com o tratamento dos dados para retirada de *outliers* temos uma média de 23,11pg/mL (n=8) para o grupo doente. Por fim para o grupo controle (n=5) a concentração de TNF $\alpha$  do líquido sinovial foi de 35,93pg/mL.

Os dados das Tabelas 6, 7, 8 e 9 foram então submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ( $p>0,9$ ) para classificação dos dados e seleção do teste de correlação. Na sequencia foi o teste de correlação de Postos de *Spearman*. Foram executadas as correlações entre todas as variáveis estudadas utilizando uma análise de combinações, e os resultados podem ser vistos na Tabela 10. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com Mukaka (2012) (Tabela 4).

**Tabela 6** Frequência de distribuição dos graus de luxação patelar nos animais do Grupo Doente (n=10) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação patelar, imagem radiológica e TNF $\alpha$  sinovial.

GRAU LUX. DE PATELA <sup>1</sup>	No DE ANIMAIS <sup>2</sup>	PERCENTUAL (%)
----------------------------------	----------------------------	----------------

1	1	10,00
2	4	40,00
3	4	40,00
4	1	10,00
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>100,00</b>

<sup>1</sup>GRAU LUX. DE PATELA: Grau da luxação patelar evidenciada clinicamente, de acordo com Di Dona et al (2018); 2. Número de animais. Fonte: acervo pessoal.

**Tabela 7** Frequência de distribuição dos graus de claudicação nos animais do Grupo Doente (n=10) e no Grupo Controle (n=5) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação patelar, imagem radiológica e TNF $\alpha$  sinovial.

<b>GRAU DE CLAUDICAÇÃO<sup>1</sup></b>	<b>No DE ANIMAIS<sup>2</sup></b>	<b>PERCENTUAL (%)</b>
0	8	53,34
1	2	13,33
2	2	13,33
3	3	20,00
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>100,00</b>

<sup>1</sup>GRAU DE CLAUDICAÇÃO: Grau da claudicação evidenciada clinicamente, de acordo com Pollmeier et al (2006); 2. Número de animais. Fonte: acervo pessoal.

**Tabela 8** Frequência de distribuição dos graus de osteoartrite nos animais do Grupo Doente (n=10) e no Grupo Controle (n=5) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação, patelar imagem radiológica e TNF $\alpha$  sinovial.

<b>GRAU OSTEOARTRITE<sup>1</sup></b>	<b>No DE ANIMAIS<sup>2</sup></b>	<b>PERCENTUAL (%)</b>
0	8	53,33
1	4	26,67
2	3	20,00
3	0	00,00
4	0	00,00
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>100,00</b>

<sup>1</sup>GRAU DE OSTEOARTRITE: Grau de evidenciada radiográfica de osteoartrite, classificada de acordo com Black et al (2007) 2. Número de animais. Fonte: acervo pessoal.



**Tabela 9** Resultados das concentrações de TNF $\alpha$  (pg/mL) no Grupo Doente (1 a 10, n=10) e no Grupo Controle (11 a 15, n=5) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação patelar, imagem radiológica e TNF $\alpha$  sinovial.

ANIMAIS	CONCENTRAÇÃO TNF $\alpha$ LS (pg/mL) <sup>1</sup>
1	10,65
2	25,82
3	33,63
4	10,92
5	25,52
6	26,61
7	22,33
8	29,39
9	9,37
10	175,93
<b>11</b>	<b>27,79</b>
<b>12</b>	<b>28,03</b>
<b>13</b>	<b>42,21</b>
<b>14</b>	<b>53,60</b>
<b>15</b>	<b>28,03</b>

<sup>1</sup>CONCENTRAÇÃO TNF $\alpha$  LS: Concentração de TNF $\alpha$  encontrada no líquido sinovial dos cães do estudo, em picogramas por mililitros, utilizando método ELISA. Para os animais em que foi possível realizar e replicação da amostra, utilizou-se o valor da média de ambos resultados como resultado final que é o presente na tabela. Fonte: acervo pessoal. Em negrito estão os resultados dos animais do GC.

**Tabela 10** Resultados da Correlação de Postos de *Spearman* entre os Graus de Luxação de Patela, Graus de Claudicação, Graus de Osteoartrite (OA) e Valores de TNF $\alpha$  canino em líquido sinovial de cães com luxação de patela.

VARIÁVEIS <sup>1</sup>	VALORES DO COEF. ( $\rho$ )	VALOR DE p	CORRELAÇÃO	FORÇA DA CORRELAÇÃO
Grau Lux x Grau Claud	0,8172	0,0002	Positiva	Forte
Grau Lux x Grau OA	0,6743	0,0058	Positiva	Moderada

Grau Lux x Valor TNF	-0,1354	0,6304	Negativa	Desprezível
Grau Claud x Grau OA	0,8251	0,0001	Positiva	Forte
Grau Claud x Valor TNF	-0,0078	0,9780	Negativa	Desprezível
Grau AO x Valor TNF	-0,2971	0,2822	Negativa	Desprezível

<sup>1</sup>Grau Lux: Grau de luxação patelar; Grau Claud: Grau de claudicação; Grau OA: Grau de osteoartrite; Valor TNF: Valor do Fator de Necrose Tumoral alfa. FONTE: Acervo pessoal.

## DISCUSSÃO

A análise dos resultados iniciou-se pela avaliação da normalidade dos dados, pois a análise do coeficiente de correlação de *Spearman* utilizado para esta análise estatística não paramétrica, pois não se tratam de dados normais (MIOT, 2017). A análise foi feita através do teste de normalidade de *Shapiro Wilk* (Tabela 11).

A curva de absorvância do kit ELISA utilizado também indica que os resultados dos exames são validados (Gráfico 1).

**Tabela 11** Teste de normalidade dos resíduos de *Shapiro Wilk* (p) de para Graus de Luxação de Patela, Graus de Claudicação, Graus de Osteoartrite (OA) e Valores de TNF $\alpha$  canino em líquido sinovial de cães com luxação de patela. Valores de  $p > 0.05$  são considerados normais.

VARIÁVEL <sup>1</sup>	TESTE DE NORMALIDADE (p) <sup>2</sup>
GL	0,845
GCL	0,750
GOA	0,749
TNF	0,541

<sup>1</sup>GL: Grau de luxação patelar; GCL: Grau de claudicação; GOA: Grau de osteoartrite; TNF: Valor do Fator de Necrose Tumoral alfa. FONTE: Acervo pessoal. <sup>2</sup> de acordo com Lucambio (2008)  $p > 0.9$  são considerados normais.

A média de animais diagnosticados com luxação patelar neste estudo foi de 5,3 anos, sendo mais alta do que a encontrada em outros estudos (LARA et al., 2013; DI DONA, F.; DELLA VALLE, G.; FATONE, G., 2018; SONTAG, 2019), percebendo-se o mesmo quando avaliamos o peso médio dos animais doentes, que nesse estudo foi de 7,1kg, também maior do que o de as encontradas por Sontag (2019), Di dona et al (2016), porém condizendo com Arthurs & Langley-Hobbs (2006) e Lara et al (2013).

Ao avaliarmos os cães que apresentam luxação patelar, percebemos que o diagnóstico acontece quando já se consideram graus 2 e 3 (ARTHURS; LANGLEY-HOBBS, 2006; MAEDA et al., 2019), uma vez que nesse estágio os animais já começam a apresentar alterações de marcha. Animais de pequeno porte, principalmente de raças *Toy* apresentam-se acometidos em maior frequência (DI DONA, F.; DELLA VALLE, G.; FATONE, G., 2018; MAEDA et al., 2019; SONTAG, 2019). Alguns estudos corroboram com este quando demonstram que a prevalência do aparecimento da afecção em fêmeas é maior do que em machos (SOUZA et al., 2009; DI DONA et al., 2016; MAEDA et al., 2019).

Percebe-se que alguns animais, podem nem mesmo apresentar clinicamente a doença, uma vez que 30% (3) dos animais doentes sequer apresentam claudicação, mesmo apresentando graus de luxação variando entre 1 e 2. Hamilton et al (2020) sugere que 50% dos animais que apresentam o que ele chama de luxação patelar medial grau 2 oculta, apresentam algum tipo de desordem articular ipsilateral à lesão oculta ou contralateral com o passar do tempo, tornando-se candidatos à cirurgia corretiva (HAMILTON et al., 2020).

Sontag (2019) realiza um estudo semelhante de correlação entre os graus de luxação patelar, claudicação e de osteoartrite. Seus resultados são bastante semelhantes ao avaliarmos o tipo de correlação entre eles. Percebemos que encontra também correlação positiva entre o Grau de luxação X Grau de claudicação, Grau de luxação X Grau de osteoartrite e Grau de claudicação e Grau de osteoartrite (SONTAG, 2019). Porém este estudo evidencia de forma mais significativa a correlação entre o grau de claudicação e as evidências radiográficas de osteoartrite, que neste estudo foi forte.

Com relação à avaliação do Fator de Necrose Tumoral alfa, percebe-se que há apenas correlação negativa, indicando que esta citocina tende a diminuir conforme o agravamento dos casos de luxação patelar, mas vale ressaltar que considerando a curva padrão estes valores quase não se distribuem o que indica que as alterações são pouco significativas entre elas. Além disso, percebe-se que, uma vez retirados os pacientes *outliers* a média da concentração

do mesmo no grupo doente (23,11pg/mL) é menor quando comparada com a do grupo controle (35,93pg/mL). Quando correlacionada com os demais parâmetros examinados, percebe-se que sua correlação é desprezível (GL x TNF $\alpha$  –  $\sigma$ =-0,1354; GCL x TNF $\alpha$  –  $\sigma$ =-0,0078; GOA x TNF $\alpha$  –  $\sigma$  = -0,2971), de acordo com Mukaka (2012). Vale salientar que os resultados não são, portanto, condizentes com o que nos trazem Rezende, Campos e Pailo (2013), uma vez que sabemos que os condrócitos e as células sinoviais são responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias, entre elas o TNF $\alpha$  (REZENDE; CAMPOS; PAILO, 2013; SARTORI-CINTRA; AIKAWA; CINTRA, 2014).

Poucos são os estudos que relacionam biomarcadores pró-inflamatórios presentes no líquido sinovial, especialmente em cães, com o aumento do escore de avaliação clínica de luxação patelar. A sugestão que este trabalho apresenta é a de que as citocinas inflamatórias, ou pelo menos algumas, podem se comportar de forma diferente no meio extra articular quando no meio intra articular.

## **CONCLUSÃO**

Através dos estudos realizados para o presente trabalho, pode-se concluir que houve uma forte correlação positiva entre o Grau de Luxação patelar e o Grau de claudicação e o Grau de claudicação e o grau de osteoartrite dos animais doentes. A correlação entre o Grau de Luxação e o Grau de Osteoartrite foi moderada.

Com relação à concentração de TNF $\alpha$  no líquido sinovial, percebe-se que a correlação entre o mesmo e os demais critérios avaliados é negativa, porém desprezível. Não foi possível, porém, observar correlação relevante entre qualquer um dos fatores acima descritos quando relacionados à quantificação do TNF $\alpha$ , sugerindo que não há ligação, ou que mais estudos precisam ser realizados, preconizando um número amostral maior.

## **REFERENCIAS**

- AKTAS, E.; SENER, E.; GOCUN, P. U. Mechanically induced experimental knee osteoarthritis benefits from anti-inflammatory and immunomodulatory properties of simvastatin via inhibition of matrix metalloproteinase-3. **Journal of Orthopaedics and Traumatology**, v. 12, n. 3, p. 145–151, 2011.
- ALFIERI, F. M. et al. Concentration of cytokines in patients with osteoarthritis of the knee and fibromyalgia. **Clinical Interventions in Aging**, n. June, p. 939, 2014.
- ARTHURS, G. I.; LANGLEY-HOBBS, S. J. Complications associated with corrective surgery for patellar luxation in 109 dogs. **Veterinary Surgery**, v. 35, n. 6, p. 559–566, 2006.
- BAYYURT, S. et al. The chondroprotective effects of intraarticular application of statin in osteoarthritis: An experimental study. **Indian Journal of Orthopaedics**, v. 49, n. 6, p. 665, 2016.
- BLACK, L. L. et al. **Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints: A Randomized, Double-Blinded, Multicenter, Controlled Trial\*** *Veterinary Therapeutics* • [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.VeterinaryTherapeutics.com](http://www.VeterinaryTherapeutics.com)>. Acesso em: 14 ago. 2019.
- BORGES, A. P. B. et al. Composição do líquido sinovial de cães com ruptura do ligamento cruzado cranial. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 285–289, jun. 1999. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84781999000200016&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781999000200016&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 16 ago. 2019.
- BRAGA, D. K. et al. Modulação da inflamação por Ômega-3 / 6. **Salusvita**, v. 27, n. 3, p. 275–282, 2007.
- BRENNER, S. S. et al. Osteoarthritis of the knee - Clinical assessments and inflammatory markers. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 12, n. 6, p. 469–475, 2004.
- DAL-BÓ, Í. dos S. et al. Lateral patellar luxation in Poodle toy. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 217–220, 2010.
- DE BIASI, F. et al. Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, p. 563–567, out. 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352001000500009&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000500009&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 16 ago. 2019.
- DI DONA, F.; DELLA VALLE, G.; FATONE, G. Patellar luxation in dogs. **Veterinary medicine: Research and Reports**, v. 9, p. 23–32, 2018.
- DI DONA, F. et al. Lateral patellar luxation in nine small breed dogs. **Open Veterinary Journal**, v. 6, n. 3, p. 255–258, 2016.

FILHO, P. et al. Tratamento da luxação lateral da patela em poodles toy. **Ciencia Rural**, v. 35, n. 4, p. 843–847, 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33115800015>>.

FINAN, P. H. et al. Discordance between pain and radiographic severity in knee osteoarthritis: Findings from quantitative sensory testing of central sensitization. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 2, p. 363–372, 2013.

GONÇALVES, G. et al. Effects of chondroitin sulfate and sodium hyaluronate on chondrocytes and extracellular matrix of articular cartilage in dogs with degenerative joint disease. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 93–102, 2008.

GUIMARÃES, A. D. O. et al. Proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação na avaliação laboratorial de processos inflamatórios. **Scire Salutis**, v. 4, n. 1, p. 6–16, 2 set. 2015. Disponível em: <<http://www.sustenere.co/index.php/sciresalutis/article/view/SPC2236-9600.2014.001.0001>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

HAMILTON, L. et al. The natural history of canine occult Grade II medial patellar luxation: an observational study. **Journal of Small Animal Practice**, v. 61, n. 4, p. 241–246, 2020.

IMAMURA, M. et al. Serum levels of proinflammatory cytokines in painful knee osteoarthritis and sensitization. **International Journal of Inflammation**, v. 2015, n. March, 2015.

ISHIJIMA, M. et al. Relationships between biomarkers of cartilage, bone, synovial metabolism and knee pain provide insights into the origins of pain in early knee osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 13, n. 1, p. R22, 2011. Disponível em: <<http://arthritis-research.com/content/13/1/R22>>.

JAYASURIYA, C. T.; CHEN, Q. Role of Inflammation in osteoarthritis. **Rheumatol Curr Res**, v. 3, n. 2, p. 1–2, 2013. Disponível em: <<https://www.longdom.org/open-access/role-of-inflammation-in-osteoarthritis-2161-1149.1000121.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

JIBRI, Z. et al. Patellar maltracking: an update on the diagnosis and treatment strategies. **Insights into imaging**, v. 10, n. 65, p. 1–11, 14 jun. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31201575>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

LARA, J. S. et al. Aspectos clínicos, cirúrgicos e epidemiológicos da luxação de patela em cães atendidos no hospital veterinário, no período de janeiro de 2000 a julho de 2010: Estudo retrospectivo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1274–1280, 2013.

LAVRIJSEN, I. C. M. et al. Genome-wide survey indicates involvement of loci on canine chromosomes 7 and 31 in patellar luxation in flat-coated retrievers. **BMC Genetics**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2014.

- MAEDA, K. et al. Evidence of genetic contribution to patellar luxation in toy poodle puppies. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 81, n. 4, p. 532–537, 2019.
- MALCANGIO, M.; CLARK, A. K.; OLD, E. A. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. **Journal of Pain Research**, n. November, p. 803, 2013.
- MEL, E. G. et al. Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa experimental em cães. Aspectos clínicos e radiológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 1, p. 35–43, 2003.
- MIOT, H. A. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais Assessing normality of data in clinical and experimental trials. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 16, n. 2, p. 88–91, 2017.
- MOBASHERI, A.; HENROTIN, Y. Biomarkers of Osteoarthritis: A Review of Recent Research Progress on Soluble Biochemical Markers, Published Patents and Areas for Future Development. **Recent Patents on Biomarkers**, v. 1, n. 1, p. 25–43, 2011.
- MORTARI, A. C. et al. Use of radiographic measurements in the evaluation of dogs with medial patellar luxation. **The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne**, v. 50, n. 10, p. 1064–1068, 2009.
- MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.
- POLLMEIER, M. et al. Clinical evaluation of firocoxib and carprofen for the treatment of dogs with osteoarthritis. **Veterinary Record**, v. 159, n. 17, p. 547–551, 21 out. 2006. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.159.17.547>>. Acesso em: 14 ago. 2019.
- REZENDE, M. U. de; CAMPOS, G. C. de; PAILO, A. F. Conceitos atuais em osteoartrite. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 120–122, 2013.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. ATVB in Focus Inflammation Prostaglandins and Inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, p. 986–1000, 2011. Disponível em: <<http://ahajournals.org>>. Acesso em: 30 jul. 2019.
- SAETAN, N. et al. Association of plasma and synovial fluid interferon- $\gamma$  inducible protein-10 with radiographic severity in knee osteoarthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 1218–1222, out. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000991201101424X>>. Acesso em: 25 jul. 2019.
- SARTORI-CINTRA, A. R.; AIKAWA, P.; CINTRA, D. E. spe. C. Obesity versus osteoarthritis: beyond the mechanical overload. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 12, n. 3, p. 374–379, 2014.

SONTAG, S. C. **Estudo clínico e radiográfico da luxação de patela e sua correlação com a velocidade de hemossedimentação em cães**, 2019. .

SOUZA, M. M. D. de et al. Afecções ortopédicas dos membros pélvicos em cães: estudo retrospectivo. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 852–857, 10 maio 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782011000500019&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000500019&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 25 jul. 2019.

SOUZA, M. M. D. et al. Luxação de patela em cães: Estudo retrospectivo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 2, p. 523–526, 2009.

STANNUS, O. et al. Circulating levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 18, n. 11, p. 1441–1447, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2010.08.016>>.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 1, p. 15–23, 2001. Disponível em: <<https://dm5migu4zj3pb.cloudfront.net/manuscripts/13000/13416/cache/13416.1-20150813180823-covered-253bed37ca4c1ab43d105aefdf7b5536.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, Ł. A.; SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, n. April 2014, 2014.

YAMAMOTO, K. et al. Morphological Studies on the Ageing and Osteoarthritis of the Articular Cartilage in C57 Black Mice. **Journal of Orthopaedic Surgery**, v. 13, n. 1, p. 8–18, 2016.

YUAN, G. H. et al. Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 3, p. 602–611, 2003.

## ANEXOS

ANEXO 1 – Manual de Instruções teste SEA133Ca *Cloud-Clone Corp.* ELISA para Fator de Necrose Tumoral alfa Canino



**SEA133Ca 96 Tests**  
**Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit**  
**For Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF $\alpha$ )**  
**Organism Species: Canis familiaris; Canine (Dog)**  
**Instruction manual**

FOR IN VITRO AND RESEARCH USE ONLY  
 NOT FOR USE IN CLINICAL DIAGNOSTIC PROCEDURES

11th Edition (Revised in July, 2013)

**[ INTENDED USE ]**

The kit is a sandwich enzyme immunoassay for in vitro quantitative measurement of TNF $\alpha$  in canine serum, plasma, tissue homogenates, cell lysates, cell culture supernates and other biological fluids.

**[ REAGENTS AND MATERIALS PROVIDED ]**

Reagents	Quantity	Reagents	Quantity
Pre-coated, ready to use 96-well strip plate	1	Plate sealer for 96 wells	4
Standard	2	Standard Diluent	1×20mL
Detection Reagent A	1×120 $\mu$ L	Assay Diluent A	1×12mL
Detection Reagent B	1×120 $\mu$ L	Assay Diluent B	1×12mL
TMB Substrate	1×9mL	Stop Solution	1×6mL
Wash Buffer (30 × concentrate)	1×20mL	Instruction manual	1

**[ MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED ]**

1. Microplate reader with 450  $\pm$  10nm filter.
2. Precision single or multi-channel pipettes and disposable tips.
3. Eppendorf Tubes for diluting samples.
4. Deionized or distilled water.
5. Absorbent paper for blotting the microtiter plate.
6. Container for Wash Solution

**[ STORAGE OF THE KITS ]**

1. **For unopened kit:** All the reagents should be kept according to the labels on vials. The **Standard, Detection Reagent A, Detection Reagent B** and the **96-well strip plate** should be stored at -20°C upon receipt while the others should be at 4 °C.
2. **For opened kit:** When the kit is opened, the remaining reagents still need to be stored according to the above storage condition. Besides, please return the unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal along entire edge of zip-seal.

**Note:**

It is highly recommended to use the remaining reagents within 1 month provided this is within the expiration date of the kit. For the expiration date of the kit, please refer to the label on the kit box. All components are stable until this expiration date.

## [ **SAMPLE COLLECTION AND STORAGE** ]

**Serum** - Use a serum separator tube and allow samples to clot for two hours at room temperature or overnight at 4°C before centrifugation for 20 minutes at approximately 1000×g. Assay freshly prepared serum immediately or store samples in aliquot at -20°C or -80°C for later use. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

**Plasma** - Collect plasma using EDTA or heparin as an anticoagulant. Centrifuge samples for 15 minutes at 1000×g at 2 - 8°C within 30 minutes of collection. Remove plasma and assay immediately or store samples in aliquot at -20°C or -80°C for later use. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

**Tissue homogenates** - The preparation of tissue homogenates will vary depending upon tissue type. For this assay, tissues were rinsed in ice-cold PBS(0.01mol/L,pH 7.0-7.2) to remove excess blood thoroughly and weighed before homogenization. Minced the tissues to small pieces and homogenized them in 5-10mL of PBS with a glass homogenizer on ice(Micro Tissue Grinders woks, too). The resulting suspension was sonicated with an ultrasonic cell disrupter or subjected to two freeze-thaw cycles to further break the cell membranes. After that, the homogenates were centrifugated for 5 minutes at 5000×g. Remove the supernate and assay immediately or aliquot and store at ≤-20°C.

**Cell Lysates** - Cells must be lysed before assaying according to the following directions.

1. Adherent cells should be detached with trypsin and then collected by centrifugation (suspension cells can be collected by centrifugation directly).
2. Wash cells three times in cold PBS.
3. Resuspend cells in PBS (1×) and the cells was subject to ultrasonication for 4 times (or Freeze cells at ≤ -20°C. Thaw cells with gentle mixing. Repeat the freeze/thaw cycle for 3 times.)
4. Centrifuge at 1500×g for 10 minutes at 2 - 8°C to remove cellular debris.

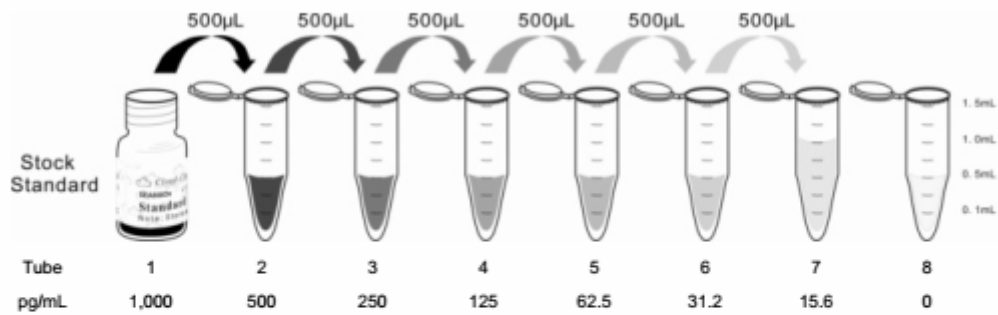
**Cell culture supernates and other biological fluids** - Centrifuge samples for 20 minutes at 1000×g. Remove particulates and assay immediately or store samples in aliquot at -20°C or -80°C for later use. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

### **Note:**

1. Samples to be used within 5 days may be stored at 4°C, otherwise samples must be stored at -20°C (≤1 month) or -80°C (≤2 months) to avoid loss of bioactivity and contamination.
2. Sample hemolysis will influence the result, so hemolytic specimen should not be detected.
3. When performing the assay, bring samples to room temperature.

## [ **REAGENT PREPARATION** ]

1. Bring all kit components and samples to room temperature (18-25°C) before use.
2. **Standard** - Reconstitute the **Standard** with 1.0mL of **Standard Diluent**, kept for 10 minutes at room temperature, shake gently(not to foam). The concentration of the standard in the stock solution is 1,000pg/mL. Please prepare 7 tubes containing 0.5mL Standard Diluent and produce a double dilution series according to the picture shown below. Mix each tube thoroughly before the next transfer. Set up 7 points of diluted standard such as 1,000pg/mL, 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62.5pg/mL, 31.2pg/mL, 15.6pg/mL, and the last EP tubes with **Standard Diluent** is the blank as 0pg/mL.



- Detection Reagent A and Detection Reagent B** - Briefly spin or centrifuge the stock Detection A and Detection B before use. Dilute to the working concentration with **Assay Diluent A** and **B**, respectively (1:100).
- Wash Solution** - Dilute 20mL of Wash Solution concentrate (30×) with 580mL of deionized or distilled water to prepare 600mL of Wash Solution (1×).
- TMB substrate** - Aspirate the needed dosage of the solution with sterilized tips and do not dump the residual solution into the vial again.

**Note:**

- Making serial dilution in the wells directly is not permitted.
- Prepare standard within 15 minutes before assay. Please do not dissolve the reagents at 37°C directly.
- Please carefully reconstitute Standards or working Detection Reagent A and B according to the instruction, and avoid foaming and mix gently until the crystals are completely dissolved. To minimize imprecision caused by pipetting, use small volumes and ensure that pipettors are calibrated. It is recommended to suck more than 10µL for once pipetting.
- The reconstituted Standards, Detection Reagent A and Detection Reagent B can be **used only once**.
- If crystals have formed in the Wash Solution concentrate (30×), warm to room temperature and mix gently until the crystals are completely dissolved.
- Contaminated water or container for reagent preparation will influence the detection result.

**[ SAMPLE PREPARATION ]**

- We are only responsible for the kit itself, but not for the samples consumed during the assay. The user should calculate the possible amount of the samples used in the whole test. Please reserve sufficient samples in advance.
- Please predict the concentration before assaying. If values for these are not within the range of the standard curve, users must determine the optimal sample dilutions for their particular experiments. Sample should be diluted by 0.01mol/L PBS(PH=7.0-7.2).
- If the samples are not indicated in the manual, a preliminary experiment to determine the validity of the kit is necessary.
- Tissue or cell extraction samples prepared by chemical lysis buffer may cause unexpected ELISA results due to the impacts from certain chemicals.

5. Due to the possibility of mismatching between antigen from other origin and antibody used in our kits (e.g., antibody targets conformational epitope rather than linear epitope), some native or recombinant proteins from other manufacturers may not be recognized by our products.
6. Influenced by the factors including cell viability, cell number or sampling time, samples from cell culture supernatant may not be detected by the kit.
7. Fresh samples without long time storage is recommended for the test. Otherwise, protein degradation and denaturalization may occur in those samples and finally lead to wrong results.

### **[ ASSAY PROCEDURE ]**

1. Determine wells for diluted standard, blank and sample. Prepare 7 wells for standard, 1 well for blank. Add 100 $\mu$ L each of dilutions of standard (read Reagent Preparation), blank and samples into the appropriate wells. Cover with the Plate sealer. Incubate for 2 hours at 37°C.
2. Remove the liquid of each well, don't wash.
3. Add 100 $\mu$ L of **Detection Reagent A** working solution to each well. Incubate for 1 hour at 37°C after covering it with the Plate sealer.
4. Aspirate the solution and wash with 350 $\mu$ L of 1 $\times$  Wash Solution to each well using a squirt bottle, multi-channel pipette, manifold dispenser or autowasher, and let it sit for 1-2 minutes. Remove the remaining liquid from all wells completely by snapping the plate onto absorbent paper. Totally wash 3 times. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against absorbent paper.
5. Add 100 $\mu$ L of **Detection Reagent B** working solution to each well. Incubate for 30 minutes at 37°C after covering it with the Plate sealer.
6. Repeat the aspiration/wash process for total 5 times as conducted in step 4.
7. Add 90 $\mu$ L of **Substrate Solution** to each well. Cover with a new Plate sealer. Incubate for 15 - 25 minutes at 37°C (Don't exceed 30 minutes). Protect from light. The liquid will turn blue by the addition of Substrate Solution.
8. Add 50 $\mu$ L of **Stop Solution** to each well. The liquid will turn yellow by the addition of Stop solution. Mix the liquid by tapping the side of the plate. If color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate and confirm there is no bubble on the surface of the liquid. Then, run the microplate reader and conduct measurement at 450nm immediately.

#### **Note:**

1. **Assay preparation:** Keep appropriate numbers of wells for each experiment and remove extra wells from microplate. Rest wells should be resealed and stored at -20°C.
2. **Samples or reagents addition:** Please use the freshly prepared Standard. Please carefully add samples to wells and mix gently to avoid foaming. Do not touch the well wall. For each step in the procedure, total dispensing time for addition of reagents or samples to the assay plate should not exceed 10 minutes. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step, without interruption. Duplication of all standards and specimens, although not required, is recommended. To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of standards, samples, and reagents. Also, use separated reservoirs for each reagent.

3. **Incubation:** To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary. Do not allow wells to sit uncovered for extended periods between incubation steps. Once reagents are added to the well strips, DO NOT let the strips DRY at any time during the assay. Incubation time and temperature must be controlled.
4. **Washing:** The wash procedure is critical. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Solution by aspirating or decanting and remove any drop of water and fingerprint on the bottom of the plate. Insufficient washing will result in poor precision and false elevated absorbance reading.
5. **Controlling of reaction time:** Observe the change of color after adding **TMB Substrate** (e.g. observation once every 10 minutes), if the color is too deep, add **Stop Solution** in advance to avoid excessively strong reaction which will result in inaccurate absorbance reading.
6. **TMB Substrate** is easily contaminated. Please protect it from light.
7. The environment humidity which is less than 60% might have some effects on the final performance, therefore, a humidifier is recommended to be used at that condition.

### **[ TEST PRINCIPLE ]**

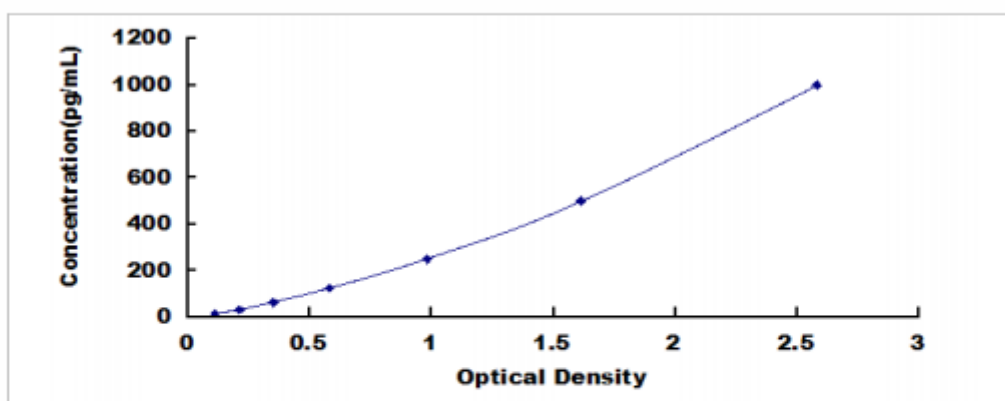
The microtiter plate provided in this kit has been pre-coated with an antibody specific to TNF $\alpha$ . Standards or samples are then added to the appropriate microtiter plate wells with a biotin-conjugated antibody specific to TNF $\alpha$ . Next, Avidin conjugated to Horseradish Peroxidase (HRP) is added to each microplate well and incubated. After TMB substrate solution is added, only those wells that contain TNF $\alpha$ , biotin-conjugated antibody and enzyme-conjugated Avidin will exhibit a change in color. The enzyme-substrate reaction is terminated by the addition of sulphuric acid solution and the color change is measured spectrophotometrically at a wavelength of 450nm  $\pm$  10nm. The concentration of TNF $\alpha$  in the samples is then determined by comparing the O.D. of the samples to the standard curve.

### **[ CALCULATION OF RESULTS ]**

Average the duplicate readings for each standard, control, and samples and subtract the average zero standard optical density. Construct a standard curve by plotting the mean O.D. and concentration for each standard and draw a best fit curve through the points on the graph or create a standard curve on log-log graph paper with TNF $\alpha$  concentration on the y-axis and absorbance on the x-axis. Using some plot software, for instance, curve expert 1.30, is also recommended. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

### **[ TYPICAL DATA ]**

In order to make the calculation easier, we plot the O.D. value of the standard (X-axis) against the known concentration of the standard (Y-axis), although concentration is the independent variable and O.D. value is the dependent variable. However, the O.D. values of the standard curve may vary according to the conditions of assay performance (e.g. operator, pipetting technique, washing technique or temperature effects), plotting log of the data to establish standard curve for each test is recommended. Typical standard curve below is provided for reference only.



Typical Standard Curve for TNFa, Canine ELISA.

### [ DETECTION RANGE ]

15.6-1,000pg/mL. The standard curve concentrations used for the ELISA's were 1,000pg/mL, 500pg/mL, 250pg/mL, 125pg/mL, 62.5pg/mL, 31.2pg/mL, 15.6pg/mL.

### [ SENSITIVITY ]

The minimum detectable dose of TNFa is typically less than 5.8pg/mL.

The sensitivity of this assay, or Lower Limit of Detection (LLD) was defined as the lowest protein concentration that could be differentiated from zero. It was determined by adding two standard deviations to the mean optical density value of twenty zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

### [ SPECIFICITY ]

This assay has high sensitivity and excellent specificity for detection of TNFa.

No significant cross-reactivity or interference between TNFa and analogues was observed.

#### **Note:**

Limited by current skills and knowledge, it is impossible for us to complete the cross- reactivity detection between TNFa and all the analogues, therefore, cross reaction may still exist.

### [ RECOVERY ]

Matrices listed below were spiked with certain level of recombinant TNFa and the recovery rates were calculated by comparing the measured value to the expected amount of TNFa in samples.

Matrix	Recovery range (%)	Average(%)
serum(n=5)	84-96	90
EDTA plasma(n=5)	80-94	87
heparin plasma(n=5)	82-98	92

### [ LINEARITY ]

The linearity of the kit was assayed by testing samples spiked with appropriate concentration of TNFa and their serial dilutions. The results were demonstrated by the percentage of calculated concentration to the expected.

Sample	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16
serum(n=5)	95-103%	88-96%	92-106%	84-98%
EDTA plasma(n=5)	84-98%	90-103%	87-96%	94-104%
heparin plasma(n=5)	92-107%	80-96%	85-98%	90-101%

### [ PRECISION ]

Intra-assay Precision (Precision within an assay): 3 samples with low, middle and high level TNFa were tested 20 times on one plate, respectively.

Inter-assay Precision (Precision between assays): 3 samples with low, middle and high level TNFa were tested on 3 different plates, 8 replicates in each plate.

CV(%) = SD/meanX100

Intra-Assay: CV<10%

Inter-Assay: CV<12%

### [ STABILITY ]

The stability of ELISA kit is determined by the loss rate of activity. The loss rate of this kit is less than 5% within the expiration date under appropriate storage condition.

To minimize extra influence on the performance, operation procedures and lab conditions, especially room temperature, air humidity, incubator temperature should be strictly controlled. It is also strongly suggested that the whole assay is performed by the same operator from the beginning to the end.

### [ ASSAY PROCEDURE SUMMARY ]

1. Prepare all reagents, samples and standards;
2. Add 100µL standard or sample to each well. Incubate 2 hours at 37°C;
3. Aspirate and add 100µL prepared Detection Reagent A. Incubate 1 hour at 37°C;
4. Aspirate and wash 3 times;
5. Add 100µL prepared Detection Reagent B. Incubate 30 minutes at 37°C;
6. Aspirate and wash 5 times;
7. Add 90µL Substrate Solution. Incubate 15-25 minutes at 37°C;
8. Add 50µL Stop Solution. Read at 450nm immediately.

### [ IMPORTANT NOTE ]

1. Limited by the current condition and scientific technology, we can't completely conduct the comprehensive identification and analysis on the raw material provided by suppliers. So there might be some qualitative and technical risks to use the kit.
2. The final experimental results will be closely related to validity of the products, operation skills of the end users and the experimental environments. Please make sure that sufficient samples are available.
3. Kits from different batches may be a little different in detection range, sensitivity and color developing time. Please perform the experiment exactly according to the instruction attached in kit while electronic ones from our website is only for information.
4. Do not mix or substitute reagents from one kit lot to another. Use only the reagents supplied by manufacturer.

5. Protect all reagents from strong light during storage and incubation. All the bottle caps of reagents should be covered tightly to prevent the evaporation and contamination of microorganism.
6. There may be some foggy substance in the wells when the plate is opened at the first time. It will not have any effect on the final assay results. Do not remove microtiter plate from the storage bag until needed.
7. Wrong operations during the reagents preparation and loading, as well as incorrect parameter setting for the plate reader may lead to incorrect results. A microplate plate reader with a bandwidth of 10nm or less and an optical density range of 0-3 O.D. or greater at  $450 \pm 10\text{nm}$  wavelength is acceptable for use in absorbance measurement. Please read the instruction carefully and adjust the instrument prior to the experiment.
8. Even the same operator might get different results in two separate experiments. In order to get better reproducible results, the operation of every step in the assay should be controlled. Furthermore, a preliminary experiment before assay for each batch is recommended.
9. Each kit has been strictly passed Q.C test. However, results from end users might be inconsistent with our in-house data due to some unexpected transportation conditions or different lab equipments. Intra-assay variance among kits from different batches might arise from above factors, too.
10. Kits from different manufacturers with the same item might produce different results, since we haven't compared our products with other manufacturers.
11. The instruction manual also suits for the kit of 48T, but all reagents of 48T kit are reduced by half.

### [ PRECAUTION ]

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

### [ TROUBLE SHOOTING ]

Problem	Possible Source	Correction Action
<b>Poor Standard Curve</b>	Improper standard curve preparation	Ensure accurate operation of the dilution
	Incomplete washing and aspiration	Adequate washing and adequate aspiration
	Inaccurate Pipetting	Check and Calibrate pipettes
<b>Poor Precision</b>	Incomplete washing of wells	Ensure sufficient washing
	Inadequate mixing and aspiration reagents	Adequate aspiration and mixing reagents
	Reused pipette tips, containers and sealers	Change and use new pipette tips, containers and sealers
	Inaccurate Pipetting	Check and Calibrate pipettes
<b>Low O.D Values</b>	Inadequate reagent volumes added to wells	Calibrate pipettes and Add adequate reagents
	Incorrect incubation times	Ensure sufficient incubation times
	Incorrect incubation temperature	Reagents balanced to room temperature
	Conjugate or substrate reagent failure	Mix conjugate & substrate, color should develop immediately
	No stop solution added	Follow the assay protocol in the kit manual
	Read beyond suggested reading time	Read within the time recommended in the manual
<b>Sample Values</b>	Improper Sample Storage	Store the sample properly and use the fresh sample
	Improper sample collection and preparation	Take proper sample collection and preparation method
	Low quantity of analyte in samples	Use new sample and repeat assay



## ANEXO 2 – Certificado de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá



Comissão de Ética no Uso de Animais  
da  
Universidade Estadual de Maringá

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo clínico de correlação entre análise de Fator de necrose Tumoral de líquido sinovial, imagem radiográfica e escore clínico de claudicação em cães com luxação de patela.", protocolada sob o CEUA nº 5177210820 (00 002784), sob a responsabilidade de **Juliano Bortolo de Conti** e equipe; **BRUNA LUIZA CARELLI TEIXEIRA ESTRALIOTO** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 08/10/2020.

We certify that the proposal "Clinical trial correlating Tumor Necrosis Factor in synovial fluid, radiographic image and lameness clinical score in dogs with patellar luxation.", utilizing 15 Dogs (males and females), protocol number CEUA 5177210820 (00 002784), under the responsibility of **Juliano Bortolo de Conti** and team; **BRUNA LUIZA CARELLI TEIXEIRA ESTRALIOTO** - 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 State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 10/08/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2020** a **01/2021** Área: **Dmv-Medicina Veterinária**

Origem: **Animais de Proprietários**

Espécie: **Cães** sexo: **Machos e Fêmeas** idade: **1 a 15 anos** N: **15**

Linhagem: **SRD** Peso: **2 a 25 kg**

Local do experimento: Centro Avançado de Atendimento Veterinário - CAAV - Cascavel

Maringá, 09 de outubro de 2020

Prof. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos  
Coordenadora da CEUA/UEM  
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dra. Erika Seki Kioshima Cótica  
Coordenadora Adjunta da CEUA/UEM  
Universidade Estadual de Maringá

# ESTUDO CLÍNICO DE CORRELAÇÃO ENTRE ANÁLISE DE FATOR NECROSE TUMORAL DE LÍQUIDO SINOVIAL, IMAGEM RADIOGRÁFICA E ESCORE CLÍNICO DE CLAUDICAÇÃO DE CÃES COM LUXAÇÃO DE PATELA

Bruna L. C. T. Estralioto<sup>1</sup>, Juliano B. De Conti<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Médica Veterinária, Mestranda Produção sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá – UEM *Campus* Umuarama – bruna.carelli@gmail.com

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Professor Doutor do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Maringá – UEM *Campus* Umuarama

## RESUMO

A luxação de patela é uma das causas mais comuns de claudicação em cães, e é uma das principais causas de doença degenerativa do joelho de cães. Pode ser uni ou bilateral, medial ou lateral, sendo esta última menos comum. A luxação patelar é graduada de acordo com a mobilidade da patela em relação ao sulco troclear e de acordo com as alterações ósseas e de tecidos moles presentes. A apresentação clínica é variável conforme o grau de alteração óssea e do temperamento do animal. Marcadores inflamatórios já são estudados há alguns anos nos casos de doenças inflamatórias crônicas. Neste estudo 10 cães (n=10) foram agrupados no grupo doente, sabidamente afetados por luxação patelar. Foram estudados com o objetivo de correlacionar o grau de luxação patelar (GL), grau de claudicação (GC), grau de osteoartrite (GOA) com marcadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), e seus resultados foram confrontados com os resultados de 5 cães sem alterações desta articulação, estes agrupados no grupo controle (GC). A correlação foi avaliada de acordo com o fator de correlação de Postos de *Spearman* ( $\sigma$ ). Como resultado, encontramos uma correlação positiva forte entre o grau de claudicação e o grau de osteoartrose ( $\sigma=0,8251$ ) e entre o grau de luxação e o grau de claudicação ( $\sigma=0,8172$ ), porém, não se encontrou correlação positiva importante quando correlacionados ao TNF $\alpha$  (GC  $\sigma=-0,0078$ , GL  $\sigma=-0,1354$ , GOA  $\sigma=-0,2971$ ). Sugerem-se mais estudos para a conclusão da correlação deste biomarcador sinovial para a luxação patelar em cães.

**Palavras-chave:** Cão, Citocinas, Inflamação, Osteoartrite.

# CLINICAL TRIAL CORRELATING TUMOR NECROSIS FACTOR IN SYNOVIAL FLUID, RADIOGRAPHIC IMAGE AND LAMENESS CLINICAL SCORE IN DOGS WITH PATELLAR LUXATION

## ABSTRACT

Patellar luxation is one of the most common cause of lameness in and knee degeneration in dogs. It can be unilateral or bilateral, medial or lateral, being this last one the most unusual. Patellar luxation is graduated by the patella's mobility in the trochlear groove and the bone and soft tissue alterations. Its clinical presentation depends on its anatomical abnormality score and the patients temper. Inflammatory markers have been studied through years for chronical inflammatory diseases. In this study 10 dogs (n=10) were grouped as diseased group (GD), wich were previewsly known as having patelar luxation. They were used to compare and correlate their clinical lameness score (GC), luxation score (GL), osteoarthritis score (GOA) and the concentration of an inflammatory markers such as  $\alpha$  tumoral necrosis factor (TNF $\alpha$ ), measured by ELISA, with the results obtained by the same evaluation of 5 non-affected dogs (n=5). This dogs were considered the control group (GC). The correlation was measured using the Spearman correlation coefficient ( $\sigma$ ). As results we obtained a strong positive correlation between the lameness score and the osteoarthritis score ( $\sigma=0,8251$ ) and also between the luxation score and lameness score ( $\sigma=0,8172$ ), although it was not found a positive strong correlation between the TNF $\alpha$  and the other (GC  $\sigma=-0,0078$ , GL  $\sigma=-0,1354$ , GOA  $\sigma=-0,2971$ ). It is suggested that more studies should be conducted for the elucidation of the TNF $\alpha$  role as a synovial biomarker for patellar luxation in dogs.

**Keywords:** Dog, Cytokines, Inflammation, Osteoarthritis.

## INTRODUÇÃO

A luxação patelar é uma das causas mais comuns de claudicação em cães, e pode acometer cães de raças grandes e pequenas, sendo uma das afecções mais comuns dos joelhos de cães (SOUZA et al., 2011; DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018). É uma doença típica de cães jovens, porém os sinais clínicos vão se tornando mais evidentes com o crescimento, e como consequência tem-se que a maioria dos casos é diagnosticada em jovens adultos, por volta dos três anos de idade (SOUZA et al., 2011; DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

A luxação patelar é normalmente uma desordem congênita/de desenvolvimento, porém, pode ser secundária a um acidente traumático que cause ruptura ou afrouxamento da cápsula e fásia articular, levando à instabilidade femoro-patelar (DAL-BÓ et al., 2010).

A claudicação pode ser intermitente ou contínua, e normalmente é de leve a moderada, com levantamento ocasional do membro. Outro achado comum durante a avaliação é uma extensão do membro pélvico caudalmente, na tentativa de reposicionar a patela no sulco quando luxada. O deslocamento lateral produz uma sintomatologia mais grave do que a medial (DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018).

A pesquisa radiográfica do joelho auxilia na confirmação da luxação e avaliação de alterações degenerativas presentes na articulação, sendo também necessária avaliação de todas as estruturas esqueléticas para determinação de anormalidades e osteoartrite (SOUZA et al., 2009; DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018; JIBRI et al., 2019). É considerada o padrão ouro para avaliar as lesões articulares, e no caso da osteoartrite, é muito eficiente ao demonstrar a diminuição do espaço articular, além da presença de osteófitos, característica da doença (ISHIJIMA et al., 2011; FINAN et al., 2013).

A cartilagem articular é formada pelos condrócitos e pelos seus produtos, chamados de matriz extracelular, sendo, portanto, os condrócitos as únicas estruturas celulares da cartilagem (YUAN et al., 2003). A matriz extracelular é composta primariamente de colágeno, proteoglicana e proteínas acessórias (YUAN et al., 2003). Muitos dos peptídeos antigênicos que são responsáveis pela indução da resposta imune, estão presentes nas articulações afetadas pela osteoartrite (YUAN et al., 2003).

Diversos estudos relacionam o aumento de citocinas como IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) em doenças como a osteoartrite de joelho e outras doenças musculares (ALFIERI et al., 2014). Imamura et al (2015), revelam que valores aumentados de citocinas próinflamatórias são relacionadas com o desenvolvimento e progressão da osteoartrite decorrentes da regulação positiva da expressão de genes de metaloproteinases, alterações do metabolismo de condrócitos e aumento da reabsorção óssea por ação osteoclástica.

O presente trabalho tem por objetivo confirmar a presença de inflamação articular nos casos de luxação patelar através da descoberta de um biomarcador efetivo e confiável, e fazer correlação com alterações clínicas, laboratoriais e radiográficas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para o experimento foram selecionados 15 cães provenientes do atendimento clínico de rotina de clínicas veterinárias da cidade de Cascavel - PR e Maceió - AL, sem distinção de

raça e sexo, com idade entre 2 a 11 anos, pesando de 2,0 a 32 kg. Foram, então, divididos em dois grupos experimentais, sendo que 10 animais do Grupo Doente (GD, n = 10) apresentavam sabidamente luxação patelar previamente diagnosticada através da avaliação clínica, feita pelo próprio examinador em outro momento, ou por outro médico veterinário. Os demais animais fizeram parte do Grupo Controle (GC, n = 5). Os pacientes do GC deveriam apresentar grau de claudicação zero de acordo escala na sequencia descrita.

Foram excluídos os pacientes que se enquadraram em qualquer uma das condições a seguir: 1. Fêmeas gestantes ou em estro; 2. Pacientes que estivessem utilizando medicação analgésica e/ou anti-inflamatória nos últimos 15 dias até o momento da coleta dos dados; 3. Pacientes que apresentassem outras alterações ortopédicas não relacionadas à luxação patelar; 4. Pacientes que apresentassem outra doença sistêmica inflamatória ou infecciosa.

Todos pacientes foram então submetidos à avaliação clínica da luxação patelar, pelo examinador, para graduação da luxação e grau de claudicação de acordo com Di Dona et al (2018) (Tabela 1) e de acordo com a escala de Pollmeier et al. (2009) (Tabela 2) respectivamente. Estes animais também tiveram seus joelhos avaliados em avaliação radiográfica conforme classificação de acordo com Black et al (2007) (Tabela 3). Para exame radiográfico os pacientes foram submetidos à neuroleptoanalgesia. Para tanto, foi utilizada acepromazina (0,05 mg/Kg), e metadona (0,2 mg/Kg), associados ao midazolam (0,3mg /Kg), todos por via intramuscular (IM). As radiografias foram realizadas em duas projeções (craniocaudal e médio-lateral) do membro afetado, com aparelho digital.

O líquido sinovial foi coletado com paciente sob neuroleptoanalgesia nas mesmas condições descritas para a realização do exame radiográfico. Foi realizada tricotomia da articulação afetada, com introdução da agulha (25 mm x 0,7 mm acoplada à seringa de 3 mL) entre a patela e a tuberosidade da tíbia, lateralmente ao ligamento patelar, sempre utilizando-se da técnica asséptica. O volume de líquido coletado variou de 0,2 a 0,3 mL, de acordo com o tamanho do animal. O material foi então armazenado em tubos tipo eppendorf de pressão de 1,5mL, identificado na tampa, e alocado em botijão de nitrogênio líquido a temperaturas menores a -80 °C até envio para laboratório para análise do TNF $\alpha$  canino.

**Tabela 1** Classificação clínica dos graus de luxação de patela

<b>Grau 1</b>	Patela pode ser luxada manualmente, mas retorna à posição normal quando solta.
<b>Grau 2</b>	Patela luxa com flexão do joelho ou por manipulação manual e mantém-se luxada até a extensão do joelho ou quando recolocada manualmente.
<b>Grau 3</b>	Patela se mantém luxada continuamente e pode ser manualmente recolocada, mas irá luxar novamente espontaneamente quando a pressão manual é removida.
<b>Grau 4</b>	Patela fica luxada continuamente e não pode ser manualmente reposicionada.

(DI DONA; DELLA VALLE; FATONE, 2018)

**Tabela 2** Classificação da Claudicação de cães com osteoartrite, adaptado de Pollmeier et al (2006).

<b>Grau 0</b>	Sem claudicação
<b>Grau 1</b>	Pequena claudicação (anormalidade de marcha ocasional)

---

**Grau 2** Claudicação moderada (anormalidade de marcha evidente e/ou não apoio do membro ocasional)

**Grau 3** Claudicação severa (continuamente não apoia o membro)

---

(POLLMEIER et al., 2006)

**Tabela 3** Classificação radiográfica da osteoartrite

---

**Grau 0** Articulação normal

**Grau 1** Evidência radiográfica de instabilidade; sem alterações degenerativas

**Grau 2** Pequenas alterações degenerativas (osteófitos ocasionais)

**Grau 3** Alterações degenerativas moderadas (osteófitos, esclerose subcondral)

**Grau 4** Severa alteração degenerativa (osteófitos, esclerose subcondral, remodelamento ósseo)

---

(BLACK et al., 2007)

**Tabela 4** Interpretação dos resultados no teste de Correlação de Postos de Spearman segundo Mukaka (2012).

VALORES DO COEFICIENTE ( $\rho$ )	CORRELAÇÃO	FORÇA DA CORRELAÇÃO
0,9 a 1	Positiva ou Negativa	Muito Forte
0,7 a 0,9	Positiva ou Negativa	Forte
0,5 a 0,7	Positiva ou Negativa	Moderada
0,3 a 0,5	Positiva ou Negativa	Fraca
0 a 0,3	Positiva ou Negativa	Desprezível

(MUKAKA, 2012)

## RESULTADOS

Foram analisados inicialmente 32 animais (n=2) com o intuito de utilizá-los para o estudo. Destes, 17 foram excluídos por enquadrarem-se dentro do critério de exclusão. Dentre os animais aptos para o estudo, analisou-se no grupo doente (n=10) que 60% (6) eram fêmeas, e 40% (4) eram machos, com idade média de 5,3 anos, e peso médio de 7,1kg. A raça mais acometida pela patologia neste estudo foram Yorkshire e SRD, que representaram cada um, 20% (2) dos animais do grupo. As demais raças estão descritas conforme Tabela 5, e representaram cada uma 10% (1) do grupo amostral.

A maior parte dos animais foram diagnosticados com grau 2 e 3 de luxação patelar, conforme classificação de Di Dona et al (2018), representando 80% (8) dos animais estudados (Tabela 6). O grau de claudicação acompanhou positivamente o grau de luxação patelar, uma vez que os animais com maior grau de luxação patelar apresentaram maior frequência de claudicação.

**Tabela 5.** Dados gerais dos pacientes do grupo controle do estudo clínico de avaliação da osteoartrite na luxação patelar canina e sua relação com a quantificação de TNF $\alpha$  canino no líquido sinovial do joelho doente.

ANIMAIS	GRAU LUX. <sup>1</sup>	GRAU CLAUD. <sup>2</sup>	GRAU OA. <sup>3</sup>	SEXO <sup>4</sup>	PESO (Kg)	IDADE (anos)	RAÇA
1	2	0	1	F	2,6	3	Yorkshire
2	1	0	0	M	2	3	Spitz
3	3	2	2	M	6,9	5	SRD
4	2	1	1	M	4	4	Bulldog Francês
5	3	2	1	F	8	5	Pug
6	2	3	2	F	9,2	9	Poodle
7	3	3	2	M	13	11	SRD
8	4	3	1	F	19	2	Huskye
9	2	0	0	F	2	2	Yorkshire
10	3	1	0	F	4	9	Pinscher

<sup>1</sup>GRAU LUX.: Grau da luxação patelar evidenciada clinicamente, de acordo com Di Dona et al (2018); <sup>2</sup>GRAU CLAUD.: Grau de claudicação do membro afetado, adaptado de Pollmeier et al (2006); <sup>3</sup>GRAU AO: Grau de osteoartrite evidenciada pela radiografia, de acordo com Black et al (2007); <sup>4</sup>F: fêmeas/ M: machos. Fonte: acervo pessoal.

Por outro lado, a 30% (3) dos pacientes doentes, sequer apresentaram algum sinal de claudicação, ou quando apresentavam o faziam em grau mais elevado (grau 3) (Tabela 7).

Com relação a evidencia radiográfica de osteoartrite, a maior parte dos animais (40% - 4) apresentaram grau de osteoartrite 2 (Tabela 8).

Analisou-se então, conforme descrito anteriormente através do exame de ELISA a concentração média de TNF $\alpha$ , que foi aferida nos joelhos dos animais doentes e do grupo controle (Tabela 9). A média do valor de TNF $\alpha$  para o grupo doente foi de 37,02pg/mL (n=10). Com o tratamento dos dados para retirada de outliers temos uma média de 23,11pg/mL (n=8) para o grupo doente. Por fim para o grupo controle (n=5) a concentração de TNF $\alpha$  do líquido sinovial foi de 35,93pg/mL.

Os dados das Tabelas 6, 7, 8 e 9 foram então submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk* ( $p>0,9$ ) para classificação dos dados e seleção do teste de correlação (Tabela 11). Na sequência foi o teste de correlação de Postos de *Spearman*. Foram executadas as correlações entre todas as variáveis estudadas utilizando uma análise de combinações, e os resultados podem ser vistos na Tabela 12. A interpretação dos resultados foi feita de acordo com Mukaka (2012) (Tabela 4).

**Tabela 6** Frequência de distribuição dos graus de luxação patelar nos animais do Grupo Doente (n=10) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação patelar, imagem radiológica e TNF $\alpha$  sinovial.

GRAU LUX. DE PATELA <sup>1</sup>	No DE ANIMAIS <sup>2</sup>	PERCENTUAL (%)
1	1	10,0
2	4	40,0
3	4	40,0
4	1	10,0
TOTAL	10	100,0

<sup>1</sup>GRAU LUX. DE PATELA: Grau da luxação patelar evidenciada clinicamente, de acordo com Di Dona et al (2018); <sup>2</sup> Número de animais. Fonte: acervo pessoal.

**Tabela 7** Frequência de distribuição dos graus de claudicação nos animais do Grupo Doente (n=10) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação patelar, imagem radiológica e TNF $\alpha$  sinovial.

<b>GRAU DE CLAUDICAÇÃO<sup>1</sup></b>	<b>No DE ANIMAIS<sup>2</sup></b>	<b>PERCENTUAL (%)</b>
<b>0</b>	3	30,0
<b>1</b>	2	20,0
<b>2</b>	2	20,0
<b>3</b>	3	30,0
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>

<sup>1</sup>GRAU DE CLAUDICAÇÃO: Grau da claudicação evidenciada clinicamente, de acordo com Pollmeier et al (2006);

<sup>2</sup>Número de animais. Fonte: acervo pessoal.

**Tabela 8** Frequência de distribuição dos graus de osteoartrite nos animais do Grupo Doente (n=10) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação, patelar imagem radiológica e TNF $\alpha$  sinovial.

<b>GRAU OSTEOARTRITE1</b>	<b>No DE ANIMAIS2</b>	<b>PERCENTUAL (%)</b>
<b>0</b>	3	30,0
<b>1</b>	4	40,0
<b>2</b>	3	30,0
<b>3</b>	0	00,0
<b>4</b>	0	00,0
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>100,0</b>

<sup>1</sup>GRAU DE OSTEOARTRITE: Grau de evidenciada radiográfica de osteoartrite, classificada de acordo com Black et al (2007)

<sup>2</sup>Número de animais. Fonte: acervo pessoal.

**Tabela 9** Resultados das concentrações de TNF $\alpha$  (pg/mL) no Grupo Doente (1 a 10, n=10) e no Grupo Controle (11 a 15, n=5) avaliados no estudo de relação com o grau de luxação patelar, imagem radiológica e TNF $\alpha$  sinovial.

<b>ANIMAIS</b>	<b>CONCENTRAÇÃO TNF<math>\alpha</math> LS (pg/mL)<sup>1</sup></b>
1	10,65
2	25,82
3	33,63
4	10,92
5	25,52
6	26,61
7	22,33
8	29,39
9	9,37
10	175,93
11	27,79
12	28,03
13	42,21



14	53,60
15	28,03

<sup>1</sup>CONCENTRAÇÃO TNF $\alpha$  LS: Concentração de TNF $\alpha$  encontrada no líquido sinovial dos cães do estudo, em picogramas por mililitros, utilizando método ELISA. Para os animais em que foi possível realizar e replicação da amostra, utilizou-se o valor da média de ambos resultados como resultado final que é o presente na tabela. Fonte: acervo pessoal.

**Tabela 10.** Resultados da Correlação de Postos de *Spearman* entre os Graus de Luxação de Patela, Graus de Claudicação, Graus de Osteoartrose (OA) e Valores de TNF $\alpha$  canino em líquido sinovial de cães com luxação de patela.

VARIÁVEIS <sup>1</sup>	VALORES DO COEFICIENTE ( $\rho$ )	VALOR DE p
Grau Lux x Grau Claud	0,8172	0,0002
Grau Lux x Grau OA	0,6743	0,0058
Grau Lux x Valor TNF	-0,1354	0,6304
Grau Claud x Grau OA	0,8251	0,0001
Grau Claud x Valor TNF	-0,0078	0,9780
Grau AO x Valor TNF	-0,2971	0,2822

<sup>1</sup>Grau Lux: Grau de luxação patelar; Grau Claud: Grau de claudicação; Grau OA: Grau de osteoartrose; Valor TNF: Valor do Fator de Necrose Tumoral alfa. FONTE: Acervo pessoal.

**Tabela 11.** Teste de normalidade dos resíduos (p) de para Graus de Luxação de Patela, Graus de Claudicação, Graus de Osteoartrose (OA) e Valores de TNF $\alpha$  canino em líquido sinovial de cães com luxação de patela. Valores de p>0.05 são considerados normais.

VARIÁVEL <sup>1</sup>	TESTE DE NORMALIDADE (p) <sup>2</sup>
GL	0,845
GC	0,750
GOA	0,749
TNF	0,541

<sup>1</sup>GL: Grau de luxação patelar; GC: Grau de claudicação; GOA: Grau de osteoartrose; TNF: Valor do Fator de Necrose Tumoral alfa. FONTE: Acervo pessoal. <sup>2</sup> de acordo com Lucambio (2008) p>0.9 são considerados normais.

**Tabela 12** Resultados da Correlação de Postos de *Spearman* entre os Graus de Luxação de Patela, Graus de Claudicação, Graus de Osteoartrite (OA) e Valores de TNF $\alpha$  canino em líquido sinovial de cães com luxação de patela.

VARIÁVEIS <sup>1</sup>	VALORES DO COEF. ( $\rho$ )	VALOR DE p	CORRELAÇÃO	FORÇA DA CORRELAÇÃO
Grau Lux x Grau Claud	0,8172	0,0002	Positiva	Forte
Grau Lux x Grau OA	0,6743	0,0058	Positiva	Moderada
Grau Lux x Valor TNF	-0,1354	0,6304	Negativa	Desprezível
Grau Claud x Grau OA	0,8251	0,0001	Positiva	Forte
Grau Claud x Valor	-0,0078	0,9780	Negativa	Desprezível

TNF				
Grau AO x Valor TNF	-0,2971	0,2822	Negativa	Desprezível

<sup>1</sup>Grau Lux: Grau de luxação patelar; Grau Claud: Grau de claudicação; Grau OA: Grau de osteoartrite; Valor TNF: Valor do Fator de Necrose Tumoral alfa. FONTE: Acervo pessoal.

## DISCUSSÃO

A média de animais diagnosticados com luxação patelar neste estudo foi de 5,3 anos, sendo mais alta do que a encontrada em outros estudos (LARA et al., 2013; DI DONA, F.; DELLA VALLE, G.; FATONE, G., 2018; SONTAG, 2019), percebendo-se o mesmo quando avaliamos o peso médio dos animais doentes, que nesse estudo foi de 7,1kg, também maior do que o de as encontradas por Sontag (2019), Di dona et al (2016), porém condizendo com Arthurs & Langley-Hobbs (2006) e Lara et al (2013).

Ao avaliarmos os cães que apresentam luxação patelar, percebemos que o diagnóstico acontece quando já se consideram graus 2 e 3 (ARTHURS; LANGLEY-HOBBS, 2006; MAEDA et al., 2019), uma vez que nesse estágio os animais já começam a apresentar alterações de marcha. Animais de pequeno porte, principalmente de raças Toy apresentam-se acometidos em maior frequência (DI DONA, F.; DELLA VALLE, G.; FATONE, G., 2018; MAEDA et al., 2019; SONTAG, 2019). Alguns estudos corroboram com este quando demonstram que a prevalência do aparecimento da afecção em fêmeas é maior do que em machos (SOUZA et al., 2009; DI DONA et al., 2016; MAEDA et al., 2019).

Percebe-se que alguns animais, podem nem mesmo apresentar clinicamente a doença, uma vez que 30% (3) dos animais sequer apresentam claudicação, mesmo apresentando graus de luxação variando entre 1 e 2. Hamilton et al (2020) sugere que 50% dos animais que apresentam o que ele chama de luxação patelar medial grau 2 oculta, apresentam algum tipo de desordem articular ipsilateral à lesão oculta ou contralateral com o passar do tempo, tornando-se candidatos à cirurgia corretiva (HAMILTON et al., 2020).

Sontag (2019) realiza um estudo semelhante de correlação entre os graus de luxação patelar, claudicação e de osteoartrose. Seus resultados são bastante semelhantes ao avaliarmos o tipo de correlação entre eles. Percebemos que encontra também correlação positiva entre o Grau de luxação X Grau de claudicação, Grau de luxação X Grau de osteoartrite e Grau de claudicação e Grau de osteoartrite (SONTAG, 2019). Porém este estudo evidencia de forma mais significativa a correlação entre o grau de claudicação e as evidências radiográficas de osteoartrite, que neste estudo foi forte.

Com relação à avaliação do Fator de Necrose Tumoral alfa, percebe-se que há apenas correlação negativa, indicando que esta citocina tende a diminuir conforme o agravamento dos casos de luxação patelar. Além disso, percebe-se que, uma vez retirados os pacientes outliers a média da concentração do mesmo no grupo doente (23,11pg/mL) é menor quando comparada com a do grupo controle (35,93pg/mL). Quando correlacionada com os demais parâmetros examinados, percebe-se que sua correlação é desprezível (GL x TNF $\alpha$  –  $\sigma$ =-0,1354; GC x TNF $\alpha$  –  $\sigma$ =-0,0078), apresentando apenas uma correlação fraca com o grau de luxação clínico ( $\sigma$  = -0,297), de acordo com Mukaka (2012). Vale salientar que os resultados não são, portanto, condizentes com o que nos trazem Rezende, Campos e Pailo (2013), uma vez que sabemos que os condrócitos e as células sinoviais são responsáveis pela produção de citocinas

inflamatórias, entre elas o TNF $\alpha$  (REZENDE; CAMPOS; PAILO, 2013; SARTORI-CINTRA; AIKAWA; CINTRA, 2014).

Poucos são os estudos que relacionam biomarcadores pró-inflamatórios presentes no líquido sinovial, especialmente em cães, com o aumento do escore de avaliação clínica de luxação patelar. A sugestão que este trabalho apresenta é a de que as citocinas inflamatórias, ou pelo menos algumas, podem se comportar de forma diferente no meio extra articular quando no meio intra articular.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que houve uma forte correlação positiva entre o Grau de Luxação patelar e o Grau de claudicação e o Grau de claudicação e o grau de osteoartrite dos animais doentes. A correlação entre o Grau de Luxação e o Grau de Osteoartrose foi moderada. Com relação à concentração de TNF $\alpha$  no líquido sinovial, percebe-se que a correlação entre o mesmo e os demais critérios avaliados é negativa, porém desprezível. Não foi possível, porém, observar correlação relevante entre qualquer um dos fatores acima descritos quando relacionados à quantificação do TNF $\alpha$ , sugerindo que não há ligação, ou que mais estudos precisam ser realizados, preconizando um número amostral maior.

## REFERENCIAS

AKTAS, E.; SENER, E.; GOCUN, P. U. Mechanically induced experimental knee osteoarthritis benefits from anti-inflammatory and immunomodulatory properties of simvastatin via inhibition of matrix metalloproteinase-3. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, v. 12, n. 3, p. 145–151, 2011.

ALFIERI, F. M. et al. Concentration of cytokines in patients with osteoarthritis of the knee and fibromyalgia. *Clinical Interventions in Aging*, n. June, p. 939, 2014.

ARTHURS, G. I.; LANGLEY-HOBBS, S. J. Complications associated with corrective surgery for patellar luxation in 109 dogs. *Veterinary Surgery*, v. 35, n. 6, p. 559–566, 2006.

BAYYURT, S. et al. The chondroprotective effects of intraarticular application of statin in osteoarthritis: An experimental study. *Indian Journal of Orthopaedics*, v. 49, n. 6, p. 665, 2016.

BLACK, L. L. et al. Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints: A Randomized, Double-Blinded, Multicenter, Controlled Trial\**Veterinary Therapeutics* •. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.VeterinaryTherapeutics.com](http://www.VeterinaryTherapeutics.com)>. Acesso em: 14 ago. 2019.

BORGES, A. P. B. et al. Composição do líquido sinovial de cães com ruptura do ligamento cruzado cranial. *Ciência Rural*, v. 29, n. 2, p. 285–289, jun. 1999. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84781999000200016&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781999000200016&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 16 ago. 2019.

BRAGA, D. K. et al. Modulação da inflamação por Ômega-3 / 6. *Salusvita*, v. 27, n. 3, p. 275–282, 2007.

BRENNER, S. S. et al. Osteoarthritis of the knee - Clinical assessments and inflammatory markers. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 12, n. 6, p. 469–475, 2004.

DAL-BÓ, Í. dos S. et al. Lateral patellar luxation in Poodle toy. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, n. 2, p. 217–220, 2010.

DE BIASI, F. et al. Alterações no líquido sinovial do joelho de cães com osteoartrite induzida pelo modelo Pond e Nuki. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 5, p. 563–567, out. 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352001000500009&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000500009&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 16 ago. 2019.

DI DONA, F.; DELLA VALLE, G.; FATONE, G. Patellar luxation in dogs. *Veterinary medicine: Research and Reports*, v. 9, p. 23–32, 2018.

DI DONA, F. et al. Lateral patellar luxation in nine small breed dogs. *Open Veterinary Journal*, v. 6, n. 3, p. 255–258, 2016.

FILHO, P. et al. Tratamento da luxação lateral da patela em poodles toy. *Ciencia Rural*, v. 35, n. 4, p. 843–847, 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33115800015>>.

FINAN, P. H. et al. Discordance between pain and radiographic severity in knee osteoarthritis: Findings from quantitative sensory testing of central sensitization. *Arthritis and Rheumatism*, v. 65, n. 2, p. 363–372, 2013.

GONÇALVES, G. et al. Effects of chondroitin sulfate and sodium hyaluronate on chondrocytes and extracellular matrix of articular cartilage in dogs with degenerative joint disease. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 60, n. 1, p. 93–102, 2008.

GUIMARÃES, A. D. O. et al. Proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação na avaliação laboratorial de processos inflamatórios. *Scire Salutis*, v. 4, n. 1, p. 6–16, 2 set. 2015. Disponível em: <<http://www.sustenere.co/index.php/sciresalutis/article/view/SPC2236-9600.2014.001.0001>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

HAMILTON, L. et al. The natural history of canine occult Grade II medial patellar luxation: an observational study. *Journal of Small Animal Practice*, v. 61, n. 4, p. 241–246, 2020.

IMAMURA, M. et al. Serum levels of proinflammatory cytokines in painful knee osteoarthritis and sensitization. *International Journal of Inflammation*, v. 2015, n. March, 2015.

ISHIJIMA, M. et al. Relationships between biomarkers of cartilage, bone, synovial metabolism and knee pain provide insights into the origins of pain in early knee osteoarthritis.

Arthritis Research and Therapy, v. 13, n. 1, p. R22, 2011. Disponível em: <<http://arthritis-research.com/content/13/1/R22>>.

JAYASURIYA, C. T.; CHEN, Q. Role of Inflammation in osteoarthritis. *Rheumatol Curr Res*, v. 3, n. 2, p. 1–2, 2013. Disponível em: <<https://www.longdom.org/open-access/role-of-inflammation-in-osteoarthritis-2161-1149.1000121.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

JIBRI, Z. et al. Patellar maltracking: an update on the diagnosis and treatment strategies. *Insights into imaging*, v. 10, n. 65, p. 1–11, 14 jun. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31201575>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

LARA, J. S. et al. Aspectos clínicos, cirúrgicos e epidemiológicos da luxação de patela em cães atendidos no hospital veterinário, no período de janeiro de 2000 a julho de 2010: Estudo retrospectivo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 5, p. 1274–1280, 2013.

LAVRIJSEN, I. C. M. et al. Genome-wide survey indicates involvement of loci on canine chromosomes 7 and 31 in patellar luxation in flat-coated retrievers. *BMC Genetics*, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2014.

MAEDA, K. et al. Evidence of genetic contribution to patellar luxation in toy poodle puppies. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 81, n. 4, p. 532–537, 2019.

MALCANGIO, M.; CLARK, A. K.; OLD, E. A. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *Journal of Pain Research*, n. November, p. 803, 2013.

MEL, E. G. et al. Sulfato de condroitina e hialuronato de sódio no tratamento da doença articular degenerativa experimental em cães. Aspectos clínicos e radiológicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 1, p. 35–43, 2003.

MIOT, H. A. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais Assessing normality of data in clinical and experimental trials. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 16, n. 2, p. 88–91, 2017.

MOBASHERI, A.; HENROTIN, Y. Biomarkers of Osteoarthritis: A Review of Recent Research Progress on Soluble Biochemical Markers, Published Patents and Areas for Future Development. *Recent Patents on Biomarkers*, v. 1, n. 1, p. 25–43, 2011.

MORTARI, A. C. et al. Use of radiographic measurements in the evaluation of dogs with medial patellar luxation. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, v. 50, n. 10, p. 1064–1068, 2009.

MUKAKA, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, v. 24, n. 3, p. 69–71, 2012.

POLLMEIER, M. et al. Clinical evaluation of firocoxib and carprofen for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Veterinary Record*, v. 159, n. 17, p. 547–551, 21 out. 2006. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.159.17.547>>. Acesso em: 14 ago. 2019.

REZENDE, M. U. de; CAMPOS, G. C. de; PAILO, A. F. Conceitos atuais em osteoartrite. *Acta Ortopédica Brasileira*, v. 21, n. 2, p. 120–122, 2013.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. ATVB in Focus Inflammation Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 31, p. 986–1000, 2011. Disponível em: <<http://ahajournals.org>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

SAETAN, N. et al. Association of plasma and synovial fluid interferon- $\gamma$  inducible protein-10 with radiographic severity in knee osteoarthritis. *Clinical Biochemistry*, v. 44, p. 1218–1222, out. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000991201101424X>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

SARTORI-CINTRA, A. R.; AIKAWA, P.; CINTRA, D. E. spe. C. Obesity versus osteoarthritis: beyond the mechanical overload. *Einstein (São Paulo, Brazil)*, v. 12, n. 3, p. 374–379, 2014.

SONTAG, S. C. Estudo clínico e radiográfico da luxação de patela e sua correlação com a velocidade de hemossedimentação em cães, 2019. .

SOUZA, M. M. D. de et al. Afecções ortopédicas dos membros pélvicos em cães: estudo retrospectivo. *Ciência Rural*, v. 41, n. 5, p. 852–857, 10 maio 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782011000500019&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000500019&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 25 jul. 2019.

SOUZA, M. M. D. et al. Luxação de patela em cães: Estudo retrospectivo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 2, p. 523–526, 2009.

STANNUS, O. et al. Circulating levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  are associated with knee radiographic osteoarthritis and knee cartilage loss in older adults. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 18, n. 11, p. 1441–1447, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2010.08.016>>.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 108, n. 1, p. 15–23, 2001. Disponível em: <<https://dm5migu4zj3pb.cloudfront.net/manuscripts/13000/13416/cache/13416.1-20150813180823-covered-253bed37ca4c1ab43d105aefdf7b5536.pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2019.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, Ł. A.; SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, n. April 2014, 2014.

YAMAMOTO, K. et al. Morphological Studies on the Ageing and Osteoarthritis of the Articular Cartilage in C57 Black Mice. *Journal of Orthopaedic Surgery*, v. 13, n. 1, p. 8–18, 2016.

YUAN, G. H. et al. Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 48, n. 3, p. 602–611, 2003.