



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

EDSON HIDENORI MIASHIRO

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO ANIMAL COM CUSTO
REDUZIDO PARA O ESTUDO DA NECROSE ISQUÊMICA
DA CABEÇA FEMORAL:
ANÁLISE POR RADIOGRAFIA DIGITAL, TOMOGRAFIA
COMPUTADORIZADA, MICROSCOPIA DE LUZ,
IMUNOHISTOQUÍMICA E ESTUDO DA MARCHA**

EDSON HIDENORI MIASHIRO

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO ANIMAL COM CUSTO
REDUZIDO PARA O ESTUDO DA NECROSE ISQUÊMICA
DA CABEÇA FEMORAL:
ANÁLISE POR RADIOGRAFIA DIGITAL, TOMOGRAFIA
COMPUTADORIZADA, MICROSCOPIA DE LUZ,
IMUNOHISTOQUÍMICA E ESTUDO DA MARCHA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M618 Miashiro, Edson Hidenori.
Padronização de modelo animal com custo reduzido para o estudo da necrose isquêmica da cabeça femoral : análise por radiografia digital, tomografia computadorizada, microscopia de luz, imunohistoquímica e estudo da marcha / Edson Hidenori Miashiro. - Londrina, 2020.
99 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Henrique Maia de Almeida.
Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Necrose da cabeça do fêmur - Tese. 2. Isquemia - Tese. 3. Modelos animais - Tese. 4. Doença de Legg-Calvé-Perthes - Tese. I. Maia de Almeida, Prof. Dr. Sílvio Henrique. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

EDSON HIDENORI MIASHIRO

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO ANIMAL COM CUSTO REDUZIDO
PARA O ESTUDO DA NECROSE ISQUÊMICA DA CABEÇA**

FEMORAL:

ANÁLISE POR RADIOGRAFIA DIGITAL, TOMOGRAFIA
COMPUTADORIZADA, MICROSCOPIA DE LUZ,
IMUNOHISTOQUÍMICA E ESTUDO DA MARCHA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Takeshi Chikude
Faculdade de Medicina do ABC – FMABC

Profa. Dra. Cintia Magalhães Carvalho Grion
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Joel Murachovsky
Faculdade de Medicina do ABC – FMABC

Prof. Carlos Eduardo Sanches Vaz
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 04 de junho de 2020

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Sílvio Henrique Maia de Almeida**, pela sua dedicação na elaboração deste trabalho e por suas preciosas orientações. Por sua compreensão em situações difíceis e pelo grande ser humano que é.

Ao **Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa**, pelo apoio e palavras de incentivo.

Ao **Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior**, por seus conselhos, orientações e ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Fornazieri**, por suas sugestões e orientações.

À **Profa. Dra. Cíntia Magalhães Carvalho Grion**, pelas suas críticas e sugestões.

Ao **Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho**, pela sua atenção.

Ao **Prof. Dr. Luiz Francisco Zanella**, sem o qual seria impossível desenvolver este trabalho. Pela sua amizade. Pelo seu respeito. Pela sua ética com seus pacientes, alunos e colegas.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Schiess Cardoso**, pela inestimável ajuda na realização dos procedimentos cirúrgicos.

À **Universidade Estadual de Londrina** e ao **Hospital Veterinário** por todo apoio para a realização deste trabalho.

Às **Senhoras Sandra Regina Moitinho Lage** e **Emanuella Silveira de Oliveira**, da Secretaria de Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina por sua atenção e auxílio.

Às médicas veterinárias **Stefany Lia Oliveira Camilo**, **Lais Muniz Arruda Pereira** e **Ana Paula Abreu Mendonça** do Hospital Veterinário da UEL, pelos cuidados com os animais utilizados neste experimento, pela competência e amizade.

Ao **Laboratório de Histologia da Universidade de São Paulo** pela realização dos exames de microscopia de luz.

Ao **Prof. Dr. Roberto Guarniero**, pela sua contribuição científica imprescindível.

Ao **Dr. Gustavo Bispo dos Santos**, médico veterinário pelo auxílio na realização e interpretação dos exames de microscopia de luz

Ao **Prof. Dr. Joel Murachovsky**, pelas suas valorosas opiniões e críticas.

Ao **Prof. Dr. Takeshi Chikude**, pelos profícuos anos que trabalhamos juntos na Faculdade de Medicina do ABC, pela ajuda na elaboração deste trabalho e, acima de tudo, pela nossa grande amizade.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches Vaz**, pelas sugestões e auxílio na elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos **Dr. Paulo Morandini** e **Dr. Fernando Yabushita**, pela amizade, convivência e pelo trabalho que desenvolvemos juntos.

À **Prof. Dra. Susana Lilian Wiechmann**, pelo apoio, competência e solidariedade.

À bibliotecária **Sheila Ribeiro de Campos Solla**, pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Jefferson Crespígio**, médico patologista pelo seu auxílio na elaboração deste trabalho.

À **Profa Dra. Carolina Panis**, do Laboratório de Biologia de Tumores da Unioeste, pela doação e realização dos exames de imunohistoquímica.

Ao **Instituto Manoel de Abreu de Apucarana** pela doação e realização dos exames de imagem.

Ao **Dr. Mário Elias** e à **Dra. Lara Nable Elias**, médicos radiologistas do Instituto Manoel de Abreu de Apucarana pela atenção e carinho. Pela realização dos exames de imagem e pela excelente qualidade dos mesmos.

À enfermeira **Débora Pijus da Silva**, pelas suas orientações e opiniões sobre o uso do material cirúrgico.

Às acadêmicas de medicina **Gislene dos Santos Silva** e **Kauana de Angelis**, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Jairo César dos Reis**, diretor da Faculdade de Medicina da FEMA, por confiar em meu trabalho, pelo apoio e amizade.

Aos Professores Doutores da Faculdade de Medicina da FEMA, **Ednir de Oliveira Vizioli, Ricardo Estefani, Jordana Rabelo Bergonso, Ana Cláudia Correia de Almeida** e **Renata Aparecida de Camargo Bittencourt**, pelo apoio, amizade e orientações.

À **Sra Angela Aparecida de Andrade**, por todo carinho e inesgotável apoio nos momentos difíceis.

Ao **Dr. Paulo Ernani Greco de Lemos**, pelo apoio e amizade.

Ao **Dr. Marcelo Roseira Ferro**, pela nossa amizade, pelo auxílio em momentos difíceis e pelos bons tempos de faculdade.

Ao meu grande amigo **Prof. Evandro Mourão**, pelo seu profissionalismo, amizade e respeito.

À **Dra. Cristina Suemi Miashiro**, pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

Ao meu pai **Shiguero Miashiro** (in memorian), minha mãe **Sueko Miashiro** e minha avó **Ushi Miashiro**, por tornarem tudo possível.

Aos meus filhos **Víctor Yamamoto Miashiro, Igor Yamamoto Miashiro** e **César Yamamoto Miashiro** por todos os momentos felizes.

Aos meus tios **Mário Kanashiro, Luíz Kanashiro** e **Sumiko Miashiro**, pela convivência, ajuda e lições de vida.

Aos meus primos **Luiz Roberto, Paulo César, Márcio Rogério, Lucy Nara, Rui, Luana, André** e meu sobrinho **Rodrigo** pelos bons momentos em família.

Aos **Padres José Limeira Sobrinho e Edivan Pedro dos Santos**, por agradecer-nos com sabedoria, carinho e por tantos conselhos bons.

Ao meu amigo **Prof. Dr. Alberto Hamra**, por suas sugestões neste trabalho.

Aos meus amigos **Lucas Rota, Marcelo de Oliveira Costa, Maycon Vinicius França, José Guilherme Batista Mendes, Denny Carlos Mendes de Souza, Dorival Bueno da Luz Júnior**, por nosso trabalho em equipe.

Às **Senhoras Elza Cristina Faria e Neusa Aparecida da Silva** pelo auxílio e atenção.

Aos **funcionários do Hospital Veterinário da UEL** pela indispensável ajuda no desenvolvimento deste experimento.

Aos **animais** utilizados neste experimento científico.

MIASHIRO, Edson Hidenori. **Padronização de modelo animal de custo reduzido para estudo da necrose isquêmica da cabeça femoral**: análise por radiografia digital, tomografia computadorizada, microscopia de luz, imunohistoquímica e estudo da marcha. 2020. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina; Londrina 2020.

RESUMO

Introdução: A necrose isquêmica da cabeça femoral (NICF) afeta adultos, entretanto acomete também crianças, na forma da Doença de Legg-Calvé-Perthes (DLCP). **Objetivos:** Nosso objetivo é padronizar um modelo experimental de NICF para o estudo da DLCP, com custo reduzido. Também, propõe-se introduzir testes de avaliação da marcha, proporcionando uma análise funcional. **Material e métodos:** Onze leitões machos foram submetidos ao procedimento cirúrgico no quadril direito, sendo o esquerdo utilizado como controle. Induziu-se a necrose por meio de cerclagem dupla sobre o colo do fêmur direito (COLFD) com fio inabsorvível. Seccionou-se o ligamento redondo. Os leitões foram divididos em: Grupo A, com oito animais, sacrificando-se dois animais respectivamente na 2^a, 4^a, 6^a e 8^a semanas após a indução da necrose e Grupo B, com dois animais, submetidos a todo procedimento, exceto à cerclagem do COLFD para comprová-la como indutora da necrose (*Sham*). Realizou-se a observação visual da marcha nos determinados tempos de estudo, utilizando a Classificação de Etterlin et al: 0, marcha normal; 1, marcha irregular; 2, claudicação moderada e 3, claudicação severa ou ausência de deambulação. O Grupo B foi sacrificado na 6^a semana. Os fêmures foram dissecados e armazenados por congelamento. A seguir realizou-se a radiografia digital (RD), tomografia computadorizada (TC) e análise macroscópica. Mediu-se a altura da epífise (A) do ápice da superfície articular até o ponto médio da fise metafisária. Mediu-se a largura da epífise (D) do ponto máximo medial ao máximo lateral na transição cabeça-fise metafisária. Calcularam-se os coeficientes epifisários (COE) por meio da razão entre “A” e “D”. Os fêmures foram armazenados e preparados para microscopia de luz e imunohistoquímica utilizando o “*Transforming Growth Factor Beta 1*” (TGF- β 1). **Resultados:** No Grupo A foram operados 9 leitões, com 8 evoluindo para NICF direita e 1 óbito por sepse. Todos os leitões apresentaram marcha grau 2. As cabeças femorais direitas apresentaram na RD e TC, áreas de esclerose óssea, achatamento, colapso e fragmentação. Os valores da “A” e do COE da cabeça femoral direita apresentaram-se menores que os da contralateral e da “D” em 7 animais (87,5%). Nas placas de crescimento das cabeças femorais direitas observaram-se condrócitos agrupados desordenadamente e separados por lacunas vazias. No Grupo B, *Sham*, não ocorreram sinais de NICF nos exames de imagem e histológicos e apresentaram marcha normal. O Grupo A, apresentou redução da expressão do TGF- β 1 nas cabeças femorais direitas com 2 e 6 semanas de pós-operatório e esquerdas com oito semanas. No Grupo B não houve diferenças de expressão entre os lados. **Conclusões:** O modelo experimental descrito, com estrutura simples demonstrou alterações de isquemia nos exames de imagem, marcha e histo-morfologia. O congelamento dos fêmures possibilita a realização da RD e TC nos laboratórios de humanos em data programada e sem o prejuízo do diagnóstico de isquemia por imagem. Este recurso permite a conservação da peça anatômica até que seja possível realizar os exames.

Palavras-chave: Necrose da cabeça do fêmur. Isquemia;. Modelos animais. Doença de Legg-Calvé-Perthes.

MIASHIRO, Edson Hidenori. **Reduced-cost animal model standardization for studying avascular necrosis of the femoral head:** analysis with the use of digital radiography, computerized tomography scan, light microscopy, immunohistochemistry and gait studying. 2020. 101 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina; Londrina 2020.

ABSTRACT

Introduction: Avascular necrosis of the femoral head (ANFH) affects adults, however, children are also affected as Legg-Calvé-Perthes Disease (LCPD). **Objectives:** Our purpose is standardizing an experimental reduced-cost model of ANFH for LCPD study. Additionally, the introduction of gait assessment testing is suggested in order to provide a functional analysis. **Material and methods:** Eleven male piglets were submitted to a surgical procedure on the right hip, and the left one was used as control. Necrosis was induced by means of double cerclage on the right femoral neck (RFN), with non-absorbable thread. The round ligament was sectioned. The piglets were split in Group A, consisting of eight animals, of which two were sacrificed in Weeks 2, 4, 6, and 8 each, respectively, after necrosis induction; and Group B, consisting of two animals submitted to all procedure, except RFN cerclage, in order to prove it as necrosis-inducing factor (*sham*). The gait was visually observed at the established study timepoints, following the Classification of Etterlin et al: 0: normal gait; 1: irregular gait; 2: moderate claudication; and 3: severe claudication or absence of deambulation. Group B was sacrificed in the sixth Week. Femurs were dissected and stored under freezing. Thereafter, digital radiography (DR), computerized tomography scan (TC), and macroscopic analysis were conducted. Epiphysis height (H) was measured from articular surface apex to metaphyseal physis mean point. Epiphysis width (W) was measured from the maximum medial point to the maximum lateral point, on metaphyseal head-physis transition. Epiphyseal coefficients (EC) were calculated using the ratio between “H” and “W”. Femurs were stored and prepared for light microscopy and immunohistochemistry using “*Transforming Growth Factor Beta 1*” (TGF- β 1). **Results:** In Group A, nine piglets were operated on, 8 of which progressed to right ANFH, and 1 died from sepsis. All piglets experienced gait grade 2. Right femoral heads showed, on DR and CT scan, areas with bone sclerosis, flattening, collapse, and fragmentation. Right femoral head “H” and EC values were lower than the contralateral ones, and lower than “W” in 7 animals (87.5%). In the right femoral heads growth plates, chondrocytes were observed to be disordered and separated by empty gaps. In Group B, *Sham*, there were no signs of ANFH on imaging and histological testing, and gait was normal. Group A had reduced TGF- β 1 expression on right femoral heads at 2 and 6 weeks post-surgery, and on the left ones, at eight weeks. In Group B there were no differences between sides. **Conclusions:** The experimental model described, with a simple structure, revealed ischemia changes on imaging tests, gait and morpho-histology. Femurs freezing enables the conduction of DR and CT scans in human laboratories at a scheduled date, without affecting the ischemia diagnosis through imaging. This resource allows to preserve the anatomical piece until the conduction of tests is possible.

Keywords: Femur head necrosis. Ischemia. Models. Animal. Legg-calvé-perthes disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Enfermaria do setor de grandes animais do Hospital Veterinário da UEL	25
Figura 2 – Baías para alojamento dos animais, com dois leitões por baía	26
Figura 3 – Sala de cirurgia do setor de grandes animais do Hospital Veterinário da UEL, onde foram realizados os procedimentos	27
Figura 4 – Descrição do posicionamento do leitão na mesa cirúrgica.....	28
Figura 5 – Via de acesso cirúrgica 1. Parâmetros da via de acesso	28
Figura 6 – Via de acesso cirúrgica 2. Incisão da pele, subcutâneo e fáscia	29
Figura 7 – Via de acesso cirúrgica 3. Exposição da cápsula articular	29
Figura 8 – Via de acesso cirúrgica 4. Capsulotomia com identificação do ligamento redondo.....	30
Figura 9 – Fotografia do Instrumento cirúrgico “passa fios”	30
Figura 10 – Descrição da cerclagem 1	31
Figura 11 – Descrição da cerclagem 2.....	31
Figura 12 – Corte frontal da cabeça femoral do leitão imaturo.....	34
Figura 13 – Altura e largura da epífise da cabeça femoral.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Descrição comparativa de estudos com modelos experimentais suínos, através do número com a amostra, tempo de eutanásia e variáveis de estudo	20
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Amostra
CE	Cartilagem epifisária
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CF	Cabeça femoral
COE	Coeficiente epifisário
COLFD	Colo do fêmur direito
COS	Centro de ossificação secundária
DAB	Substrato-cromógeno diaminobenzidina
DLCP	Doença de Legg-Calvé-Perthes
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIM	Exame de imunohistoquímica
FM	Fise metafisária
HE	Hematoxilina eosina
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
M	Metáfise
ME	Microscopia eletrônica
ML	Microscopia de luz
NICF	Necrose isquêmica da cabeça femoral
NIH	National Institute of Health
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Placa de crescimento
RD	Radiografia digital
RMN	Ressonância magnética nuclear
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
RX	Radiografia
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia computadorizada
TGF- β 1	Transforming Growth Factor Beta 1
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP
UEL	Universidade Estadual de Londrina
3D	Tri-dimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	DEFINIÇÃO DE NECROSE ISQUÊMICA DA CABEÇA FEMORAL	16
1.2	DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES.....	16
1.2.1	Introdução.....	16
1.2.2	Epidemiologia	16
1.2.3	Etiologia.....	17
1.2.4	Fisiopatologia	17
1.2.5	Tratamento	17
1.3	MODELOS EXPERIMENTAIS.....	18
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	ESTUDO PILOTO.....	24
4.2	AMOSTRA	24
4.3	PROCEDIMENTO ANESTÉSICO	26
4.4	TÉCNICA CIRÚRGICA	26
4.5	AVALIAÇÃO DA MARCHA	32
4.6	PREPARAÇÃO DAS PEÇAS ANATÔMICAS PARA OS EXAMES.....	33
4.7	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	35
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO: ARTIGO CIENTÍFICO	37
6	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS	93

ANEXO	101
--------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DE NECROSE ISQUÊMICA DA CABEÇA FEMORAL

A necrose da cabeça do fêmur é uma das principais doenças degenerativas que afetam o quadril. Pode levar ao colapso da cabeça femoral (CF) resultando em deformidade permanente e artrose desta articulação.¹ Normalmente afeta indivíduos com idade média de 30 anos, entretanto acomete também crianças. Nos adultos está relacionada a traumatismos, exposição à radiação, uso de álcool² e hemoglobinopatias.³ Os métodos de tratamento clínico incluem: a retirada de carga do membro afetado, drogas para baixar o nível de lipídios,^{4,5} anticoagulantes,⁶ prostaciclina,^{7,8} vasodilatadores, bifosfonados,^{9,10} terapia com ondas de choque e aplicação de pulsos eletromagnéticos.¹¹

Nos adultos, foram descritos vários métodos de tratamento cirúrgico como a descompressão óssea,¹²⁻¹⁴ com ou sem enxerto ósseo,¹¹ a descompressão óssea com enxerto vascularizado, osteotomias¹⁴⁻¹⁶ e as artroplastias.^{14,17}

Apesar destes tratamentos, a CF tende ao colapso e conseqüente artrose do quadril.

Nas crianças, a necrose isquêmica da cabeça femoral (NICF) pode ser causada por lesões traumáticas, iatrogênicas ou pela Doença de Legg-Calvé-Perthes (DLCP).

1.2 DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES

1.2.1 Introdução

Em 1910, três artigos foram publicados respectivamente por A. Legg, J. Calvé e G. Perthes. Estes estudos descreviam uma nova afecção do quadril de crianças, diferente da tuberculose articular que era a doença mais comumente encontrada naquela época.¹⁸⁻²⁰

Desde então, cerca de 2.000 pesquisas foram publicadas em relação ao tema.²¹ As pesquisas e publicações no Brasil datam de mais de 50 anos.²¹

1.2.2 Epidemiologia

A incidência da DLCP é de, aproximadamente, 15 por 100.000 crianças, sendo mais comum nos meninos na proporção de 5:1. A doença é muito rara nos indivíduos afrodescendentes e nos chineses.²² Existe uma maior incidência nos indivíduos de classe social baixa.²² O início da doença encontra-se em limites estreitos de idade, com média de 6 anos e limites de 2 a 13 anos, sendo que 80% possuem entre 4 e 9 anos.²²

1.2.3 Etiologia

A etiologia continua obscura, ocorrendo um distúrbio da circulação arterial, da drenagem venosa da CF em crescimento ou de ambos. Trueta e Harrison atribuíram a causa da necrose ao fechamento dos vasos epifisários localizados na região pósterio-superior do quadril. Eles demonstraram que, em crianças na faixa etária dos quatro aos sete anos, a única fonte de suprimento sanguíneo para a epífise femoral proximal são os vasos epifisários laterais, os quais, por traumatismos ou processo inflamatório, levariam à DLCP por consequente obstrução.^{23,24}

Robert Salter observou que a extensão da fratura subcondral nas fases iniciais da NICF era um fator prognóstico importante.^{25,26}

1.2.4 Fisiopatologia

A DLCP é causada por uma isquemia e diversos graus de necrose da cabeça femoral. A fratura por fadiga do osso necrótico subcondral desencadeia o processo de reabsorção do osso desvitalizado e o quadro clínico da doença.²² A CF sofre diversos graus de deformidade com consequente diminuição da amplitude articular do quadril, encurtamento do membro e marcha claudicante. Na fase adulta pode ocorrer o desenvolvimento de uma artrose do quadril.

A extensão da lesão à placa cartilaginosa de crescimento e o processo de reparação subsequente à isquemia não são, ainda, bem conhecidos e precisam ser estudados para que seja possível desenvolver novas terapias.^{27,28}

1.2.5 Tratamento

O tratamento da DLCP pode ser conservador^{15,21,29,30} ou cirúrgico.^{16,21}

O tratamento inicial tem sempre como objetivo melhorar a mobilidade do quadril e a relação anatômica entre a CF e o acetábulo, tentando diminuir o efeito deletério da afecção sobre a articulação.

A indicação precisa do melhor tipo de tratamento é, por vezes, difícil, variando entre o acompanhamento clínico e radiográfico da criança e o tratamento conservador com uso de tração, de aparelhos ortopédicos ou gessados, de abdução do quadril ou operatório.²¹

O tratamento cirúrgico indicado primordialmente nas fases iniciais da DLCP está fundamentado em duas vertentes distintas: a que indica a realização de uma osteotomia femoral proximal varizante e derrotativa e a que recomenda a osteotomia do osso ilíaco, na

região inominada do osso. As duas osteotomias têm o objetivo de melhorar a cobertura da CF comprometida.^{21,31}

O objetivo inicial do tratamento da NICK, tanto nas crianças como nos adultos, é preservar a CF e evitar a evolução progressiva para a artrose do quadril, pois ocorre em indivíduos jovens. Em muitos casos isso não é possível e o comprometimento da CF é de tal gravidade que a única alternativa de tratamento é substituí-la por uma prótese (artroplastia total de quadril).

A artroplastia total do quadril é um método de tratamento que está em desenvolvimento contínuo buscando uma prótese que não seja afetada pelos efeitos do seu desgaste. Porém, complicações como: soltura da prótese, luxações, lesões neurológicas, discrepâncias no comprimento dos membros, infecções, fraturas periprotéticas e desgaste das superfícies continuam sendo descritas na literatura.³²⁻⁴⁰

Por serem mais ativos, os pacientes mais jovens são aqueles em que a artroplastia sofre os efeitos do desgaste mais precocemente e, quando isso ocorre, é necessária uma cirurgia de revisão. As revisões das artroplastias são cirurgias muito complexas, pois, quando se remove a primeira prótese, já existe uma perda óssea, tanto no fêmur como no acetábulo, dificultando a colocação da prótese de revisão.

Muitas vezes a perda óssea é tão severa que existe a necessidade do uso de enxerto ósseo de banco de ossos. Infelizmente o acesso dos cirurgiões ortopédicos ao enxerto de banco de ossos em nosso país é extremamente difícil, sendo uma realidade em poucos hospitais.

O resultado disso são milhares de pacientes cadeirantes à espera de uma vaga para uma cirurgia de revisão de prótese pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

A escassez de material humano para estudo em fases precoces ou assintomáticas da DLCP, torna necessários os modelos experimentais com animais.⁴¹ Na literatura, trabalhos demonstram a utilização de cães,^{42,43} ratos,⁴⁴⁻⁴⁹ porcos^{1,9,27,28,50-55} e coelhos.⁵⁶⁻⁵⁸

O modelo experimental suíno foi originalmente descrito por Salter.⁵⁹ Apesar de este modelo ter sido usado para desenvolver alguns dos conceitos atuais a respeito da patogênese da DLCP, pouco foi escrito sobre ele, incluindo as alterações isquêmicas na placa de crescimento em torno do centro secundário de ossificação.²⁷

A preferência por este animal ocorre devido à semelhança com o quadril humano quanto à vascularização e desenvolvimento, por ter baixa taxa de complicações²⁷ e pelo maior tamanho dos quadris o que facilita o procedimento cirúrgico.

Entretanto, neste modelo, a avaliação do desenvolvimento da DLCP é limitada apenas aos estágios iniciais da mesma, pois o crescimento e a maturidade óssea suína ocorrem com maior velocidade.⁶⁰

A amostragem e os métodos selecionados na realização dos estudos utilizando o modelo suíno com indução da NICF por cerclagem do colo do fêmur direito (COLFD) estão evidenciados no Quadro 1. Nesta análise, é possível visibilizar que não houve grande variação entre as características das amostras.

Observou-se que a maior parte dos autores utilizou radiografia, tomografia computadorizada e microscopia de luz. Estes exames possibilitaram estudar a deformidade da CF, as alterações celulares e até mesmo o teste de drogas.

A microscopia eletrônica permitiu o estudo da microestrutura óssea e alterações da hidroxiapatita do osso necrótico. Um melhor entendimento da composição estrutural do osso necrótico pode trazer mais informações sobre a atividade do osteoclasto. Assim, novos tratamentos visando reduzir a reabsorção óssea poderão surgir.⁶¹

Exames de imunohistoquímica foram utilizados para estudar alterações na atividade do osteoclasto e testar drogas para diminuir sua atividade e reduzir a reabsorção óssea e reduzir a deformidade da CF.⁶²

Adapala e Kim, em 2016,⁵⁵ utilizando a RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*), observaram que há genes envolvidos em hipóxia celular, angiogênese e inflamação na cartilagem articular da CF com necrose. Isso representa um novo avanço no estudo da cartilagem imatura após a necrose isquêmica, podendo ser um princípio para novas terapias.

Quadro 1 – Descrição comparativa de estudos com modelos experimentais suínos, através do número com a amostra, tempo de eutanásia e variáveis de estudo

Autor	AM	I (s)	P (kg)	Eutanásia	Exames	Conclusões
Salter, 1966 ⁵⁹	*	*	*	*	RX	Retirada de carga e uso de órtese reduziram a deformidade da CF
Kim, Su, Kiu, 2001 ²⁷	27	2-4	5-8	3d, 1 ^a a 8 ^{as}	RX, ML	Colapso e fragmentação da CF. Desorganização dos condrócitos, centros de ossificação acessórios
Kim, Skelton, Quigley, 2004 ²⁸	50	4-8	6-9	2 ^a , 4 ^a , 8 ^{as}	RX, ML	Alterações metafisárias variando de pequenos cistos a lesões maiores infiltrando a metafise
Rowe <i>et al.</i> , 2005 ⁶³	44	4-5	7-9	2 ^a , 4 ^a , 8 ^a , 12 ^a , 16 ^a , 20 ^{as}	RX, ML	Redução da altura da epífise, retardo do crescimento e fechamento prematuro da fise
Kim <i>et al.</i> , 2005 ⁹	24	4-5	6-8	8 ^{as}	RX, ML	Redução da deformidade da CF com o uso do ibandronato
Kim, Morgan-Bagley, Kostenuik, 2006 ⁶²	18	4-5	6-8	8 ^{as}	RX, ML, EIM	Redução da deformidade da CF com o uso de osteoprotegerina que diminuiu atividade do osteoclasto e a reabsorção óssea
Rowe <i>et al.</i> , 2006 ⁶⁰	26	4-5	7-9	2 ^a , 4 ^a , 8 ^a , 12 ^a , 16 ^a , 20 ^{as}	RX, ML	O modelo pode ser utilizado para o estudo das fases iniciais da DLCP. Na 20 ^{as} ou após desenvolve-se artrose severa
Kothapalli <i>et al.</i> , 2007 ⁵⁰	10	6-9	4-6	2 ^o , 6 ^o , 7 ^o , 10 ^o , 14 ^o d	Estudo do DNA (TUNEL), ME	Oncose e apoptose estavam envolvidas no processo de necrose após isquemia
Koob <i>et al.</i> , 2007 ¹	18	6-8	*	2 ^a , 4 ^a , 8 ^{as}	RX, Teste de compressão	A NICF leva à diminuição da resistência mecânica e, conseqüentemente, ao seu colapso
Kim <i>et al.</i> , 2009 ⁶⁴	65	4-6	5-8	1d, 2 ^a , 4 ^a , 8 ^{as}	RX, TC, ML	A necrose da placa de crescimento não foi uniforme permanecendo áreas viáveis
Shapiro <i>et al.</i> , 2009 ⁵²	10	3	*	1 ^a , 2 ^a , 4 ^a , 8 ^{as}	RMN, ML	Diminuição da altura e alargamento da epífise femoral. Colapso da CF
Zang <i>et al.</i> , 2010 ⁵³	*	5	6-8	3h, 48h	TC com contraste	Interrupção da circulação da CF após a cerclagem do COLFD
Kong <i>et al.</i> , 2011 ⁶⁵	12	5-6	5-6	3 ^a , 6 ^a , 9 ^a , 12 ^{as}	RX, ML	Tratamento com perfurações da CF com broca não diminuiu a deformidade
Dello Russo <i>et al.</i> , 2012 ⁵⁴	10	12	10-15	12s	RX, ML	Diminuição da deformidade da CF com Ibandronato e plasma rico em plaquetas
Kim <i>et al.</i> , 2012 ⁶⁶	16	6-8	6-8	8 ^{as}	TC, ML	A retirada de carga diminuiu a deformidade da CF
Aruwajoye, Kim, Aswath, 2015 ⁶¹	6	6-8	6-8	2 ^a , 8 ^{as}	TC, ML, ME	Alterações da apatita do osso necrótico podem estar relacionadas com o aumento de sua reabsorção
Adapala, Kim, 2016 ⁵⁵	18	6	*	24h, 2 ^{as} , 4 ^{as}	RT-PCR	Na cartilagem articular foram observados genes envolvidos em hipóxia, angiogênese e inflamação
Johnson <i>et al.</i> , 2018 ⁶⁷	10	6	*	2d, 4 ^{as}	RMN, ML	Mapeamento da NICF no COS, cartilagem epifisária e cartilagem articular

AM: amostra; CF: Cabeça femoral; COLFD: Colo do fêmur direito; COS: Centro de ossificação secundária; d: dias; DLCP: Doença de Legg-Calvé-Perthes; EIM: Exame de Imunohistoquímica; I: Idade; Kg: Kilogramas; ME: Microscopia eletrônica; ML: Microscopia de luz; P: peso; RMN: Ressonância magnética nuclear; RT-PCR: (*Reverse transcription-polymerase chain reaction*); RX: Radiografia; s: Semanas; TC: Tomografia computadorizada; TUNEL: (*Terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP*)

* Dado não informado pelo estudo

O procedimento cirúrgico foi detalhado por poucos autores, em especial Kim *et al.*²⁷ Nos estudos, a simulação da DLCP foi induzida cirurgicamente através de distintas etapas. Nem todos os trabalhos descreveram explicitamente cada etapa realizada, mas o trabalho de Kim *et al.*²⁷ foi utilizado como referência do procedimento cirúrgico em outros estudos.

Nenhum dos estudos apresentados no Quadro 1 evidencia como foi realizado o acompanhamento pós-operatório das amostras.

No modelo suíno para o estudo da NICF, não há qualquer trabalho demonstrando algum tipo de avaliação funcional da marcha das cobaias após a indução da necrose.

A claudicação é um dos sinais clínicos da NICF. Ocorre pela dor e, posteriormente, pela incongruência articular, osteoartrite e diminuição da mobilidade do quadril. O principal sintoma associado à osteoartrite é a dor.⁶⁸ Distúrbios de movimento podem ser consequência deste sintoma levando à claudicação. Modelos experimentais utilizando animais têm sido utilizados para o teste de drogas para a analgesia na osteoartrite por meio da análise da marcha em laboratório.⁶⁸ Novas pesquisas devem ser realizadas associando achados de exames laboratoriais e de imagem da NICF com os distúrbios da marcha.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de o modelo suíno para o estudo da NICF ter sido descrito por Salter,⁵⁹ em 1966, nos países em desenvolvimento existe apenas um estudo descrito na Argentina, em 2012, por Dello Russo *et al.*⁵⁴

A falta de recursos financeiros, de estrutura física e de investimentos na área de pesquisa dificultam a execução de pesquisas nesse sentido nestas regiões, apesar de existirem profissionais capacitados. Assim, a busca de alternativas priorizando a capacidade técnica do pesquisador faz-se necessária para possibilitar esta linha de pesquisa nestes países.

De modo até surpreendente, não se constata análises funcionais, como o estudo da marcha com o modelo suíno. A claudicação é um dos sinais clínicos da NICF, sendo necessário, também, estudar as alterações da marcha nesse modelo, como uma forma indireta de análise clínica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar um modelo experimental de isquemia da cabeça do fêmur para o estudo da DLCP com custo reduzido. Também, propõe-se introduzir os testes de avaliação da marcha, proporcionando uma análise funcional das alterações provocadas pela isquemia, aspecto ainda não analisado nos estudos experimentais publicados sobre o assunto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Estudar as alterações da CF na DLCP através de radiografia digital e tomografia computadorizada (TC) da CF inteira e congelada nos diversos tempos de estudo.

2 - Estudar as alterações de marcha nas cobaias nos diversos tempos de estudo e classificá-las de acordo com a classificação proposta por Etterlin *et al.*⁶⁹

3 - Estudar as alterações da placa de crescimento por microscopia de luz (ML), nos diversos tempos de estudo em peça anatômica congelada.

4 - Estudar as reações de imunohistoquímica do *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- β 1) nos diversos tempos de estudo em peça anatômica congelada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Estudo registrado sob o processo CEUA nº 7028.2015.85 e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (Anexo A) e seguiu *The Animal Research Reporting in Vivo Experiments Guidelines*.⁷⁰

4.1 ESTUDO PILOTO

Realizou-se um treinamento da técnica cirúrgica em quatro quadris de cadáveres de leitões com quatro semanas. Em seguida, realizou-se a dissecação dos fêmures para o estudo da anatomia e padronização das técnicas de análise. Cada experimento foi repetido duas vezes para segurança da técnica.

O objetivo primário foi padronizar um modelo experimental suíno factível (com análise dos resultados de exames de imagem e histologia), para pesquisadores de países com menos estrutura de pesquisa; e o objetivo secundário foi estudar as alterações da marcha observada nos animais submetidos a esse modelo experimental.

4.2 AMOSTRA

A amostragem foi escolhida de acordo com a literatura disponível (Quadro 1) e sob orientação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina. Kim *et al.* demonstraram que as alterações anatômicas nesse modelo de estudo ocorreram em 82% dos animais submetidos à cerclagem.^{27,28} A determinação do número amostral não tem caráter exclusivamente estatístico, pois depende, principalmente, da disponibilidade dos espécimes a serem investigados e do padrão ético envolvido (que exige, quase sempre, amostras de tamanho reduzido ou reduzidíssimo).⁷¹

Assim, na lei do retorno decrescente, (método de “equação de recursos”⁷¹) determinaram-se 2 leitões por tempo de estudo no grupo A e 2 leitões no grupo B para cada tempo de estudo. Os leitões foram divididos em dois grupos. O grupo A com oito animais, sendo sacrificados dois animais respectivamente na 2^a, 4^a, 6^a e 8^a semanas após a indução cirúrgica da necrose por cerclagem do colo do fêmur direito (COLFD) e com a secção do ligamento redondo, e o grupo B com dois animais submetidos ao procedimento cirúrgico com a secção do ligamento redondo e sem realizar a cerclagem do COLFD, para comprová-la como fator indutor da necrose isquêmica da cabeça do fêmur (NICF) (*Sham*). Os leitões deste grupo foram sacrificados na 6^a semana, pois a deformidade da CF é mais evidente a partir deste período de isquemia.²⁷

Onze leitões, híbridos comerciais (cruzamento das raças *Large White* e *Landrace*), machos, já que a DLCP é cinco vezes mais frequente em meninos que em meninas,²² procedentes de um fornecedor regulamentado pela Vigilância Sanitária, pesando entre 4-6 kg, com idade variando de 3 a 4 semanas, foram alojados no setor de grandes animais do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (Figura 1) em baias (Figura 2), durante três dias antes do início do experimento.

Duas cirurgias foram realizadas por semana de acordo com a disponibilidade do centro cirúrgico, sendo sorteado no momento da cirurgia a qual grupo pertenceria o animal.

Figura 1 – Enfermaria do setor de grandes animais do Hospital Veterinário da UEL



Fonte: O próprio autor

Figura 2 - Baias para alojamento dos animais, com 2 leitões por baia



Fonte: O próprio autor

4.3 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

O modelo anestésico realizado utilizou Acepromazina na dose de 0,05mg/kg via intravenosa (IV). Depois de 15 minutos, foi aplicado Cloridrato de Cetamina na dose de 4mg/kg (IV) associado ao Diazepam na dose de 0,5mg/kg (IV) para se proceder a indução anestésica. Para conferir a analgesia, foi empregado 0,2ml/kg de Lidocaína 2% por via epidural lombossacra.

4.4 TÉCNICA CIRÚRGICA

O procedimento foi realizado em ambiente cirúrgico (Figura 3) pelo mesmo cirurgião ortopedista, especialista em cirurgia do quadril, auxiliado por uma residente do primeiro ano de Medicina Veterinária. Foram realizadas duas cirurgias por semana de acordo com a disponibilidade do centro cirúrgico. O fêmur operado foi o direito sendo utilizado o esquerdo como controle. O leitão foi posicionado em decúbito lateral esquerdo (Figura 4). A via de acesso utilizada foi a posterior sobre o quadril direito, usando como parâmetro a palpação do trocânter maior (Figura 5). Foi realizada a dissecação por planos na seguinte ordem:

1. pele, subcutâneo e fáscia (Figura 6);
2. incisão do músculo glúteo máximo e afastamento do músculo glúteo médio para exposição da cápsula (Figura 7);
3. capsulotomia e tração longitudinal para a luxação do quadril. O ligamento redondo foi identificado e seccionado para evitar irrigação pela artéria do ligamento redondo (Figura 8);
4. cerclagem dupla sobre o colo do fêmur com fio *Prolene 2 Ethicon®* utilizando um “passa fios” (Figuras 9, 10 e 11). Utilizou-se este fio grosso e inabsorvível para evitar o seu rompimento ao tensioná-lo para amarrar o nó. A cerclagem foi realizada de forma dupla para aumentar a sua segurança e eficiência;
5. fechamento realizado por planos (cápsula, musculatura glútea, subcutâneo e pele), utilizando-se o fio *Mononylon 2.0 Ethicon®*;
6. suturação da pele com ponto contínuo utilizando o fio *Mononylon 2.0 Ethicon®*.

Figura 3 - Sala de cirurgia do setor de grandes animais do Hospital Veterinário da UEL, onde foram realizados os procedimentos



Fonte: O próprio autor

Figura 4 – Descrição do posicionamento do leitão na mesa cirúrgica



O leitão foi posicionado em decúbito lateral esquerdo na mesa de cirurgia.

Fonte: O próprio autor

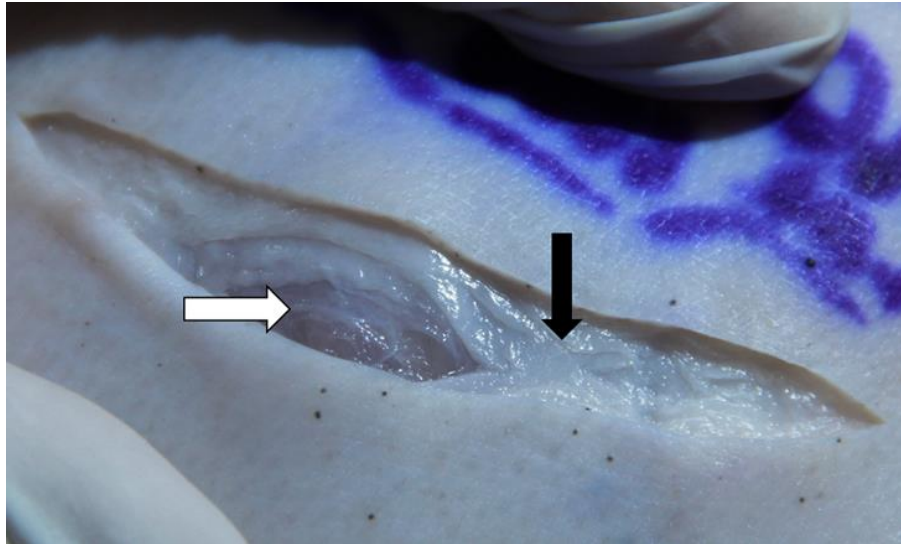
Figura 5 – Via de acesso cirúrgica 1. Parâmetros da via de acesso



A via de acesso longitudinal está indicada pela seta preta. O ápice do trocânter maior do fêmur está indicado pela seta branca.

Fonte: O próprio autor

Figura 6 - Via de acesso cirúrgica 2. Incisão da pele, subcutâneo e fáscia



Descrição da via de acesso cirúrgica. Dissecção por planos. Incisão da pele e subcutâneo e identificação da fáscia (seta preta). Incisão da fáscia e exposição do músculo glúteo máximo (Seta branca).

Fonte: O próprio autor

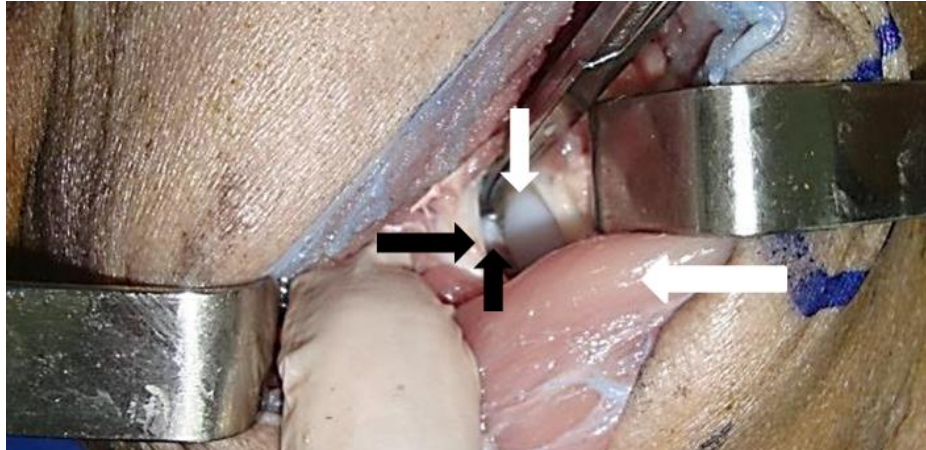
Figura 7 – Via de acesso cirúrgica 3. Exposição da cápsula articular



Descrição da via de acesso cirúrgica. O músculo glúteo médio foi afastado com o afastador de Farabeuf (seta branca). O nervo ciático foi visibilizado (seta preta maior) assim como a cápsula articular (seta preta menor).

Fonte: O próprio autor

Figura 8 – Via de acesso cirúrgica 4. Capsulotomia com identificação do ligamento redondo



Descrição da via de acesso cirúrgica. O músculo glúteo foi afastado com Farabeuf (Seta branca maior). Foi realizada uma capsulotomia (Seta preta maior). O ligamento redondo foi isolado para ser seccionado (Seta preta menor). A cabeça femoral foi visibilizada (Seta branca menor).

Fonte: O próprio autor

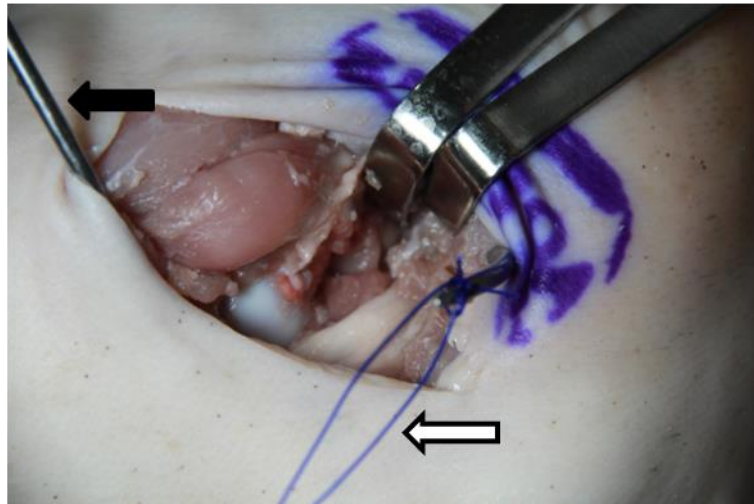
Figura 9 – Fotografia do Instrumento cirúrgico “passa fios”



Instrumento cirúrgico utilizado para a realização da cerclagem em torno do colo do fêmur.

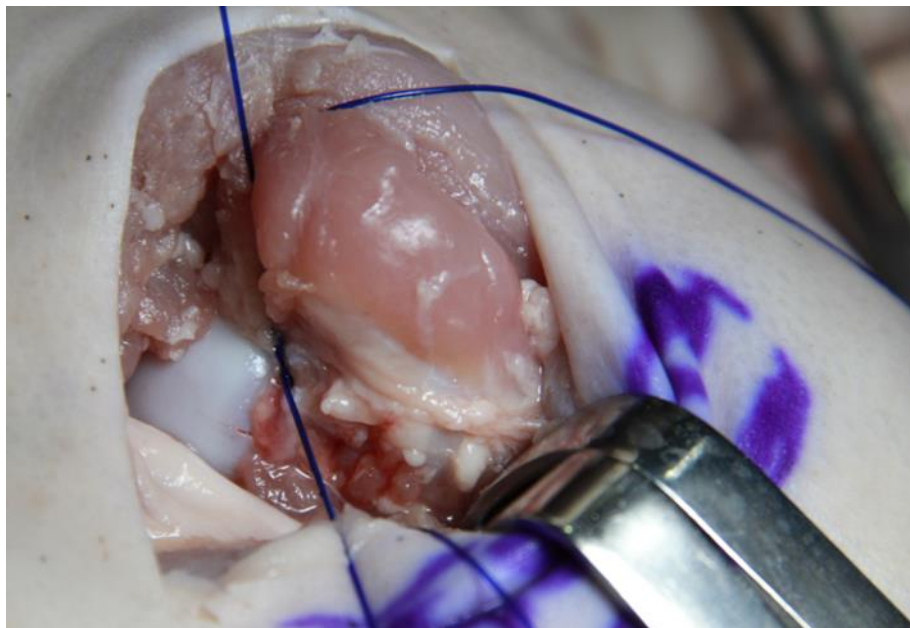
Fonte: O próprio autor

Figura 10 – Descrição da cerclagem 1



Descrição da cerclagem. Passagem dos fios Prolene *Ethicon*® em torno do colo do fêmur utilizando o “passa fios”. Seta preta: “passa-fios”. Seta branca: Prolene *Ethicon*®
Fonte: O próprio autor

Figura 11 – Descrição da cerclagem 2



Descrição da cerclagem. Amarrias dos fios de Prolene 2 *Ethicon*® para a cerclagem dupla em torno do colo do fêmur.
Fonte: O próprio autor

Os cuidados pós-operatórios foram realizados por revezamento entre três médicas residentes veterinárias.

Foi administrado o Tramadol na dose de 1mg/kg por via intramuscular (IM) a cada 12 horas para a analgesia durante todo o período de experimento. Para minimizar o processo inflamatório decorrente da agressão cirúrgica e auxiliar no combate à dor, foi utilizado o anti-inflamatório Flunixin Meglumine na dose de 1,1mg/kg uma vez ao dia por via IM, durante cinco dias.

O antibiótico utilizado foi a penicilina Benzatina na dose de 20000 UI/Kg por via IM a cada 48 horas num total de três aplicações. A ferida foi protegida com bandagem com curativos diários na ferida cirúrgica com limpeza com solução fisiológica seguida de aplicação tópica de Clorexidine tópico. Os pontos de pele foram retirados no décimo dia de pós-operatório.

A eutanásia foi realizada nos momentos determinados com a aplicação IV de Tiopental Sódico a 2,5% na dose de 10mg/kg, seguida de aplicação de Cloreto de Potássio por via IV.

O descarte dos animais foi feito por meio de incineração por empresa especializada terceirizada.

4.5 AVALIAÇÃO DA MARCHA

O ciclo normal da marcha no ser humano se faz em duas fases: fase de acomodação de posição, quando o pé entra em contato com o solo, e uma fase de oscilação, quando o movimento é empreendido.⁷² A pata pélvica do leitão faz o movimento similar ao membro inferior do ser humano. Os leitões foram observados deambulando no momento anterior à realização da anestesia, nos determinados tempos de estudo. Foram realizados três testes de marcha para cada animal, com a observação visual e a gravação digital da marcha em superfície plana, sem irregularidades. Essas possíveis alterações de marcha foram comparadas no grupo A e B (*Sham*), nos diversos tempos de estudo, e a fim de se verificar a correlação das imagens de NICF com a presença de claudicação. A classificação de marcha utilizada foi a proposta por Etterlin *et al.*⁶⁹ para porcos, que varia de 0 a 3, sendo:

Grau 0: normal;

Grau 1: marcha irregular com encurtamento do passo e carga desigual em um ou mais membros;

Grau 2: claudicação moderada com desvio evidente da carga de um ou mais membros e dificuldade clara de deambulação;

Grau 3: claudicação severa sem apoio no membro afetado ou incapacidade de marcha.

4.6 PREPARAÇÃO DAS PEÇAS ANATÔMICAS PARA OS EXAMES

Imediatamente após o sacrifício, foi realizada a disseção dos fêmures pelo mesmo cirurgião.

As peças foram fotografadas e armazenadas em refrigerador doméstico comum à temperatura de -20 graus Celsius por duas semanas em média, antes da realização dos exames de imagem.

As normas da Vigilância Sanitária impedem que os animais sejam submetidos a exames em laboratórios de humanos. A disseção e o congelamento dos fêmures possibilitam a realização dos exames destas peças anatômicas nestes laboratórios.

Diferente de Kim *et al.*,^{27,28} que realizaram cortes frontais da CF de 3mm para realização da radiografia digital (RD), fizemos exames da CF inteira sem cortes.

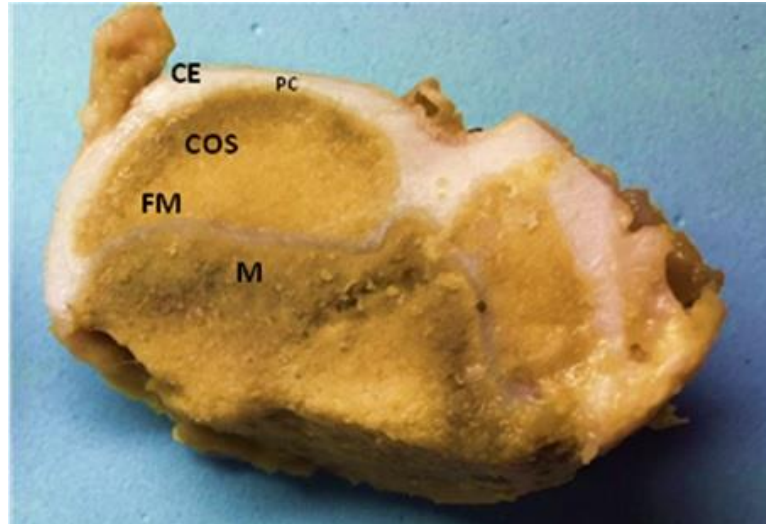
Em ambos os grupos, os fêmures foram submetidos à RD na incidência ântero-posterior e à tomografia computadorizada (TC) nos cortes frontal, axial e tri-dimensional (3D) no Laboratório do Instituto de Radiologia Manoel de Abreu de Apucarana. Em todos os leitões, a cabeça femoral esquerda foi usada como controle. Foi utilizado o aparelho de *RD Toshiba* modelo 12M 500MAS e o de TC da GE modelo *Hispeed Dual*.

Após a realização dos exames de imagem, os fêmures foram cortados no seu 1/3 proximal, na região central no plano frontal utilizando serra cirúrgica a Nitrogênio. Foram identificados e armazenados em solução de formol a 10%.

A CF do leitão imaturo é composta pelas seguintes regiões anatômicas (Figura 12):

1. Centro de ossificação secundária (COS) que possui um formato semiesférico;
2. Cartilagem epifisária (CE), contornando o centro de ossificação secundária;
3. Placa de crescimento (PC), localizada entre a cartilagem epifisária e o centro de ossificação secundária e que é responsável pelo crescimento circunferencial;
4. Fise metafisária (FM), que cobre toda a metafise proximal e é responsável pelo crescimento longitudinal da porção proximal do fêmur.

Figura 12 – Corte frontal da cabeça femoral do leitão imaturo



Descrição da cabeça femoral do leitão imaturo. Corte frontal da cabeça femoral normal no ponto médio. A cabeça femoral do leitão imaturo possui um centro de ossificação secundária (COS) envolto pela cartilagem epifisária (CE). A placa de crescimento (PC) fica entre a cartilagem epifisária e o centro de ossificação secundária. A fise metafisária (FM) localiza-se na base do COS. A metáfise (M) da parte proximal do fêmur situa-se abaixo da FM.

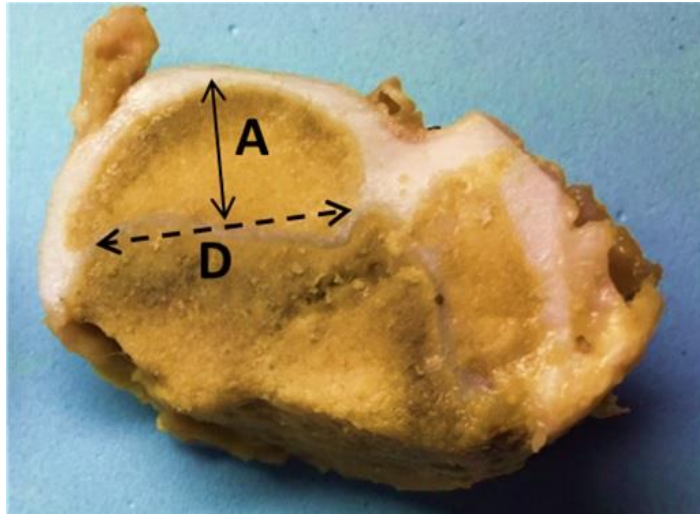
Fonte: O próprio autor

A altura (A) foi medida na peça seccionada, do ápice da superfície articular até o ponto médio da fise metafisária. A largura (D) foi medida do ponto máximo medial ao máximo lateral na transição cabeça-fise metafisária (Figura 13). As medidas foram tomadas por um único pesquisador.

Calcularam-se os coeficientes epifisários (COE) por meio da razão entre A e D. O COE indica o prognóstico da DLCP. A diminuição do seu valor significa piora no prognóstico^{66,73,74} (Figura 13).

Em seguida, armazenaram-se as peças em solução de formol a 10%.

Figura 13 – Altura e largura da epífise da cabeça femoral



Descrição da A, D e COE. A altura da epífise está representada pela seta fechada (A). A largura (D) da epífise está representada pela seta pontilhada. O COE é calculado pela razão entre A e D.

Fonte: O próprio autor

Após aproximadamente quatro meses, devido a questões operacionais do serviço e a fim de testar a possibilidade do uso de cabeças femorais congeladas, as peças foram mergulhadas em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para descalcificação e processadas rotineiramente para inclusão em parafina. Cortaram-se os blocos no micrótomo rotativo. Depositaram-se os cortes sobre as lâminas que foram coradas em hematoxilina eosina (HE) para avaliar as alterações na placa de crescimento (PC). Foram analisados por microscopia de luz (ML) com ampliações de 40, 100, 140, 240 e 340 vezes no Laboratório de Histologia da Universidade de São Paulo.

4.7 ANÁLISE IMUNOHISTOQUIMICA

Os exames foram realizados no Laboratório de Biologia de Tumores da Unioeste.

Os fragmentos ósseos para a realização de imunohistoquímica foram retirados no momento prévio ao exame de ML. As lâminas foram confeccionadas contendo cortes de tecido (3 a 5 μ M) representativos de cada experimento, fixados e incluídos em blocos de parafina. As lâminas permaneceram *overnight* em estufa 65°C e foram submetidas à desparafinização (xilol-álcool-água). Em seguida, os cortes foram delimitados com caneta hidrofóbica *Dako Pen*[®] e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 10% por 30 minutos. A seguir, procedeu-se à incubação em soro fetal 1% por 1 hora. Em

todas as lâminas, após a lavagem com *Phosphate Buffered Saline* (PBS), foram aplicados os anticorpos primários sobre cada corte “*Transforming Growth Factor Beta 1*” (TGF- β 1, 1:300, Santa Cruz Biotechnology), seguido de incubação em câmara úmida por 16 horas a 4°C. Após a incubação, as lâminas foram submetidas a dois banhos (5 minutos) em PBS e foi aplicado sobre cada amostra o anticorpo secundário biotinizado fornecido pelo *kit* comercial, por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Após este tempo, as lâminas foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos), seguido da aplicação de conjugado streptavidina-peroxidase por 15 minutos, em câmara úmida e em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos 3 vezes e submetidas à revelação com o substrato-cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. Em seguida foram contra-coradas com hematoxilina férrica por 1 minuto, posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos e desidratadas em graduações de álcool (70%, 85% e 100%), clarificadas em xilol e montadas e cobertas com lâmina utilizando meio de montagem não aquoso (bálsamo do Canadá). Analisaram-se as lâminas para obtenção de score semiquantitativo de imunomarcção do TGF- β 1 através do programa *Image J* desenvolvido pelo *National Institute of Health (NIH)* - USA.

Utilizou-se o TGF- β 1, que pode ser utilizado como medida de indireta do dano e alteração imune desencadeada pela NICF.^{58,75,76}

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As descrições incluíram para as variáveis categóricas: cálculo de frequência e respectivo percentual; e para as variáveis escalares: cálculo de média e respectivo desvio-padrão, máximo, mínimo e percentis (25%, 50% (mediana) e 75%). Foi aplicado o *Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon*, com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre ambos os lados, em cada grupo estudado, para as variáveis de interesse (A, D e COE) com nível de significância (p) 0,050.

Os resultados da imunoexpressão do TGF- β 1 foram comparados dois a dois, ou seja, o lado direito contra o lado esquerdo nos determinados tempos de estudo, duas, quatro, seis e oito semanas após a indução da NICF. O teste utilizado foi o teste t de *Student* e o nível de significância (p) adotado foi de 0,050.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO: ARTIGO CIENTÍFICO

Foi adotado, nesta tese, o modelo de apresentação dos Resultados e Discussão a partir da redação de artigo científico original intitulado “*Reduced-cost animal model standardization for studying avascular necrosis of the femoral head*”, submetido ao *Journal Orthopaedic Research* de acordo com as regras estabelecidas pela revista.



**Reduced-cost animal model standardization for studying
avascular necrosis of the femoral head**

Journal:	<i>Journal of Orthopaedic Research</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article (Non-Member)
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Miashiro, Edson; Universidade Estadual de Londrina, Almeida, Silvio; Universidade Estadual de Londrina Zanella, Luiz ; Universidade Estadual de Londrina Cardoso, Guilherme ; Universidade Estadual de Londrina Guamiero, Roberto ; Instituto de Ortopedia e Traumatologia, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo Mendonça, Ana ; Universidade Estadual de Londrina Camilo, Stefany; Universidade Estadual de Londrina Pereira, Laís ; Universidade Estadual de Londrina Silva, Gislene ; Universidade Estadual de Londrina de Angelis, Kauana ; Universidade Estadual de Londrina Santos, Gustavo ; Instituto de Ortopedia e Traumatologia, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
Areas of Expertise:	Hip, Orthopaedic
Keywords:	Hip, Modeling, Arthroplasty - Hip, Gait

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Reduced-cost animal model standardization for studying avascular necrosis of the**
2 **femoral head**

3

4 **Running Title:** Femoral necrosis porcine model

5

6 *Edson Hidenori Miashiro, MD, MSc

7 E-mail: miashirocor@gmail.com

8 <https://orcid.org/0000-0001-7072-5611>

9 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

10

11 Silvio Henrique Maia de Almeida, PhD

12 E-mail: salmeida@sercomtel.com.br

13 <https://orcid.org/0000-0002-2387-3264>

14 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

15

16 Luiz Francisco Zanella, PhD

17 <https://Orcid.org/0000-0001-8551-7743>

18 E-mail: lfzanella@uel.br

19 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

20

21 Guilherme Schiess Cardoso, PhD

22 <https://orcid.org/0000-0002-6096-1642>

23 E-mail: schiess@uel.br

24 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

25

26

27 Roberto Guarniero, MD, PhD

28 <https://orcid.org/0000-0002-1798-0653>

29 E-mail: r.guarniero@hc.fm.usp.br

30 Instituto de Ortopedia e Traumatologia, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de
31 Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

32

33 Ana Paula Abreu Mendonça

34 <https://orcid.org/0000-0002-4238-5768>

35 E-mail: apavet@yahoo.com.br

36 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

37

38 Stefany Lia Oliveira Camilo

39 <https://orcid.org/0000-0003-3313-0410>

40 E-mail: stefanyliacamilo@hotmail.com

41 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

42

43 Laís Muniz Arruda Pereira

44 <https://orcid.org/0000-0002-6107-9192>

45 E-mail: lais.map@outlook.com

46 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

47

48 Gislene dos Santos Silva

49 <https://orcid.org/0000-0001-5742-0987>

50 E-mail: gislene.ssilva@hotmail.com

51 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

52

53 Kauana de Angelis

54 <https://orcid.org/0000-0003-3078-2122>

55 E-mail: kauana-angelis@hotmail.com

56 Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

57

58 Gustavo Bispo dos Santos

59 <https://orcid.org/0000-0002-4774-8935>

60 E-mail: gustavo.bispo@hc.fm.usp.br

61 Instituto de Ortopedia e Traumatologia, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de

62 Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

63

64 *Corresponding Author

65 Edson Hidenori Miashiro

66 550 Caracas St., Londrina, PR, Brazil

67 Zip Code: 86050-070

68 Mobile phone no.: ++ 55 43 98824-0989

69 E-mail: miashirocor@gmail.com

70

71 AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

72 E.H.M: contributed with hospital costs, surgeries and article editing; S.H.M.A: provided study

73 material and scientific support; L.F.Z: oversaw procedures during admission; G.S.C: performed

74 the anesthesia procedure; R.G: provided scientific support; A.P.A.M., S.L.O.C. and L.M.A.P:

75 assisted in surgeries and were responsible for post-surgery care; G.S.S. and K.A: assisted in

76 surgeries; G.B.S: assisted in the performance of histologic testing. All authors have read and

77 approved the final article, and also authorized its publication.

78 **ABSTRACT**

79 Our purpose is testing an experimental model of avascular necrosis of the femoral head, by
80 assessing gait, image scan, morpho-histology, enabling it to be used at lower cost in developing
81 countries. Eleven piglets were operated. Necrosis was induced by right femoral neck cerclage.
82 The piglets were divided in Group A, consisting of 8 animals, of which two were sacrificed,
83 respectively, in Weeks 2, 4, 6 and 8 each, and Group B, consisting of 2 animals (sham),
84 procedure with no right femoral neck cerclage, sacrificed in 6 weeks. Gait classification was
85 Etterlin et al's. Frozen femurs were submitted to digital radiography and computerized
86 tomography scan. Epiphysis height and width and epiphysis coefficient were measured at
87 several timepoints. Light microscopy and immunohistochemistry with TGF- β 1 were also
88 performed. One animal died of sepsis in Group A. In this group, claudication was observed in
89 all animals. On digital radiography and computerized tomography scan, the following were
90 observed: bone sclerosis, right femoral neck widening, flattening, femoral head collapse and
91 fragmentation. All epiphysis height values, and right femoral head epiphysis coefficient were
92 lower than the contralateral ones. In those, chondrocytes were observed as disordered and
93 separated by gaps. Decreased TGF- β 1 expression at 2 and 6 weeks and on the left ones, at eight.
94 In Group B, no signs of necrosis were observed, and the gait was normal. Gait study was related
95 to necrosis. This model with frozen bones reproduced necrosis. Other studies are required to
96 investigate TGF- β 1.

97

98 **Keywords:** Femoral head necrosis; Ischemia; Animal, models; Legg-Calvé-Perthes disease.

99 INTRODUCTION

100 Femoral head necrosis is one of the main degenerative diseases affecting the hip, and may
101 cause arthrosis,¹ affects young adults² and children, in whom it is named Legg-Calvé-Perthes
102 Disease (LCPD).³ There is no treatment available yet to interrupt the injury and progressive
103 deformity of the femoral head (FH), and the scarcity of human material for LCPD study requires
104 experimental models to be performed with animals.⁴⁻¹⁰

105 For using these models, a team of veterinary doctors and a specialized hospital for
106 performing procedures and post-surgery care are required, in addition to image, laboratory and
107 microscopy testing, for studying anatomical pieces.

108 There are few researchers in a limited number of research sites having access to veterinary
109 hospitals, usually associated with Universities, that have the abovementioned structure, even in
110 countries with higher economical level. In developing countries, only in Argentina there is one
111 study published in that experimental area,¹¹ and considering those limitations, there is no
112 incentive for that research line to be developed.

113 Our purpose is standardizing an experimental model for femoral head ischemia, for LCPD
114 study, and enabling the use of that method by researchers from developing countries.
115 Additionally, the introduction of gait assessment testing is suggested, to provide a functional
116 analysis of changes caused by ischemia, which is an aspect that has not been assessed in
117 published experimental studies on the matter yet.^{1,12-19}

118

119 METHODS

120 This work was registered as process CEUA no. 7028.2015.85 and approved by the Ethics
121 Committee of our Institution, and followed the guidance from *ARRIVE Guidelines for*
122 *Reporting Animal Research*.²⁰

123

124 *Pivotal study*

125 A surgical technique training was performed, on four four-week old piglets corpses.
126 Thereafter, femurs were dissected for anatomy studying and standardization of analysis
127 techniques. Each experiment was repeated twice, for technique assurance.

128 The primary objective was standardizing a porcine experimental model (having an
129 analysis of image and histology testing results) viable to researchers from countries having less
130 research structure; and the secondary objective was studying the changes in gait observed on
131 animals submitted to that experimental model.

132

133 *Sample*

134 Sampling was chosen according to literature^{1,12-19} and under the guidance of the Ethics
135 Committee of our Institution. Kim et al.^{12,13} showed that anatomical changes in that study
136 model occurred in 82% of the animals submitted to cerclage. Sampling number determination
137 is not exclusively of statistic character, as it depends mainly on the availability of specimens to
138 be investigated and on the ethical standard involved (which almost always requires reduced or
139 very reduced size samples).²¹ Thus, in the law of diminishing returns ("resources equation"
140 method),²¹ 2 piglets by timeline in Group A and 2 piglets by timeline in Group B were
141 established. Piglets were divided in two groups. Group A, consisting of 8 animals, of which
142 two were sacrificed, respectively, in Weeks 2, 4, 6 and 8 each, after surgically induced necrosis,
143 and Group B, consisting of 2 animals submitted to surgical procedure with round ligament
144 section and no right femoral neck (RFN) cerclage, to prove it as an inducing factor for avascular
145 necrosis of the femoral head (ANFH) (Sham). The piglets in that group were sacrificed in Week
146 6, as FH deformity is more evident from that ischemia period on.¹²

147 Eleven piglets, male (because LCPD is five times more frequent in boys than in girls)²²
148 commercial hybrids (crossing races *Large White* and *Landrace*), originating from a supplier

149 regulated by Health Surveillance, weighing between 4-6 kg, ages varying from 3 to 4 weeks
150 old, were lodged in stalls at the Veterinary Hospital, for three days before the beginning of the
151 experiment.

152 Two surgeries a week were performed, depending on the availability of the operating
153 room, and the group to which the animal would be assigned was randomized at the time of the
154 surgery.

155

156 *Surgical technique*

157 The anesthesia model used acepromazine 0.05mg/kg, intravenously (IV). After 15
158 minutes, ketamine hydrochloride 4 mg/kg (IV), associated to diazepam 0.5 mg/kg (IV) was
159 administered. Lidocaine 2% at 0.2 ml/kg were administered via lumbosacral epidural.

160 The same surgeon performed all procedures in the operating room, assisted by a
161 veterinary resident. The femur operated on was the right one, and the left one was used as
162 control. A piglet was positioned on left lateral decubitus (Fig. 1). The approach used was
163 posterior over the hip, having as a parameter the greater trochanter palpation (Fig. 2). Dissection
164 by planes was performed at the following order: skin, subcutaneous and fascia; gluteus
165 maximus muscle incision and gluteus medius muscle spreading for exposing the capsule; then,
166 capsulotomy and longitudinal traction for hip luxation. The round ligament was identified and
167 sectioned (Fig. 3), to prevent blood supply by the round ligament artery. Double cerclage was
168 performed on the RFN with the use of *Prolene 2 Ethicon*® suture, with the use of a “wire
169 passer” (Fig. 4 e 5). That thick, non-absorbable wire was used to avoid breaking when straining
170 it to tie the knot, and double cerclage to increase its safety and efficacy. The closing was made
171 by planes (capsule, gluteal muscles, subcutaneous and skin), with the use of *Mononylon 2.0*
172 *Ethicon*® suture. Skin suture was performed with continuous stitching (Supplementary
173 Material 1).

174 Post-surgery care was performed by three alternating resident veterinary doctors.
175 Tramadol was administered at 1 mg/kg intramuscularly (IM) every 12 hours, and anti-
176 inflammatory Flunixin Meglumine 1.1 mg/kg once daily by IM, for five days.

177 Benzathine penicillin was used at 20000 IU/kg IM every 48 hours, in a total of three
178 administrations. Daily dressing was performed with the use of saline solution and chlorhexidine
179 administration. The stitches were removed on the tenth day post-surgery.

180 Euthanasia was performed by IV administration of sodium thiopental 2.5% at 10 mg/kg,
181 followed by IV administration of potassium chloride.

182 Animals were disposed of by means of incineration performed by an outsourced
183 specialized company.

184

185 *Gait assessment*

186 Normal gait cycle in human beings comprises two stages: stance phase, when the foot
187 comes in contact with the floor, and swing phase, when the movement is performed.²³ Piglet
188 pelvic paw performs a movement that is similar to human being lower limb. Piglets were
189 observed when deambulating, at the moment previous to euthanasia. Three gait tests were
190 performed to each animal, featuring visual observation and digital recording of gait on a flat
191 surface, with no irregularities. Those possible gait changes were compared in groups A and B
192 (Sham), at the several timepoints, and in order to verify the ANFH images correlation with the
193 presence of claudication. The gait score system used was that proposed by Etterlin et al.²⁴ for
194 pigs, which varies from 0 to 3, where grade 0: normal; grade 1: irregular gait with step
195 shortening and uneven load on one or more limbs; grade 2: moderate claudication with clear
196 deviation of load from one or more limbs, and clear difficulty to deambulate; and grade 3:
197 severe claudication with no support for the limb affected or failing at gait.

198

199 *Image scans*

200 Right after animal sacrifice, the femurs were dissected and stored in a regular domestic
201 fridge at the average temperature of -20°C for two weeks on average, before tests were
202 performed.

203 Health Surveillance regulations forbid animals are submitted to testing in human
204 laboratories. Femurs dissection and freezing enable the performance of tests of those anatomical
205 pieces in those laboratories.

206 In both groups, digital radiography (DR) was performed at anteroposterior incidence, and
207 computerized tomography (CT scan), for front, axial and tridimensional (3D) sections on all
208 whole femoral heads, on average, two weeks after the sacrifice. Left FH was used as control.
209 Radiography device *RD Toshiba* model 12M 500MAS and GE CT scanner model *Hispeed Dual*
210 were used.

211

212 *Femoral head description*

213 Normal immature piglet FH comprises: (Fig. 6)

- 214 – secondary ossification center (SOC), with semi-spherical shape;
- 215 – epiphyseal cartilage (EC), surrounding SOC;
- 216 – growth plate (GP), located between EC and SOC center, responsible for
217 circumferential growth;
- 218 – metaphyseal physis (MF) covering the whole proximal metaphysis, and responsible
219 for longitudinal growth of the femur proximal portion.

220

221 *Description of measurements used on FH*

222 After image scans were performed, femurs were cut on its proximal third, on the central
223 area on the front plane, with the use of a nitrogen-powered electric saw.

224 Firstly, epiphysis height and width were measured for the sectioned piece. Height (H)
225 was measured from articular surface apex to metaphyseal physis mean point. Width (W) was
226 measured from the maximum medial point to the maximum lateral point, on metaphyseal head-
227 physis transition. Epiphyseal coefficients (EC) were calculated by using the ratio between A
228 and D. EC indicates LCPD prognosis. Reduced EC value indicates prognosis worsening.²⁵⁻²⁷
229 (Fig. 7). Measurements were taken by a single investigator.

230 Afterwards, the pieces were stored in a 10% formalin solution.

231

232 *Light microscopy*

233 After a period of about four months, due to service operational matters, and in order to
234 test the possibility of using frozen femoral heads, the pieces were immersed in ethylene diamine
235 tetra-acetic acid (EDTA) for decalcification, and routinely processed for inclusion in paraffin.
236 The blocks were sliced on a rotary microtome. The slices were deposited on slides stained in
237 hematoxylin-eosin (HE), to assess changes in GP. They were analyzed by light microscopy
238 (LM) with 40, 100, 140, 240 and 340 times magnification.

239

240 *Immunohistochemical analysis*

241 Bone fragments for performing immunohistochemistry were taken from frozen bones
242 right before the light microscopy examination. The slides were prepared containing tissue slices
243 (3 to 5 μ M) representing each experiment, fixed and embedded in paraffin blocks. They
244 remained overnight in a 65°C oven, and were submitted to deparaffinization (xylene – alcohol
245 – water). Thereafter, the slices were delimited with hydrophobic pen *Dako Pen*[®] and
246 endogenous peroxidase was blocked in a hydrogen peroxide solution at 10% for 30 minutes.
247 Then, incubation in fetal serum at 1% was performed for one hour. For all slides, after washing
248 with phosphate buffered saline (PBS), primary antibodies were applied on each slice

249 “*Transforming Growth Factor Beta 1*” (TGF- β 1, 1:300, Santa Cruz Biotechnology), followed
250 by incubation in a humidity chamber for 16 hours at 4°C. After incubation, they were submitted
251 to two baths (5 minutes) in PBS, and the biotinylated secondary antibody supplied in the
252 commercial kit was applied on each sample, for 30 minutes, in a humidity chamber at room
253 temperature. After that time, they were washed in PBS (3 times for 5 minutes each), followed
254 by the application of streptavidin-peroxidase conjugate for 15 minutes, in a humidity chamber
255 and at room temperature. The glass slides were washed in PBS (3 times for 5 minutes each),
256 and were submitted to processing with substrate-chromogen (DAB) for 5 minutes. Then, they
257 were counter-stained with iron hematoxylin for 1 minute, and washed in running water for 5
258 minutes, then dehydrated in alcohol graduations (70%, 85%, and 100%), clarified in xylol and
259 mounted and covered with glass slides, using a non-aqueous mounting medium (balm from
260 Canada). The glass slides were analyzed for obtaining immunomarking semi-quantitative score
261 for Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF- β 1) by using Image J program, developed by The
262 *National Institute of Health (NIH) - USA*.

263 TGF- β is an immune system-regulating cytokine. It functions upon chemotaxis
264 regulation, lymphocytes, macrophages and granulocytes activation and maintenance. There are
265 three TGF- β isoforms in mammals: TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3. The first one is the
266 predominant isoform. TGF- β controls start and ending of inflammatory response by regulating
267 chemotaxis, maintaining lymphocytes, defense cells, macrophages and granulocytes.²⁸

268 TGF- β -1 was used, which may be used as an indirect measurement of damage and
269 immune change triggered by ANFH.²⁹⁻³¹ TGF- β 1 is involved in bone regeneration, and
270 represents a promising approach also for treatment or treatment analysis.³⁰

271

272

273

274 *Statistical analysis*

275 The descriptions included, for categorical variables: frequency calculation and respective
276 percentage; and for scalar variables: calculation of average and respective standard deviation,
277 maximum, minimum and percentiles (25%, 50% (median) and 75%).

278 TGF- β 1 immunoexpression results were compared by twos, i.e., right side against left
279 side, on the timepoints established. The test used was the Student's T test, significance level
280 0.050.

281

282 **RESULTS**

283 There was one death by sepsis on the second day, in group A, and the dead animal was
284 replaced, totaling 11 animals in the experiment.

285 Concerning gait assessment, all piglets in group A had claudication (grade 2 from Etterlin
286 et al.²⁴). It was observed that, in the gait swing phase, piglets could not raise the right foot from
287 the floor, dragging it due to reduced right hip mobility. They had moderate claudication with
288 clear deambulation difficulty. In group B, piglets had normal gait (Grade 0 from Etterlin et
289 al.²⁴), with no claudication (Supplementary Material 2).

290 On the DR, CT scan (Fig. 8-11 and Table 1) and macroscopic assessment of anatomical
291 pieces, in group A (Figs. 13-16 and Table 2), all right FH showed changes typical to ANFH. In
292 group B, no changes are observed (Fig. 12 and Tables 1 and 2).

293 In group A, all piglets had right FH epiphysis height and EC values lower than those of
294 the left FH. In this group, the right femoral epiphysis width was higher than those of the left in
295 7 piglets (87.5%). In group B, no differences were observed for measurements between sides
296 (Table 3).

297 No right ANFH was developed in group B, and as a result, EC values were kept equal for
298 both sides. That fact supports that the necrosis inducing factor is RFN cerclage.

299 In histological assessment by LM, in group A, on right FH chondrocytes occurred, in a
300 disordered manner and separated by gaps. There was no clear separation between physis layers.
301 On left FH, a normal aspect was observed, i.e., chondrocytes aligned into columns and visible
302 division between physis layers: proliferative, hypertrophic and calcifying zones. In group B,
303 the same normal aspect as previously described for right and left FH, was observed (Fig. 17).

304 In the immunohistochemical reaction assessment in group A, reduced expression of TGF-
305 β 1 expression was observed in right FH slides, at 2 and 6 weeks of ischemia, and on left FH at
306 eight weeks ischemia.

307 In group B, there was no difference in TGF- β 1 expression between right and left FH (Fig.
308 18).

309

310 DISCUSSION

311 The suggested animal model featuring frozen bone pieces study and posterior surgical
312 approach provided ischemia and necrosis results on DR, CT scan, macroscopy and histology,
313 which could also be studied for limb functional changes, by means of gait studying.

314 An important technical point established in that study was posterior surgical approach,
315 which facilitated the procedure, as four-legged animals have limited abduction, making anterior
316 approach difficult. In all surgeries, upon dissection, the presence of a still tight cerclage was
317 observed on the right femoral neck, confirming it as a necrosis-inducing factor.

318 Although magnetic resonance imaging^{10,11,14} is the most sensitive test for diagnosing
319 ANFH,¹³ CT scan^{9,10,25,32} and DR^{11-13,16,19,33-35} showed the same changes, and that could be
320 observed in this study with frozen pieces: decreased and increased, respectively, height and
321 width of the femoral epiphysis, FH flattening, collapse and fragmentation. In addition, their
322 cost is lower.

323 The use of more sensitive image scans for ANFH diagnosis, such as CT scan and MRI,
324 is limited by the very few facilities available for animals, and by the forbidden use for animals
325 in human laboratories. Therefore, it was required to dissect femurs for using those services.
326 Magnetic resonance imaging use in dissected femurs is more difficult, as it requires the presence
327 of soft tissues, i.e., the whole animal should be examined and anesthetized. DR and CT scan,
328 on the other hand, could be performed for dissected bones.

329 Thus, femurs were dissected and frozen, and the image scans were performed as a
330 donation from an associate laboratory and subject to service availability.

331 It has been observed that this storage method may reduce costs, does not affect tests
332 quality and also enables its performance on a scheduled date, subject to service availability.
333 This feature allows using DR and CT scan even when they are not at your service.

334 Kim, Su and Qiu, 2001,¹² performed 3 mm thick front sections radiographies, with the
335 use of a diamond saw, for better image definition. We do not have the material required for
336 performing millimetric slicing, so the whole FH was radiographed. Nevertheless, FH necrosis
337 signs were observed at only two weeks from RFN cerclage; and after six weeks, FH
338 fragmentation and collapse were observed, as in the above authors. Additionally, 3D CT scan
339 also enabled viewing injuries in further details, and it was also observed that freezing did not
340 impair the method.

341 Freezing did not affect LM results either. Gaps occurred, separating disordered
342 chondrocytes, losing their alignment into columns, with no clear identification of proliferative,
343 hypertrophic and calcifying zones, thus characterizing necrosis areas.

344 Right femoral heads EC in group A were lower than the contralateral side, showing FH
345 flattening by necrosis, and the lower the EC, the greater the deformity and worse the
346 prognosis.^{17,25-27} However, the greater deformity was observed at six weeks ischemia, not eight.
347 A possible explanation would be that, in general, on LCPD, the longer the progress time, the

348 worse the FH deformity, with FH collapse varying directly with the amount of weight over the
349 joint.

350 Kim et al.²⁵ showed, in a porcine model, that the weight load over the hip worsens disease
351 prognosis. Our piglets were lodged with free movement, thus, the amount of load in the
352 ischemic limb depended on the voluntary activity amount of each guinea pig. A higher activity
353 degree in the piglet with 6 weeks ischemia could justify the greater deformity. Also Etterlin et
354 al.,²⁴ by assessing the gait of piglets with arthrosis, observed that more active piglets had a better
355 gait pattern than the inactive ones, even when having severe changes in joints, due to more
356 developed muscles by exercising. Therefore, a more active guinea pig deambulates more,
357 imposes more load on the joint, thus deforming FH more heavily.

358 Another hypothesis would be the femoral heads at eight weeks ischemia had developed
359 neocirculation, however, that is unlikely, as during ANFH repair process, secondary accessory
360 ossification nuclei appeared, which promoted disordered and irregular growth providing the
361 fragmentation aspect on radiographies.¹² Maybe a longer study time, with controlled movement
362 and a higher number of guinea pigs could help explaining those findings.

363 ANFH progresses into arthrosis, causing functional damage in that joint¹ and, as a result,
364 claudication. There are no experimental models using gait functional assessment in LCPD
365 studies. In this study, it was possible to study gait and find very clear changes, with no need of
366 sophisticated instruments that could make the functional assessment difficult. Santangelo et
367 al.,³⁶ 2014, used a swine breed from Guinea, which spontaneously develop knee arthrosis, in
368 order to test flunixin meglumine effects. The authors used a computerized gait platform and
369 observed improvement in the gait pattern of animals using the medication.

370 Thus, a porcine experimental model featuring effective gait functional assessment and
371 with low cost, may be an opportunity to test new drugs for ANFH, making it possible to

372 associate treatment effects from morphological and biochemical tests to clinical functional
373 changes in gait.

374 The surgical technique was that described by Kim, Su and Qiu, 2001,¹² when those
375 authors were four times unsuccessful with 18 piglets. One piglet developed septic arthritis, and
376 three did not develop necrosis due to surgical technique failure upon cerclage. In our experiment
377 with 11 piglets, there was only one death by sepsis on initial post-surgery, and the ischemia
378 process was successful for all guinea pigs. There is no in-depth demonstration of the clinical
379 steps in the literature, having images with enough detail, or a systematization that could ensure
380 more success.

381 It is believed that our result may be justified by surgeries performed by a same
382 experienced surgeon, specialized in hip surgery. Although our operating room was simple,
383 having only minimal conditions, it was observed that those structural conditions were not
384 limiting. In addition, the main factor for procedure success was considered to be technical
385 knowledge.

386 Our opinion is that it is necessary to have a thorough knowledge of regional anatomy and
387 surgical technique, and it is fundamental to perform training in corpses, to gain qualification,
388 and to study piglets anatomy. Pre-surgery assessment and confinement, as well as post-surgical
389 veterinary care may also prevent losses.

390 Tao et al.,³¹ 2017, observed a decrease in TGF- β 1 expression in femoral heads presenting
391 with avascular necrosis removed from patients submitted to total hip replacement for that
392 reason.

393 This study did not show reduced TGF- β 1 expression in all right femoral heads in group
394 A, even though ANHF macroscopic, microscopic changes, radiographic and clinical signs have
395 been identified. This finding may be related to the small number of slides performed, limited
396 by the fact that the piece was required for other tests. The suggestion for a next experiment is

397 allocating half the sectioned FH for immunohistochemical testing, and the other half to
398 macroscopic and histologic analysis. Thus, it would be possible to use larger fragments with a
399 higher amount of bone tissue. A larger number of guinea pigs will enable more accurate
400 conclusions.

401 The experimental model described and performed with a simple structure showed
402 ischemia changes in image, gait and histomorphology tests, except for TGF- β 1
403 immunohistochemical analysis. Femurs freezing enables performing DR and CT scan in human
404 laboratories at a scheduled date and not affecting the ischemia diagnosis by image scan. This
405 resource allows investigators to preserve the anatomical piece until it is possible to perform the
406 tests. Nevertheless, immunohistochemical analysis did not show consistent results that could
407 be explained by our methodology.

408 The gait assessment showed a good correlation to the other ischemia findings. It may be
409 used as a new parameter, correlated to other biochemical and image scans.

410

411 ACKNOWLEDGMENTS

412 Guinea pigs purchase, procedures, admission, and medication costs were borne by the authors.
413 We thank Dr. [Blinded] and Dr. [Blinded], radiologists at [Blinded], in [Blinded], for
414 performing the image scans for free. Our thanks to [Blinded] Histology Laboratory for donating
415 the histological tests. We thank Prof. Dr. [Blinded] of the [Blinded] Tumors Biology
416 Laboratory, for donating the immunohistochemistry tests. Our thanks to professors [Blinded]
417 for guidance throughout the preparation of this paper.

418

419 CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURE

420 All authors declared that there is no conflict of interest.

421

422 REFERENCES

- 423 1. Koob TJ, Pringle D, Gedbaw F, et al. 2007. Biomechanical properties of bone and
424 cartilage in growing femoral head following avascular osteonecrosis. *J Orthop Res*
425 25:750-757.
- 426 2. Aigner N, Schneider W, Eberl V, Knahr K. 2002. Core decompression in early stages of
427 femoral head osteonecrosis: an MRI controlled study. *Int Orthop* 26:31-35.
- 428 3. Guarniero R. 2011. Legg-Calvé-Perthes disease: 100 years. *Rev Bras Ortop* 46:1-2.
- 429 4. Boss JH, Misselevich I. 2003. Osteonecrosis of femoral head of laboratory animals: the
430 lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man and experimental
431 animals. *Vet Pathol* 40:345-354.
- 432 5. Dailiana ZH, Stefanou N, Khaldi L, et al. 2018. Vascular endothelial growth factor for
433 the treatment of femoral head osteonecrosis: an experimental study in canines. *World J*
434 *Orthop* 9:120-129.
- 435 6. Komiyama T, Nishida K, Yorimitsu M, et al. 2006. Decreased levels of insulin-like
436 growth factor-1 and vascular endothelial growth factor relevant to the ossification
437 disturbance in femoral heads spontaneous hypertensive rats. *Acta Med Okayama* 60:141-
438 148.
- 439 7. Xu T, Jin H, Lao Y, et al. 2017. Administration of erythropoietin prevents bone loss in
440 osteonecrosis of the femoral head in mice. *Mol Med Rep* 16:8755-8762.
- 441 8. Kothapalli R, Aya-ay JP, Bian H, et al. 2007. Ischaemic injury to femoral head induces
442 apoptotic and oncotoc cell death. *Pathology* 39:241-246.
- 443 9. Zhang P, Liang Y, Kim H, Yokota H. 2010. Evaluation of a pig femoral head
444 osteonecrosis model. *J Orthop Surg Res* 5:15.

- 445 10. Wang G, Zhang CQ, Sun Y, et al. 2010. Changes in femoral head blood supply and
446 vascular endothelial growth factor in rabbits with steroid-induced osteonecrosis. *J Int*
447 *Med Res* 38:1060-1069.
- 448 11. Dello Russo B, Baroni EL, Saravia N, et al. 2012. Prevention of femoral head deformity
449 after avascular necrosis using ibandronate acid and growth factor in immature pigs. *Surg*
450 *Sci* 3:194-199.
- 451 12. Kim HK, Su PH, Qiu YS. 2001. Histopathologic changes in growth-plate cartilage
452 following avascular necrosis of the capital femoral epiphysis: an experimental
453 investigation in immature pigs. *J Bone Joint Surg Am* 83:688-697.
- 454 13. Kim HK, Skelton DN, Quigley EJ. 2004. Pathogenesis of metaphyseal radiolucent
455 changes following avascular necrosis of the capital femoral epiphysis in immature pigs:
456 a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 86:129-135.
- 457 14. Shapiro F, Connolly S, Zurakowski D, et al. 2009. Femoral head deformation and repair
458 following induction of ischemic necrosis. *J Bone Joint Surg Am* 91:2903-2914.
- 459 15. Adapala NS, Kim HKW. 2016. Comprehensive genome-wide transcriptomic analysis of
460 immature articular cartilage following ischemic osteonecrosis of the femoral head in
461 piglets. *PLoS One* 11:e0153174.
- 462 16. Rowe SM, Lee JJ, Chung JY, et al. 2006. Deformity of the femoral head following
463 vascular infarct in piglets. *Acta Orthop* 77:33-38.
- 464 17. Kong SY, Kim HW, Park H-W, et al. 2011. Effects of multiple drilling on the ischemic
465 capital femoral epiphysis of immature piglets. *Yonsei Med J* 52:809-817.
- 466 18. Kim HKW, Stephenson N, Garces A, et al. 2009. Effects of disruption of epiphyseal
467 vasculature on the proximal femoral growth plate. *J Bone Joint Surg Am* 91:1149-1158.

- 468 19. Rowe SM, Kim MS, Moon ES, et al. 2005. Developmental pattern of femoral shortening
469 following devascularization of the capital femoral epiphysis in piglets. *J Pediatr Orthop*
470 25:300-304.
- 471 20. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, et al. 2010. Improving bioscience research reporting:
472 the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8:e1000412.
- 473 21. Fitts DA. 2011. Ethics and animal numbers: informal analysis, uncertain sample sizes,
474 inefficient replications and type I errors. *Am Assoc Lab Anim Sci* 50:445-453.
- 475 22. Tachdjian MO. 1994. *Pediatric Orthopaedics*, 2nd ed. México: Nueva Editorial
476 Interamericana; p. 1008.
- 477 23. Hoppenfeld S. 2008. Examination of gait. In: Hoppenfeld S. *Orthopedic propaedeutics:*
478 *spine and extremities*. São Paulo: Atheneu; p 139-148.
- 479 24. Etterlin PE, Morrison DA, Österberg J, et al. 2015. Osteochondrosis, but not lameness, is
480 more frequent among free-range pigs than confined herd-mates. *Acta Vet Scand* 57:63.
- 481 25. Kim HKW, Aruwajoye OO, Stetler J, Stall A. 2012. Effects of non-weight-bearing on the
482 immature femoral head following ischemic osteonecrosis. *J Bone Joint Surg Am* 94:
483 2228-2237.
- 484 26. Laredo Filho J, Ishida A, Lourenço AF, et al. 1993. Radiographic evaluation of the
485 acetabular coverage of the femoral head in patients with unilateral Legg-Calvé-Perthes
486 disease submitted to Salter osteotomy. *Rev Bras Ortop* 28:299-303.
- 487 27. Luzo CAM, Guarniero R, Montenegro NB, Godoy Jr RM. 2016. Initial experience of use
488 of an articulated external fixator in treating Legg-Calvé-Perthes disease by means of
489 arthrodiastasis during the active phase of the disease *Rev Bras Ortop* 51:337-345.
- 490 28. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, et al. 2006. Transforming growth factor- β regulation of
491 immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146.

- 492 29. Zhang XL, Shi KQ, Jia PT, et al. 2018. Effects of platelet-rich plasma on angiogenesis
493 and osteogenesis-associated factors in rabbits with avascular necrosis of the femoral head.
494 *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 22:2143-2152.
- 495 30. Rackwitz L, Eden L, Reppenhagen S, et al. 2012. Stem cell- and growth factor based-
496 regenerative therapies for avascular necrosis of the femoral head. *Stem Cell Res Ther* 3:7.
- 497 31. Tao J, Dong B, Yang LX, et al. 2017. TGF- β 1 expression in adults with non-traumatic
498 osteonecrosis of the femoral head. *Mol Med Rep* 16:9539-9544.
- 499 32. Terayama H, Ishikawa M, Yasunaga Y, et al. 2011. Prevention of osteonecrosis by
500 intravenous administration of human peripheral blood-derived CD34-positive cells in a
501 rat osteonecrosis model. *J Tissue Eng Regen Med* 5:32-40.
- 502 33. Boss JH, Misselevich I, Bejar J, et al. 2004. Experimentally gained insight - based
503 proposal apropos the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *Med Hypotheses*
504 62:958-965.
- 505 34. Kim HK, Randall TS, Bian H, et al. 2005. Ibandronate for prevention of femoral head
506 deformity after avascular necrosis of the capital femoral epiphysis in immature pigs. *J*
507 *Bone Joint Surg Am* 87:550-557.
- 508 35. Peng J, Wen C, Wang A, et al. 2011. Micro CT based bone ceramic scaffolding and its
509 performance after seeding with mesenchymal stem cells for repair of load bearing bone
510 defect in canine femoral head. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 96:316-325.
- 511 36. Santangelo KS, Kaeding AC, Baker SA, Bertone AL. 2014. Quantitative gait analysis
512 detects significant differences in movement between osteoarthritic and nonosteoarthritic
513 guinea pig strains before and after treatment with flunixin meglumine. *Arthritis* 503519
514 [Epub 2014 May 19].

515 **FIGURE LEGENDS**

516

517 **Figure 1.** Description of piglet positioning on the operating table. The piglet was
518 positioned on left lateral decubitus on the operation table.

519

520 **Figure 2.** Description of the parameters of the surgical approach. Longitudinal approach
521 is indicated by the black arrow. The femur great trochanter apex is indicated by the white
522 arrow.

523

524 **Figure 3.** Surgical approach. Deep planes. Gluteus Medius muscle was spread with
525 Farabeuf (larger white arrow). A capsulotomy was performed (larger black arrow). The
526 round ligament was isolated to be sectioned (smaller black arrow). FH was identified
527 (smaller white arrow).

528

529 **Figure 4.** Description of wire passing for cerclage. 4.a – “Wire passer” instrument. 4.b -
530 *Prolene 2 Ethicon*® suture passing (white arrow), with the use of the “wire passer” (black
531 arrow).

532

533 **Figure 5.** Cerclage over the right femur neck. Cerclage description. *Prolene 2 Ethicon*®
534 suture tying for double cerclage around the femur neck.

535

536 **Figure 6.** FH description for immature piglet. Frontal section of the normal FH at the
537 mean point. Immature piglet FH has an EC surrounded by EC. GP is located between EC
538 and EC. MF is located on the EC basis. Metaphysis (M) of the femur proximal portion is
539 located under the MF.

540 **Figure 7.** Description of H, W and EC. Epiphysis height is represented by the closed
541 arrow (A). Epiphysis width (W) is represented by the dotted arrow. EC is calculated by
542 the ratio between H and W.

543

544 **Figure 8.** DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left
545 femurs after 2 weeks from ischemic induction. Discrete FH flattening visible in DR,
546 coronal CT scan and 3D CT. Presence of several sclerotic areas on right FH, suggesting
547 osteonecrosis, visible on coronal CT scan and axial CT scan (white arrows). Right femoral
548 neck widening visible on coronal CT scan (black arrows).

549

550 **Figure 9.** DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left
551 femurs after 4 weeks from ischemic induction. On DR and coronal CT scan, axial CT
552 scan and 3D CT, a loss of semi-spherical shape on the right FH was observed, as well as
553 depression areas on the joint surface (arrows).

554

555 **Figure 10.** DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left
556 femurs after 6 weeks from ischemic induction. Right FH total collapse and fragmentation
557 was observed on DR and CT scan, with loss of semi-spherical shape. A big enlargement
558 of femoral neck was observed (arrows). Collapse and fragmentation were detailed on 3D
559 CT scan.

560

561 **Figure 11.** DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left
562 femurs after 8 weeks from ischemic induction. On DR and CT scan, a loss of semi-
563 spherical shape and right FH flattening were observed, as well as sclerotic areas
564 suggesting femur head necrosis (arrows).

565 **Figure 12.** DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left
566 femurs in Group B. Right FH do not show any difference when compared to the control
567 left FH, with no radiographic signs of ANFH, kept semi-spherical, with no depression
568 and sclerosis areas.

569

570 **Figure 13.** Pictures of sacrificed piglet FH after 2 weeks ischemia. A RFN widening was
571 observed (a<b). The black arrow indicates cerclage over RFN.

572

573 **Figure 14.** Pictures of sacrificed piglet FH after 4 weeks ischemia. Head flattening and
574 RFN widening were observed. The arrow indicates cerclage over RFN.

575

576 **Figure 15.** Picture of sacrificed piglet FH frontal section after 6 weeks ischemia. The
577 right FH shows shorter H and large W than the left control side. Right FH EC is deformed
578 and reduced. Loss of EC shape is observed.

579

580 **Figure 16.** Picture of sacrificed piglet FH frontal section after 8 weeks ischemia. The
581 right FH is thicker than the left side FH.

582

583 **Figure 17.** Picture of sacrificed piglet's femurs growth plates 6 weeks post-surgery.
584 Photomicrography at 100 times magnification of sacrificed piglets femurs growth plates
585 6 weeks post-surgery. Figure 17.a: in GA, on right FH GP, the presence of chondrocytes
586 grouped in disorganized way (white arrow) and separated by large empty gaps was
587 identified. Figure 17.b: on left FH GP (control), chondrocytes were observed as aligned
588 into parallel-arranged columns (red arrow). Proliferative, hypertrophic and calcifying
589 zones are clearly divided and visible. The presence of vascular proliferation was observed

590 on the calcifying zone (black arrows). Figures 17.c and 17.d: in GB, right and left FH
591 growth plates do not show differences. Normal aspect, showing clearly identified
592 proliferation, hypertrophic and calcifying zones and chondrocytes aligned into columns
593 (red arrows).

594

595 **Figure 18.** Description of TGF- β 1 expression on FH, according to ischemia time.
596 Columns indicate TGF- β 1 expression. CE: left FH from group B. CD: right FH from
597 group B. 2SE: left FH from piglets sacrificed at 2 weeks. 2SD: right FH from piglets
598 sacrificed at 2 weeks. 4SE: left FH from piglets sacrificed at 4 weeks. 4SD: right FH from
599 piglets sacrificed at 4 weeks. 6SE: left FH from piglets sacrificed at 6 weeks. 6SD: right
600 FH from piglets sacrificed at 6 weeks. 8SE: left FH from piglets sacrificed at 8 weeks.
601 8SD: right FH from piglets sacrificed at 8 weeks.

602

603 SUPPLEMENTARY MATERIALS LEGENDS

604

605 **Supplementary Material 1** – Cerclage passing on right femoral neck.

606

607 **Supplementary Material 2** – Gait with claudication. The piglet drags its right back paw.

The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkeny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

	ITEM	RECOMMENDATION	Section/ Paragraph
Title	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	Title - line 1
Abstract	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	Abstract - lines 71 - 88
INTRODUCTION			
Background	3	<p>a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale.</p> <p>b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.</p>	References - line 420 8,9,11-19,25, 34
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	Objectives lines 105-111
METHODS			
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	Lines 112 -114
Study design	6	<p>For each experiment, give brief details of the study design including:</p> <p>a. The number of experimental and control groups.</p> <p>b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when).</p> <p>c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals).</p> <p>A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.</p>	Lines 117 -147
Experimental procedures	7	<p>For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example:</p> <p>a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s).</p> <p>b. When (e.g. time of day).</p> <p>c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze).</p> <p>d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).</p>	Lines 150 - 176
Experimental animals	8	<p>a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range).</p> <p>b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naive, previous procedures, etc.</p>	Lines 140 - 144

The ARRIVE guidelines. Originally published in *PLoS Biology*, June 2010¹

Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.	Lines 150 - 176
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	Lines 126 - 147
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	Lines 126 - 139
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	Lines 277 - 292 +
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	Lines 269 - 274
RESULTS			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	Lines 277 - 303
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50%). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.	Lines 284 - 286
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	Lines 284 - 298 +
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	Lines 299 - 303
DISCUSSION			
Interpretation/scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results. c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.	Lines 306 - 396
Generalisability/translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	Lines 397 - 405
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	408 - 414



References:

1. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(8): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
2. Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:c332. John Wiley & Sons, Inc.

Table 1. Description of changes found on right FH on DR and CT scan in timepoints established in groups A and B.

Group A	Digital Radiography	Coronal and Axial CT scan	3D CT scan
2 weeks	- Discrete FH flattening	- Discrete FH flattening - Presence of sclerotic areas, suggesting ANFH - RFN widening	- Discrete FH flattening
4 weeks	- Loss of right FH semi-spherical shape and presence of joint surface depression	- Loss of right FH semi-spherical shape and presence of joint surface depression	- Loss of right FH semi-spherical shape and presence of joint surface depression
6 weeks	- Right FH total collapse and fragmentation with loss of semi-spherical shape and large femoral neck widening	- Right FH total collapse and fragmentation with loss of semi-spherical shape and large femoral neck widening	- Right FH total collapse and fragmentation with loss of semi-spherical shape and large femoral neck widening
8 weeks	- Loss of semi-spherical shape and flattening for the	- Loss of semi-spherical shape and flattening for the right	- Loss of semi-spherical shape and flattening for the

	right FH. Sclerotic areas suggesting ANFH	FH. Sclerotic areas suggesting ANFH	flattening for the right FH.
Group B	Digital Radiography	Coronal and Axial CT scan	3D CT scan
6 weeks	No change	No change	No change

CT: computerized tomography; FH: femoral head; ANFH: avascular necrosis of the femoral head; RFN: right femoral neck

Table 2. Descriptions of changes found on right FH on the macroscopic analysis of anatomical pieces from groups A and B.

Group A	Macroscopic analysis
2 weeks	RFN widening
4 weeks	FH flattening and RFN widening
6 weeks	Total FH collapse and RFN widening. Increased EC thickness
8 weeks	FH flattening. Increased EC thickness
Group B	Macroscopic analysis
6 weeks	No changes

RFN: right femoral neck; FH: femoral head; EC: epiphyseal cartilage

Table 3. Description of epiphysis height and width measurements. FH epiphyseal index and epiphyseal coefficient at timepoints after ischemia.

Group	Timepoint	Measurements	Piglet 1		Piglet 2	
			Side		Side	
			R	L	R	L
A	2 weeks	H	0.8	1.0	1.0	1.1
		W	1.7	1.6	1.6	1.6
		EC	0.5	0.6	0.6	0.7
	4 weeks	H	1.0	1.2	1.0	1.1
		W	1.9	1.8	2.0	1.9
		EC	0.5	0.7	0.5	0.6
	6 weeks	H	0.9	1.0	0.4	1.2
		W	2.0	1.9	1.9	1.8
		EC	0.4	0.5	0.2	0.7
	8 weeks	H	0.9	1.1	1.0	1.2
		W	2.2	1.9	2.3	2.1
		EC	0.4	0.6	0.4	0.6
B	6 weeks	H	1.0	1.0	1.0	1.0
		W	1.9	1.9	1.9	1.9
		EC	0.5	0.5	0.5	0.5

R: right; L: left; H: epiphysis height in cm.; W: epiphysis width in cm.; EC: epiphyseal coefficient.



Figure 1. Description of piglet positioning on the operating table. The piglet was positioned on left lateral decubitus on the operation table.

38x28mm (300 x 300 DPI)



Figure 2. Description of the parameters of the surgical approach. Longitudinal approach is indicated by the black arrow. The femur great trochanter apex is indicated by the white arrow.

38x32mm (300 x 300 DPI)

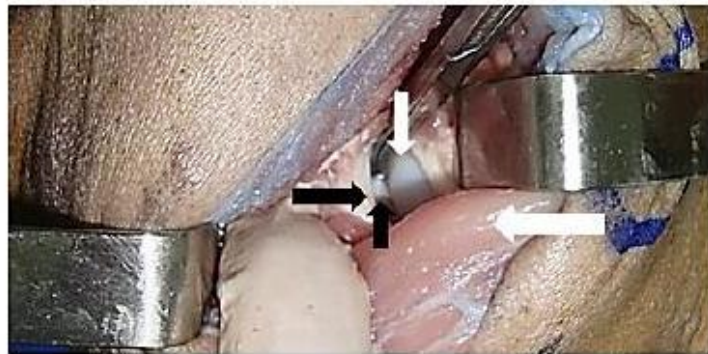


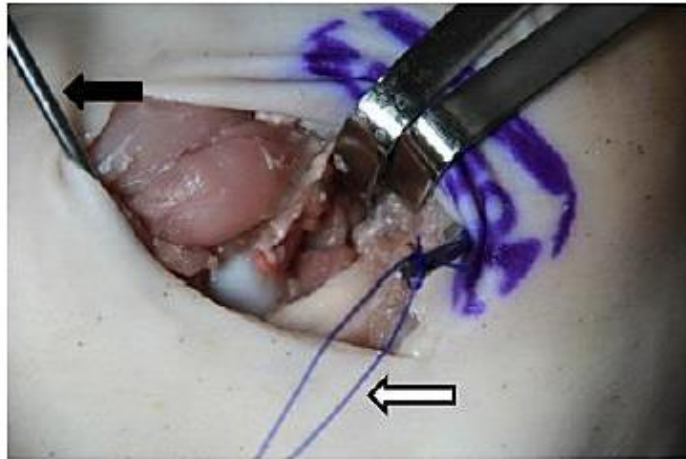
Figure 3. Surgical approach. Deep planes. Gluteus Medius muscle was spread with Farabeuf (larger white arrow). A capsulotomy was performed (larger black arrow). The round ligament was isolated to be sectioned (smaller black arrow). FH was identified (smaller white arrow).

37×18mm (300 × 300 DPI)



4.a – "Wire passer" instrument.

6x24mm (300 x 300 DPI)



4.b - Prolene 2 Ethicon® suture passing (white arrow), with the use of the "wire passer" (black arrow).
37x24mm (300 x 300 DPI)

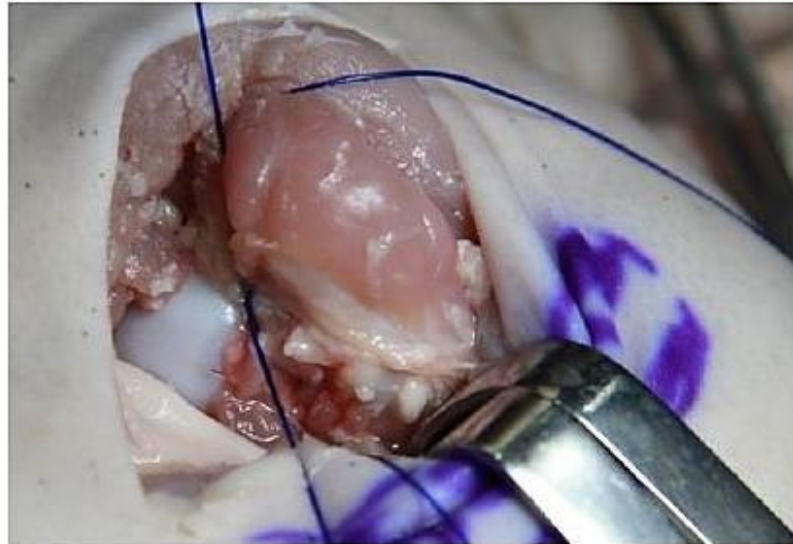


Figure 5. Cerclage over the right femur neck. Cerclage description. Prolene 2 Ethicon® suture tying for double cerclage around the femur neck.

44x30mm (300 x 300 DPI)

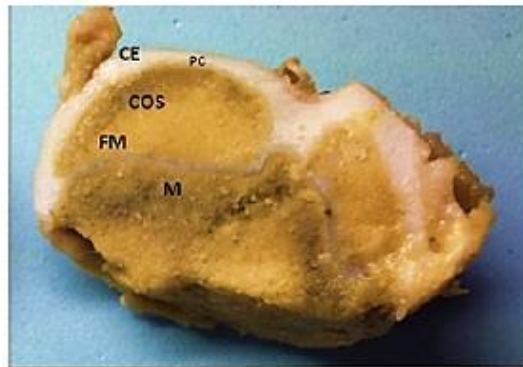


Figure 6. FH description for immature piglet. Frontal section of the normal FH at the mean point. Immature piglet FH has an EC surrounded by EC. GP is located between EC and EC. MF is located on the EC basis. Metaphysis (M) of the femur proximal portion is located under the MF.

28x19mm (300 x 300 DPI)

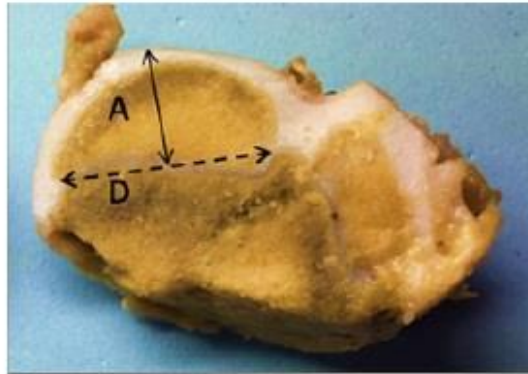


Figure 7. Description of H, W and EC. Epiphysis height is represented by the closed arrow (A). Epiphysis width (W) is represented by the dotted arrow. EC is calculated by the ratio between H and W.

28x19mm (300 x 300 DPI)

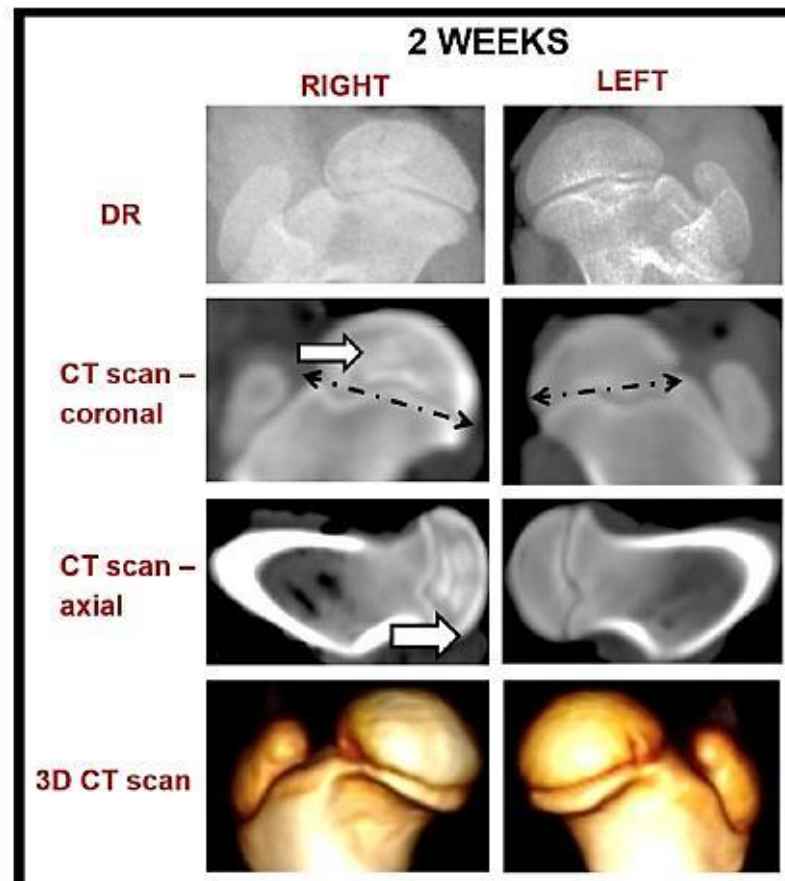


Figure 8. DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left femurs after 2 weeks from ischemic induction. Discrete FH flattening visible in DR, coronal CT scan and 3D CT. Presence of several sclerotic areas on right FH, suggesting osteonecrosis, visible on coronal CT scan and axial CT scan (white arrows). Right femoral neck widening visible on coronal CT scan (black arrows).

57×64mm (300 × 300 DPI)

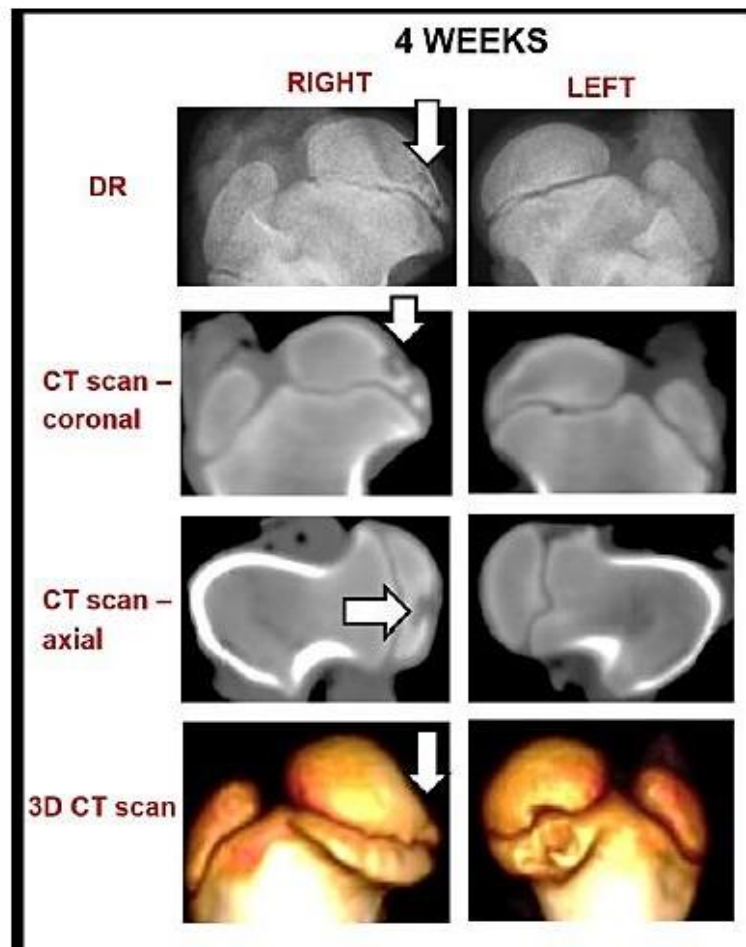


Figure 9. DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left femurs after 4 weeks from ischemic induction. On DR and coronal CT scan, axial CT scan and 3D CT, a loss of semi-spherical shape on the right FH was observed, as well as depression areas on the joint surface (arrows).

57×72mm (300 × 300 DPI)

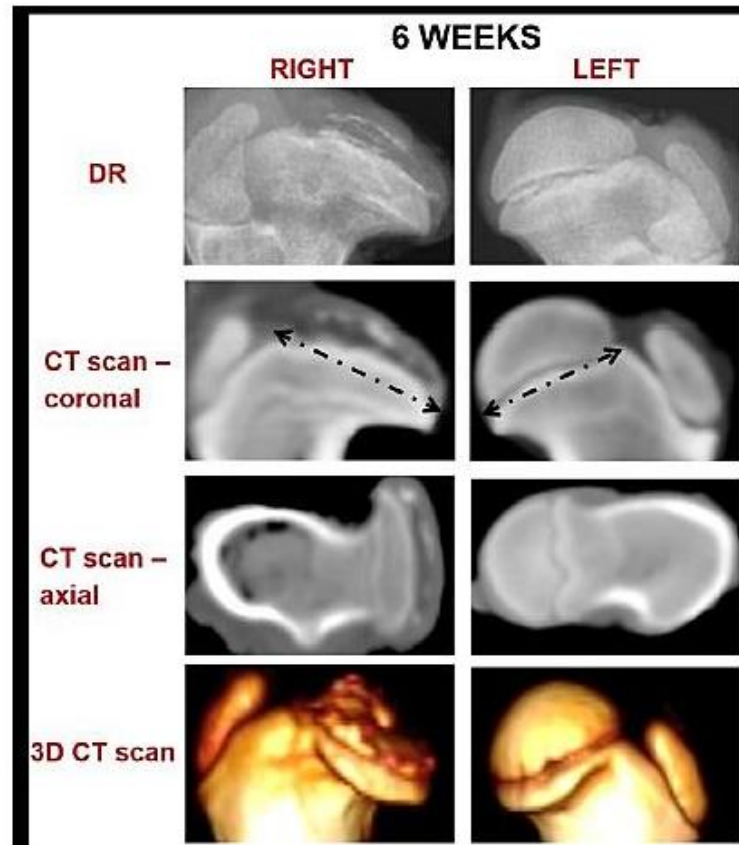


Figure 10. DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left femurs after 6 weeks from ischemic induction. Right FH total collapse and fragmentation was observed on DR and CT scan, with loss of semi-spherical shape. A big enlargement of femoral neck was observed (arrows). Collapse and fragmentation were detailed on 3D CT scan.

58x66mm (300 x 300 DPI)

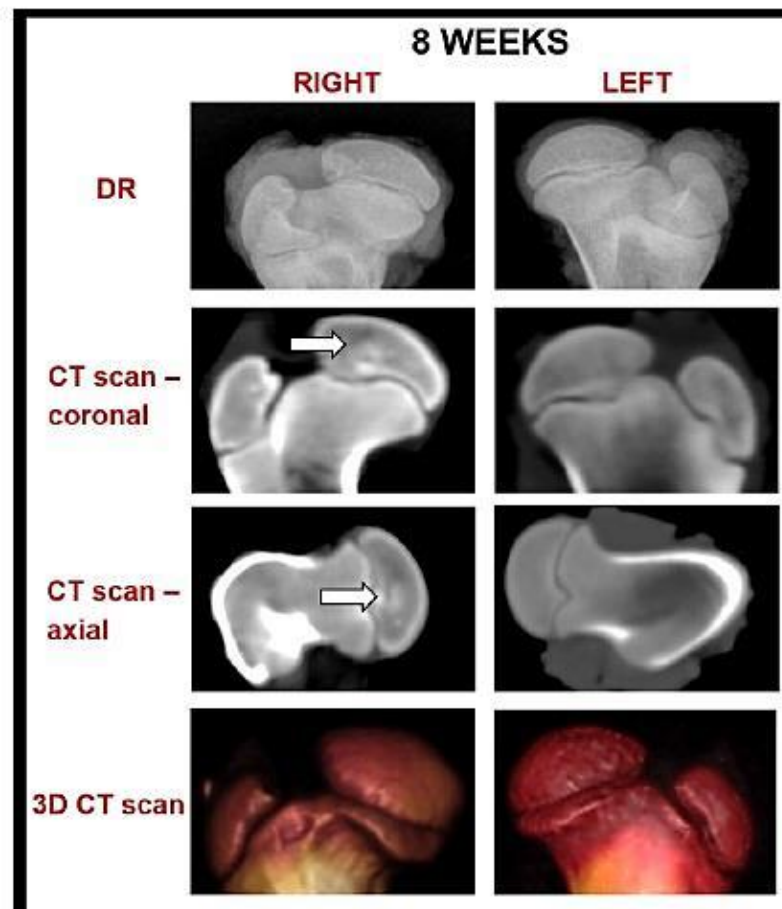


Figure 11. DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left femurs after 8 weeks from ischemic induction. On DR and CT scan, a loss of semi-spherical shape and right FH flattening were observed, as well as sclerotic areas suggesting femur head necrosis (arrows).

58x68mm (300 x 300 DPI)

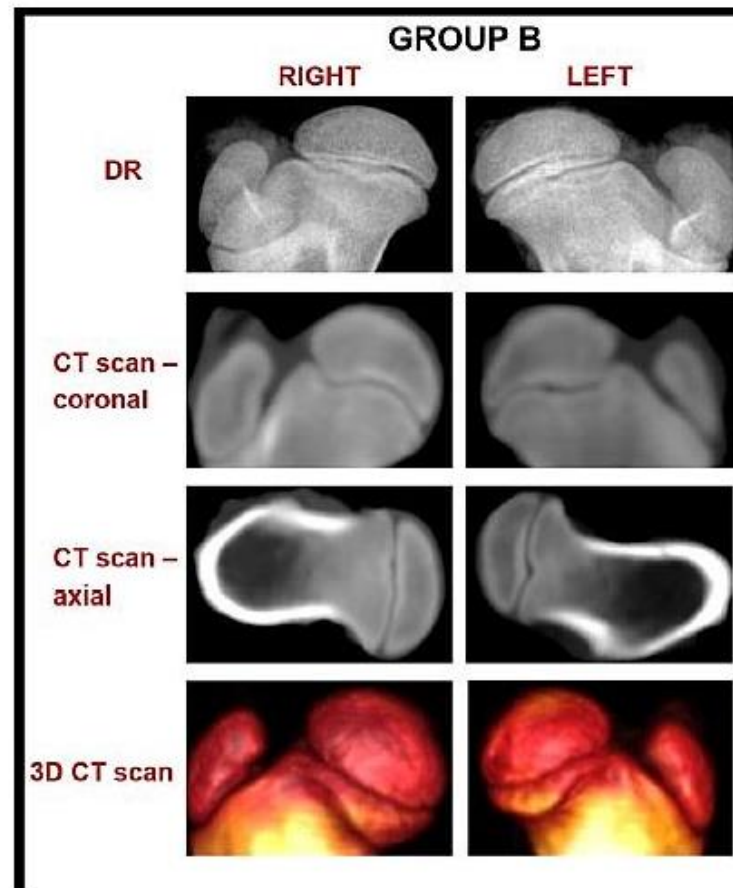


Figure 12. DR and CT scan for the proximal thirds of the sacrificed piglet right and left femurs in Group B. Right FH do not show any difference when compared to the control left FH, with no radiographic signs of ANFH, kept semi-spherical, with no depression and sclerosis areas.

58x70mm (300 x 300 DPI)

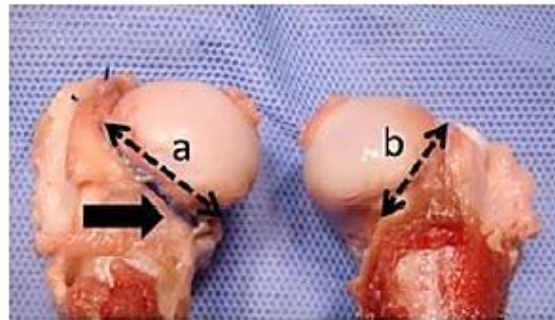


Figure 13. Pictures of sacrificed piglet FH after 2 weeks ischemia. A RFN widening was observed ($a < b$). The black arrow indicates cerclage over RFN.

30x17mm (300 x 300 DPI)

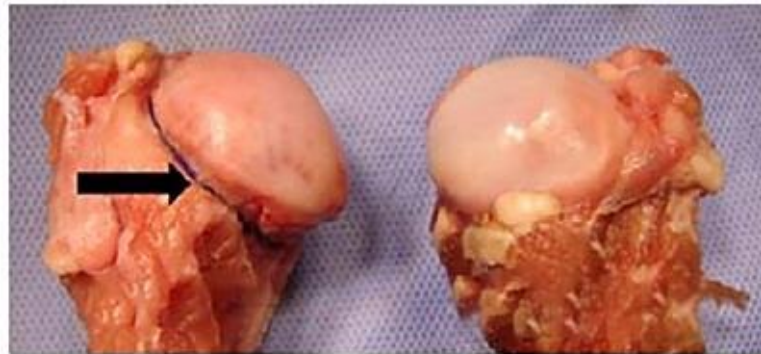


Figure 14. Pictures of sacrificed piglet FH after 4 weeks ischemia. Head flattening and RFN widening were observed. The arrow indicates cerclage over RFN.

40x18mm (300 x 300 DPI)

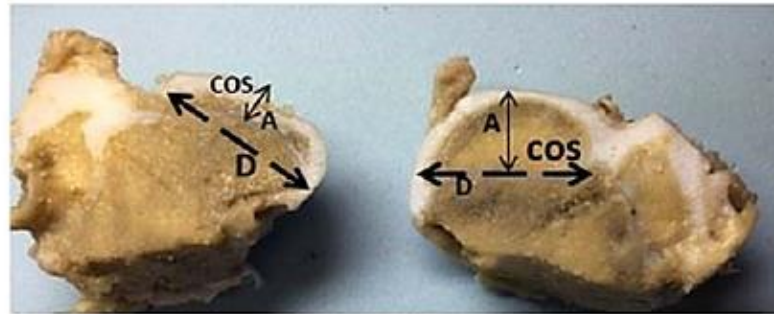


Figure 15. Picture of sacrificed piglet FH frontal section after 6 weeks ischemia. The right FH shows shorter H and large W than the left control side. Right FH EC is deformed and reduced. Loss of EC shape is observed.

44x18mm (300 x 300 DPI)



Figure 16. Picture of sacrificed piglet FH frontal section after 8 weeks ischemia. The right FH is thicker than the left side FH.

40x13mm (300 x 300 DPI)



Right femoral head

Figure 17.a: in GA, on right FH GP, the presence of chondrocytes grouped in disorganized way (white arrow) and separated by large empty gaps was identified.

26x23mm (300 x 300 DPI)

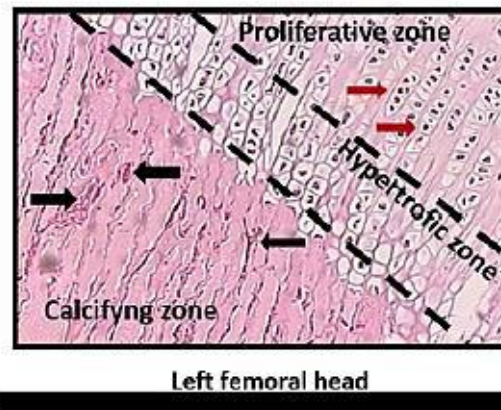


Figure 17.b: on left FH GP (control), chondrocytes were observed as aligned into parallel-arranged columns (red arrow). Proliferative, hypertrophic and calcifying zones are clearly divided and visible. The presence of vascular proliferation was observed on the calcifying zone (black arrows).

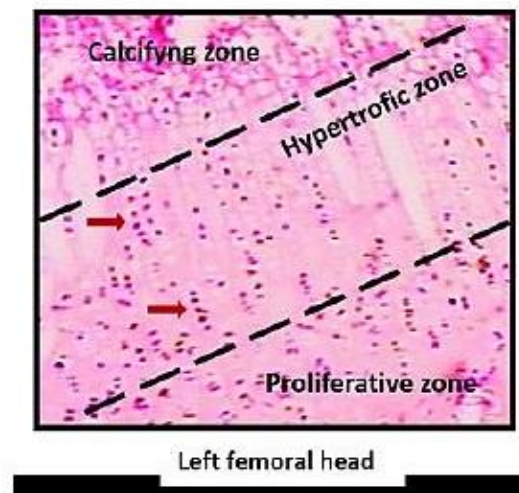
30x22mm (300 x 300 DPI)



Right femoral head

Figures 17.c and 17.d: in GB, right and left FH growth plates do not show differences. Normal aspect, showing clearly identified proliferation, hypertrophic and calcifying zones and chondrocytes aligned into columns (red arrows).

24×28mm (300 × 300 DPI)



Figures 17.c and 17.d: in GB, right and left FH growth plates do not show differences. Normal aspect, showing clearly identified proliferation, hypertrophic and calcifying zones and chondrocytes aligned into columns (red arrows).

28x27mm (300 x 300 DPI)

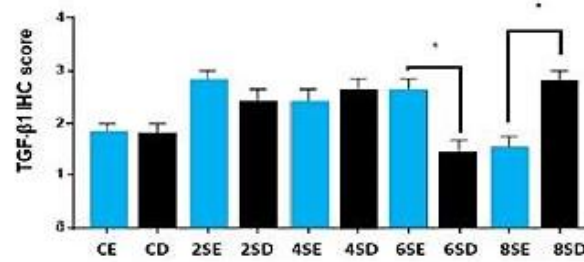


Figure 18. Description of TGF- β 1 expression on FH, according to ischemia time. Columns indicate TGF- β 1 expression. CE: left FH from group B. CD: right FH from group B. 2SE: left FH from piglets sacrificed at 2 weeks. 2SD: right FH from piglets sacrificed at 2 weeks. 4SE: left FH from piglets sacrificed at 4 weeks. 4SD: right FH from piglets sacrificed at 4 weeks. 6SE: left FH from piglets sacrificed at 6 weeks. 6SD: right FH from piglets sacrificed at 6 weeks. 8SE: left FH from piglets sacrificed at 8 weeks. 8SD: right FH from piglets sacrificed at 8 weeks.

59x35mm (300 x 300 DPI)

6 CONCLUSÕES

1 - As alterações da CF na DLCP foram reproduzidas na radiografia digital e tomografia computadorizada utilizando-se a CF congelada e inteira.

2 - A avaliação da marcha demonstrou boa correlação com as alterações macroscópicas e exames de imagem.

3 - As alterações da isquemia na placa de crescimento foram visibilizadas por microscopia de luz.

4 - Na análise imunohistoquímica não houve diminuição da expressão do TGF- β 1 em todas as cabeças femorais direitas com necrose isquêmica.

REFERÊNCIAS

1. Koob TJ, Pringle D, Gedbaw F, Meredith J, Berrios R, Kim HK. Biomechanical properties of bone and cartilage in growing femoral head following ischemic osteonecrosis. *J Orthop Res.* 2007 Jun;25(6):750-7.
2. Youm YS, Lee SY, Lee SH. Apoptosis in the osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop Surg.* 2010 Dec;2(4):250-5.
3. Ficat RP, Arlet J. Ischemia and necrosis of bone. Baltimore: Williams and Wilkins, 1980; p. 171-82.
4. Cui Q, Wang G-J, Su C-C, Balian G. The Otto Aufranc Award: Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1997 Nov;(344):8-19.
5. Pritchett JW. Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 May;(386):173-8.
6. Glueck CJ, Freiberg RA, Fontaine RN, Tracy T, Wang P. Hypofibrinolysis, thrombophilia, osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 May;(386):19-33.
7. Disch AC, Matziolis G, Perka C. The management of necrosis-associated and idiopathic bone-marrow oedema of the proximal femur by intravenous iloprost. *J Bone Joint Surg [Br].* 2005 Apr;87(4):560-4.
8. Meizer R, Radda C, Stolz G, Kotsaris S, Petje G, Krasny C, et al. MRI: controlled analysis of 104 patients with painful bone marrow edema in different joint localization treated with the prostacyclin analogue iloprost. *Wien Klin Wochenschr.* 2005 Apr;117(7-8):278-86.
9. Kim HK, Randall TS, Bian H, Jenkins J, Garces A, Bauss F. Ibandronate for prevention of femoral head deformity after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in immature pigs. *J Bone Joint Surg [Am].* 2005 Mar;87(3):550-7.
10. Agarwala S, Jain D, Joshi VR, Sule A. Efficacy of alendronate, a bisphosphonate, in the treatment of AVN of the hip: a prospective open-label study. *Rheumatology.* 2005 Mar;44(3):352-9.

11. Wang CJ, Wang FS, Huang CC, Yang KD, Weng LH, Huang HY. Treatment for osteonecrosis of the femoral head: comparison of extracorporeal shock waves with core decompression and bone-grafting. *J Bone Joint Surg [Am]*. 2005 Nov;87(11):2380-7.
12. Mont MA, Carbone JJ, Fairbank AC. Core decompression versus nonoperative management for osteonecrosis of the hip. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Mar;(324):169-78.
13. Aigner N, Schneider W, Eberl V, Knahr K. Core decompression in early stages of femoral head osteonecrosis: an MRI controlled study. *Int Orthop*. 2002;26(1):31-5.
14. Petrigliano FA, Lieberman JR. Osteonecrosis of the hip: novel approaches to evaluation and treatment. *Clin Orthop Relat Res*. 2007 Dec;(465):53-62.
15. Mont MA, Jones LC, Seyler TM, Marulanda GA, Saleh KJ, Delanois RE. New treatment approaches for osteonecrosis of the femoral head: an overview. *Instr Course Lect*. 2007;56:197-212.
16. Drescher W, Fürst M, Hahne HJ, Helfenstein A, Petersen W, Hassenpflug J. Survival analysis of hips treated with flexion osteotomy for femoral head necrosis. *J Bone Joint Surg [Br]*. 2003 Sep;85(7):969-74.
17. Mont MA, Seyler TM, Plate JF, Delanois RE, Parvizi J. Uncemented total hip arthroplasty in young adults with osteonecrosis of the femoral head: a comparative study. *J Bone Joint Surg [Am]*. 2006 Nov;88 (Suppl 3):104-9.
18. Legg A. An obscure affection of the hip joint. *Boston Med Surg J*. 1910;162:202-4.
19. Calvé J. [On a particular form of pseudo-coxalgia associated with a characteristic deformity of the upper end of the femur]. *Rev Chir*. 1910;42:54-84.
20. Perthes G. [Concerning arthritis deformans juvenilis]. *Deutsche Zeitschr Chir*. 1910;107:111-59.
21. Guarniero R. Doença de Legg-Calvé-Perthes: 100 anos. *Rev Bras Ortop*. 2011 jan-fev;46(1):1-2.

22. Tachdjian MO. Ortopedia pediátrica. 2a ed. Mexico: Nueva Editorial Interamericana; 1994: v.2, p.1008.
23. Trueta J. The normal vascular anatomy of the human femoral head during growth. J Bone Joint Surg [Br]. 1957 May;39(2):358-94.
24. Trueta J, Harrison MH. The normal vascular anatomy of the femoral in adult man. J Bone Joint Surg [Br]. 1953 Aug;35(3):442-61.
25. Salter RB, Thompson GH. Legg-Calvé-Perthes disease: the prognostic significance of the subchondral fracture and a two-group classification of the femoral head involvement. J Bone Joint Surg [Am]. 1984 Apr;66(4):479-89.
26. Salter RB, Kostuik J, Dallas S. Avascular necrosis of the femoral head as a complication of treatment for congenital dislocation of the hip in young children: a clinical and experimental investigation. Can J Surg. 1969 Jan;12(1):44-61.
27. Kim HK, Su PH, Qiu YS. Histopathologic changes in growth-plate cartilage following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis: an experimental investigation in immature pigs. J Bone Joint Surg [Am]. 2001 May;83(5):688-97.
28. Kim HK, Skelton DN, Quigley EJ. Pathogenesis of metaphyseal radiolucent changes following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in immature pigs: a preliminary report. J Bone Joint Surg [Am]. 2004 Jan;86(1):129-35.
29. Wild A, Westhoff B, Raab P, Krauspe R. Nonoperative treatment in Legg-Calvé-Perthes disease. Orthopade. 2003 Feb;32(2):139-45.
30. Rosenfeld SB, Herring JA, Chao JC. Legg-Calvé-Perthes Disease: a review of cases with onset before six years of age. J Bone Joint Surg [Am]. 2007 Dec;89(12):2712-22.
31. Laredo Filho J, Ishida A, Kuwajima SS, Telokën MA, Milani C. Efeito biológico da osteotomia de Salter sobre o curso da doença de Legg-Calvé-Perthes, nos estágios de necrose e fragmentação. Rev Bras Ortop. 1994 out;29(10):741-4.

32. Pagnano W, Hanssen AD, Lewallen DG, Shaughnessy WJ. The effect of superior placement of the acetabular component on the rate of loosening after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg [Am]*. 1996 Jul;78(7):1004-14.
33. Lewinnek GE, Lewis JL, Tarr R, Compere CL, Zimmerman JR. Dislocations after total hip-replacement arthroplasties. *J Bone Joint Surg [Am]*. 1978 Mar;60(2):217-20.
34. Fackler CD, Poss R. Dislocation in total hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res*. 1980 Sep;(151):169-78.
35. Farrell CM, Springer BD, Haidukewych GJ, Morrey BF. Motor nerve palsy following primary total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg [Am]*. 2005 Dec;87(12):2619-25.
36. Konyves A, Bannister GC. The importance of leg length discrepancy after total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg [Br]*. 2005 Feb;87(2):155-7.
37. McGee HM, Scott JH. A simple method of obtaining equal leg length in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1985 Apr;(194):269-70.
38. Jasty M, Webster W, Harris W. Management of limb length inequality during total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Dec;(333):165-71.
39. Turula KB, Friberg O, Lindholm TS, Tallroth K, Vankka E. Leg length inequality after total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1986 Jan;(202):163-8.
40. Patil S, Bergula A, Chen PC, Colwell Jr CW, D'Lima DD. Polyethylene wear and acetabular component orientation. *J Bone Joint Surg [Am]*. 2003;85 (Suppl 4):56-63.
41. Boss JH, Misselevich I. Osteonecrosis of femoral head of laboratory animals: the lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man and experimental animals. *Vet Phatol*. 2003 Jul;40(4):345-54.
42. Dailiana ZH, Stefanou N, Khaldi L, Dimakopoulos G, Bowers JR, Fink C, et al. Vascular endothelial growth factor for the treatment of femoral head osteonecrosis: an experimental study in canines. *World J Orthop*. 2018 Sep;9(9):120-9.

43. Peng J, Wen C, Wang A, Wang Y, Xu W, Zhao B, et al. Micro-CT-based bone ceramic scaffolding and its performance after seeding with mesenchymal stem cells for repair of load-bearing bone defect in canine femoral head. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011 Feb;96(2):316-25.
44. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res*. 2007 Jan;25(1):51-61.
45. Boss JH, Misselevich I, Bejar J, Norman D, Zinman C, Reis DN. Experimentally gained insight - based proposal apropos the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *Med Hypotheses*. 2004;62(6):958-65.
46. Komiyama T, Nishida K, Yorimitsu M, Doi H, Miyazawa S, Kitamura A, et al. Decreased levels of insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor relevant to the ossification disturbance in femoral heads spontaneous hypertensive rats. *Acta Med Okayama*. 2006 Jun;60(3):141-8.
47. Terayama H, Ishikawa M, Yasunaga Y, Yamasaki T, Hamaki T, Asahara T, et al. Prevention of osteonecrosis by intravenous administration of human peripheral blood-derived CD34-positive cells in a rat osteonecrosis model. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Jan;5(1):32-40.
48. Zhou L, Yoon SJ, Jang KY, Moon YJ, Wagle S, Lee KB, et al. COMP-angiopoietin1 potentiates the effects of bone morphogenic protein-2 on ischemic necrosis of the femoral head in rats. *PloS One*. 2014 Oct;9(10):e110593.
49. Xu T, Jin H, Lao Y, Wang P, Zhang S, Ruan H, et al. Administration of erythropoietin prevents bone loss in osteonecrosis of the femoral head in mice. *Mol Med Rep*. 2017 Dec;16(6):8755-62.
50. Kothapalli R, Aya-ay JP, Bian H, Garces A, Kim HK. Ischaemic injury to femoral head induces apoptotic and oncotoc cell death. *Pathology*. 2007 Apr;39(2):241-6.
51. Drescher W, Shneider T, Becher C, Hobolt L, Ruther W, Bunger C, et al. Reperfusion pattern of the immature femoral head after critical isquemia. *Acta Orthop Scand*. 1999 Oct;70(5):439-45.

52. Shapiro F, Connolly S, Zurakowski D, Menezes N, Olear E, Jimenez M, et al. Femoral head deformation and repair following induction of ischemic necrosis. *J Bone Joint Surg [Am]*. 2009 Dec;91(12):2903-14.
53. Zhang P, Liang Y, Kim H, Yokota H . Evaluation of a pig femoral head osteonecrosis model. *J Orthop Surg Res*. 2010 Mar;5:15
54. Dello Russo B, Baroni EL, Saravia N, Amelong V, Lubinieck F, Asprea M, et al. Prevention of femoral head deformity after ischemic necrosis using ibandronate acid and growth factor in immature pigs. *Surg Sci*. 2012 Jan;3(4):194-9.
55. Adapala N S, Kim H K W. Comprehensive genome-wide transcriptomic analysis of immature articular cartilage following ischemic osteonecrosis of the femoral head in piglets. *Plos One*. 2016 Apr;11(4):e0153174.
56. Wang G, Zhang CQ, Sun Y, Feng Y, Chen SB, Cheng XG, et al. Changes in femoral head blood supply and vascular endothelial growth factor in rabbits with steroid-induced osteonecrosis. *J Int Med Res*. 2010 May-Jun;38(3):1060-9.
57. Li ZH, Liao W, Cui XL, Zhao Q, Liu M, Chen YH, et al. Intravenous transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells and its directional migration to the necrotic femoral head. *Int J Med Sci*. 2011 Jan;8(1):74-83.
58. Zhang XL, Shi KQ, Jia PT, Jiang LH, Liu YH, Chen X, et al. Effects of platelet-rich plasma on angiogenesis and osteogenesis-associated factors in rabbits with avascular necrosis of the femoral head. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018 Apr;22(7): 2143-52.
59. Salter RB. Experimental and clinical aspects of Perthes' disease. *J Bone Joint Surg [Br]*. 1966 May;48(2):393.
60. Rowe SM, Lee, JJ, Chung JY, Moon ES, Song EK, Seo HY. Deformity of the femoral head following vascular infarct in piglets. *Acta Orthopaedica*, 2006 Feb;77(1): 33-8.
61. Aruwajoye OO, Kim HKW, Aswath PB. Bone apatite composition of necrotic trabecular bone in the femoral head of immature piglets. *Calcif Tissue Int*. 2015 Apr;96(4):324-34.

62. Kim HKW, Morgan-Bagley S, Kostenuik P. RANKL inhibition: a novel strategy to decrease femoral head deformity after ischemic osteonecrosis. *J Bone Miner Res.* 2006 Dec;21(12):1946-54.
63. Rowe SM, Kim MS, Moon ES, Song EK, Yoon TR, Cho SB. Developmental pattern of femoral shortening following devascularization of the capital femoral epiphysis in piglets. *J Pediatr Orthop.* 2005 May-Jun;25(3):300-4.
64. Kim HKW, Stephenson N, Garces A, Aya-ay J, Bian H. Effects of disruption of epiphyseal vasculature on the proximal femoral growth plate. *J Bone Joint Surg [Am].* 2009 May;91(5):1149-58.
65. Kong SY, Kim HW, Park H-W, Lee SY, Lee KS. Effects of multiple drilling on the ischemic capital femoral epiphysis of immature piglets. *Yonsei Med J.* 2011 Sep;52(5):809-17.
66. Kim HKW, Aruwajoye OO, Stetler J, Stall A. Effects of non-weight-bearing on the immature femoral head following ischemic osteonecrosis. *J Bone Joint Surg [Am].* 2012 Dec;94(24): 2228-37.
67. Johnson CP, Wang L, Tóth F, Aruwajoye O, Carlson CS, Kim HKW, et al. Quantitative MRI helps to detect hip ischemia: preclinical model of Legg-Calvé-Perthes Disease. *Radiology.* 2018 Nov;289(2):386-95
68. Santangelo KS, Kaeding AC, Baker SA, Bertone AL. Quantitative gait analysis detects significant differences in movement between osteoarthritic and nonosteoarthritic guinea pig strains before and after treatment with flunixin meglumine. *Arthritis.* 2014 May; 503519.
69. Etterlin PE, Morrison DA, Österberg J, Ytrehus B, Heldmer E, Ekman S Osteochondrosis, but not lameness, is more frequent among free-range pigs than confined herd-mates. *Acta Vet Scand.* 2015 Sep;57:63.

70. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010 Jun;8(6):e1000412.
71. Fitts DA. Ethics and animal numbers: informal analysis, uncertain sample sizes, inefficient replications and type I errors. *Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011 Jul;50(4):445-53.
72. Hoppenfeld S. Exame da marcha. In: Hoppenfeld S. *Propedêutica ortopédica: coluna e extremidades.* São Paulo: Atheneu, 2008:139-48.
73. Laredo Filho J, Ishida A, Lourenço AF, Kuwajima SS, Jorge SRN. Avaliação radiográfica da cobertura acetabular da cabeça femoral em pacientes portadores da doença de Legg-Calvé-Perthes unilateral submetidos à osteotomia de Salter. *Rev Bras Ortop.* 1993 maio;28(5):299-303.
74. Luzo CAM, Guarniero R, Montenegro NB, Godoy Jr RM. Experiência inicial com o uso de fixador externo articulado no tratamento da doença de Legg-Calvé-Perthes por meio de artrodiástase na fase ativa da moléstia. *Rev Bras Ortop.* 2016 maio-jun;51(3):337-45.
75. Rackwitz L, Eden L, Reppenhagen S, Reichert JC, Jakob F, Walles H, et al. Stem cell- and growth factor based-regenerative therapies for avascular necrosis of the femoral head. *Stem Cell Res Ther.* 2012 Feb;3(1):7.
76. Tao J, Dong B, Yang LX, Xu KQ, Ma S, Lu J. TGF- β 1 expression in adults with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head. *Mol Med Rep.* 2017 Dec;16(6):9539-44.

ANEXO A



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 095/2015

Londrina, 28 de Maio de 2015.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 19 de Maio de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Estudo em modelo animal da necrose isquêmica da cabeça femoral por meio de radiografia digital, ressonância magnética, exames laboratoriais, microscopia de luz e eletrônica", registrado sob o processo CEUA nº 7028.2015.85, pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, desenvolvido sob sua responsabilidade. O projeto está aprovado para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 10 suínos machos, oriundos de cruzamento das linhagens *Large white* e *Landrace*, com idade entre 2 e 4 meses, pesando de 5 a 8 kg e provenientes de propriedade particular. O projeto tem como objetivo estudar as alterações da DLCP por meio de radiografias digitais, ressonância magnética, exames laboratoriais, microscopia de luz e eletrônica num modelo animal. Para tanto, os animais serão divididos em grupos, anestesiados com acepromazina via intraperitoneal na dose de 0,05 mg/kg procedido de aplicação de cloridrato de cetamina na dose de 4 mg/kg associado ao diazepam na dose de 0,5 mg/kg, a necrose da cabeça do fêmur será induzida cirurgicamente em ambiente estéril e será realizada a capsulotomia e tração longitudinal para a luxação do quadril seguida de cerclagem dupla no colo do fêmur. Aproximadamente 10 ml de sangue serão coletados em tubos plásticos com vácuo sem anticoagulante no dia da cirurgia e 10 ml antes do momento da eutanásia para avaliação de marcadores inflamatórios, serão realizadas radiografias digitais na incidência ântero-posterior do fêmur e ressonância magnética após a eutanásia e a dissecação e as amostras serão fixadas em solução de glutaraldeído e paraformaldeído para análise por microscopia eletrônica. É previsto que os protocolos experimentais sejam executados em 36 meses.

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida

Coordenador do Projeto

Departamento de Cirurgia

Centro de Ciências da Saúde

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor(a) do Hospital Veterinário da UEL, Chefe do Departamento de Cirurgia e Diretor(a) do Centro de Ciências da Saúde.