
ANTONIO GORIOS FILHO

**Estudo do modelo experimental de indução da necrose isquêmica da
cabeça femoral em crescimento**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Roberto Guarniero

**SÃO PAULO
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gorios Filho, Antonio

Estudo do modelo experimental de indução da
necrose isquêmica da cabeça femoral em crescimento /
Antonio Gorios Filho. -- São Paulo, 2021.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.

Orientador: Roberto Guarniero.

Descritores: 1.Necrose da cabeça do
fêmur/etiologia 2.Cabeça do fêmur/crescimento &
desenvolvimento 3.Isquemia/ diagnóstico por imagem
4.Porco miniatura 5.Modelos animais 6.Doença de Legg-
Calve-Perthes

USP/FM/DBD-034/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família,
minha esposa Patrícia e meu filho João.

À minha mãe, Vera Regina Fortuna, minha
irmã, Paola Roberta Gorios, Eliana Benites
e meu Pai Antonio Gorios.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Roberto Guarniero, a quem tenho profunda admiração e respeito. Agradeço infinitamente por ter me ensinado e permitido fazer parte do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-USP, como médico veterinário é uma grande honra poder acrescentar, com minha pesquisa, algo que poderá ser útil para o conforto dos pacientes pediátricos.

Ao Dr. Gustavo Bispo, quem me recebeu no IOT com muita generosidade e hoje tenho a honra em tê-lo como um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, Prof. Dr. Tarcísio Eloy de Barros Filho e Prof. Dr. Gilberto Luis Camanho, pela receptividade junto ao Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP.

À Andressa da Costa Santos Souza e Camila Gomes da Rocha Agostini, bibliotecárias do IOT, em que sem elas, o caminho para finalizar esse trabalho seria bem mais árduo, estão sempre dispostas a ajudar com competência e bom humor.

Ao Dr. Raul Bollinger Neto, por cordialmente permitir a utilização das instalações do Laboratório de Biomecânica do IOT-HC-FMUSP.

Agradecimentos

Às Secretárias da pós-graduação, Sra. Tania Maria Borges e Rosana Moreno Costa, muito obrigado pela paciência.

Ao Dr. Luiz Renato Agrizzi de Angeli pelo apoio e paciência no auxílio da condução do mestrado.

Ao Dr. Raduan Hage, colega de profissão a quem tenho muita admiração.

“Aprenda como se você fosse viver para sempre.

Viva como se você fosse morrer amanhã”.

Santo Isidoro de Sevilha

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

	Abreviaturas, Símbolos e Siglas	
	Lista de Figuras	
	Lista de Gráficos	
	Resumo	
	Abstract	
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	4
2.1	Objetivo geral.....	4
2.2	Objetivo específico.....	4
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	6
3.1	Modelos experimentais históricos para indução da necrose avascular da cabeça femoral, trabalhos clássicos e diversas intervenções testadas.....	6
3.2	Anatomia do quadril em suínos.....	16
3.2.1	Anatomia da articulação coxofemoral dos suínos.....	16
3.3	Histologia da cabeça femoral em crescimento.....	19
3.4	Fisiopatologia da osteonecrose da cabeça femoral no modelo experimental.....	20
4	MÉTODOS.....	28
4.1	Construção do modelo experimental: estudo piloto.....	28
4.2	Desenho do estudo piloto.....	28
4.3	Cuidados com o animal.....	29

4.4	Cuidados pré-operatórios.....	29
4.5	Procedimento anestésico.....	29
4.6	Procedimento cirúrgico.....	30
4.7	Procedimento pós-operatório.....	35
4.8	Eutanásia.....	36
4.9	Avaliação por imagem.....	36
4.10	Avaliação macroscópica e histológica.....	36
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Estudos de imagem.....	39
5.1.1	Radiologia.....	39
5.2	Macroscopia.....	40
5.3	Avaliação histológica.....	41
6	DISCUSSÃO.....	45
6.1	Justificativa ao projeto piloto.....	49
6.2	Crítica ao método.....	50
6.3	Novas perspectivas.....	51
7	CONCLUSÃO.....	55
8	ANEXOS.....	56
8	REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

DLCP	Doença de Legg Calvé Perthes
FM-USP	Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo
IL-1b	Interleucina 1 b
IL-6	Interleucina 6
LCP	Legg Calvé Perthes
LPS	Lipopolissacarídeos
MSCs	Células tronco mesenquimais
ON	Osteonecrose
ONCF	Osteonecrose da cabeça femoral
RM	Ressonância Magnética
TLR4	Receptor do tipo Toll 4
TNF-a	Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Tipo de modelos experimentais de osteonecrose (ON).....	16
Figura 2 –	Etiologia, patogenia, patofisiologia e histopatologia da ON....	26
Figura 3 –	Procedimento cirúrgico: incisão longitudinal e cranial à articulação coxo femoral (linha branca).....	31
Figura 4 –	Procedimento cirúrgico: acesso da cápsula articular.....	32
Figura 5 –	Procedimento cirúrgico: exposição e ligadura do colo femoral.....	33
Figura 6 –	Procedimento cirúrgico: afastamento dos músculos glúteo médio e superficial.....	34
Figura 7 –	Procedimento cirúrgico: aspecto final após sutura de pele.....	35
Figura 8 –	Imagem de fluoroscopia após seis semanas de pós-operatório.....	40
Figura 9 –	Avaliação macroscópica dos fêmures direito e esquerdo (controle).....	41
Figura 10 –	Corte histológico da amostra com aumento de 20x, coloração HE.....	42
Figura 11 –	Maior aumento 40x – osteoclastos + tecido fibrocartilagenoso + condrócitos (cartilagem articular).....	43

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Modelos experimentais para indução da necrose avascular da
cabeça e diversas intervenções testadas nos suínos..... 47
- Gráfico 2 – Modelos experimentais para indução da necrose avascular da
cabeça e diversas intervenções testadas nos coelhos..... 47
- Gráfico 3 – Modelos experimentais para indução da necrose avascular da
cabeça e diversas intervenções testadas nos cães..... 48

RESUMO

Gorios Filho A. *Estudo do modelo experimental de indução da necrose isquêmica da cabeça femoral em crescimento* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2021.

INTRODUÇÃO: Na tentativa de compreender melhor a etiologia da necrose da cabeça femoral, existe uma diversidade de modelos experimentais tanto no que diz respeito à variedade das espécies, nas quais é induzida a necrose, como nas técnicas operatórias utilizadas para o tratamento. **OBJETIVOS:** Este trabalho tem fundamentalmente dois objetivos: a revisão da literatura concernente aos modelos experimentais da necrose avascular da cabeça do fêmur em crescimento e demonstrar a reprodutibilidade do modelo experimental do suíno por meio de um estudo piloto. **MÉTODOS:** Foi realizada uma revisão bibliográfica descrevendo as tentativas ao longo do tempo em buscar qual seria a melhor espécie e técnica para indução que reproduzisse a necrose isquêmica da cabeça do fêmur em crescimento nos humanos. Simultaneamente foi feito um estudo piloto para verificar a replicação da indução na espécie suína, o espécime que possui mais similaridades com o quadril humano. A análise metodológica do piloto consiste na radiologia convencional e verificação das possíveis alterações anátomo patológicas. **RESULTADOS:** Nos exames por imagem; foram observadas sub-luxação lateral da cabeça do fêmur e aparência triangular da cabeça caracterizando o achatamento da mesma; no exame macroscópico, identificamos o achatamento da cabeça femoral com alargamento e encurtamento do colo; na histologia identificamos a proliferação da cartilagem articular com presença de tecido regenerativo vascular de granulação, com osteoclastos e tecido fibrocartilaginoso na região metafisária do colo femoral. **CONCLUSÃO:** Podemos inferir que o modelo experimental suíno pode servir como uma ferramenta valiosa para a reprodutibilidade das alterações anátomo patológicas da necrose isquêmica da cabeça femoral em crescimento. O modelo é reprodutível e factível, servindo para estudos futuros sobre a anátomo patologia da necrose da cabeça do fêmur em crescimento.

Descritores: Necrose da cabeça do fêmur/etiologia; Cabeça do fêmur/crescimento & desenvolvimento; Isquemia/ diagnóstico por imagem; Porco miniatura; Modelos animais; Doença de Legg-Calve-Perthes.

ABSTRACT

Gorios Filho A. *Experimental model of ischemic necrosis induction of the growing femoral head* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

INTRODUCTION: To better understand the necrosis of the femoral head etiology, there is a diversity of experimental models both in terms of the species variety in which necrosis is induced and in the operative techniques used for treatment. **OBJECTIVE:** This study has two main objectives: to review the literature concerning experimental models of avascular necrosis of the growing femoral head and demonstrate the experimental pig model's reproducibility through a pilot study. **METHODS:** A bibliographic review was conducted describing the attempts over time to find the best species and technique for induction that would reproduce ischemic necrosis of the growing femoral head in humans. Simultaneously, a pilot study was performed to verify the replication of induction in pigs, the specimen that has more similarities with the human hip. The pilot's methodological analysis consists of conventional radiology and verification of possible anatomical, pathological changes. **RESULTS:** In imaging exams; lateral sub-dislocation of the femur head and triangular appearance of the head were observed, characterizing its flattening; in macroscopic examination, the femoral head flattening with femoral neck widening and shortening was identified; in histology, the proliferation of articular cartilage with the presence of vascular granulation regenerative tissue, with osteoclasts and fibrocartilaginous tissue in the metaphyseal femoral neck region was identified. **CONCLUSION:** The experimental pig model can be used as a valuable tool for the reproducibility of anatomical, pathological changes in ischemic necrosis of the growing femoral head. The model is reproducible and feasible and can be beneficial for future studies on the anatomical pathology of necrosis of the growing femoral head

Descriptors: Femur head necrosis/etiology; Femur head/ growth & development; Ischemia/ diagnostic imaging; Swine, miniature; Models, animal; Legg-Calve-Perthes disease.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A necrose avascular da cabeça do fêmur é uma doença ortopédica que quando afeta o quadril da criança em crescimento é denominada doença de Legg Calvé Perthes (DLCP), pelo fato de ter sido relatada quase que simultaneamente em 1910 por A. Legg, J. Calvé e G. Perthes (**Legg, 1910; Calvé, 1910; Perthes, 1910; Kim e Su, 2002**).

Os autores descreveram uma afecção do quadril da criança diferente da tuberculose articular, que era a doença mais comumente encontrada naquela época. Durante todos estes anos, cerca de 2.000 trabalhos foram publicados em relação ao tema. Algumas técnicas e conceitos são descritos, tanto para o tratamento conservador como para o operatório; entretanto, a etiologia continua obscura, mas certamente ocorre um distúrbio na circulação arterial da cabeça femoral em crescimento (**Godoy Júnior, 1988; de Carmargo 1957, 1984; Guarniero et al.,1997; Guarniero et al., 2011**).

Na tentativa de compreender melhor a etiologia da necrose da cabeça femoral, existe uma diversidade de modelos experimentais tanto no que diz respeito à variedade das espécies, nas quais é induzida a necrose, como nas técnicas operatórias utilizadas para o tratamento (**Jones e Allen, 2011**).

A maioria dos esforços para desenvolver um modelo animal concentrou-se nos quadrúpedes sendo que, nos bípedes, ficou limitado às aves (**Conzemius et al., 2002**). A lista de técnicas para a indução da necrose isquêmica na cabeça femoral é extensa, podendo a doença ser induzida por corticoides, por reações de hipersensibilidade, além de uma variedade de técnicas operatórias com o

intuito de reproduzir o que ocorreria na doença ortopédica em humanos (**Boss e Misselevich, 2003**). Porém, devido à etiologia multifatorial da necrose, o desenvolvimento de um modelo animal é desafiador e devemos pensar em um modelo único que mostre as principais características da osteonecrose observadas clinicamente. Assim, temos um amplo campo de trabalho para a determinação correta do modelo experimental, uma vez que estes animais fornecem uma abundância de informações úteis sobre os fatores que contribuem para a doença (**Kim et al., 2001**).

Neste trabalho apresentamos uma análise da literatura em relação aos modelos idealizados ao longo do tempo e a descrição de um modelo experimental na espécie suína, em projeto piloto, usado para o estudo da necrose isquêmica da cabeça do fêmur em crescimento.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar metodologicamente a avaliação do modelo experimental de necrose isquêmica da cabeça femoral em crescimento por meio de revisão bibliográfica.

2.2 Objetivo específico

Descrever o modelo experimental utilizado, em estudo piloto com a análise metodológica da avaliação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Modelos experimentais históricos para indução da necrose avascular da cabeça femoral, trabalhos clássicos e diversas intervenções testadas

Miltner e Hu (1933) injetam álcool no perióstio do colo femoral em cães filhotes (de dois a quatro meses de idade) e coelhos (de dois a três meses), e não observam alterações ósseas significativas nos cães. Nos coelhos, os autores também ressecam o perióstio da linha epifisária até a base do colo femoral e notam algumas pequenas áreas de trabéculas que continham células necróticas.

Kistler (1934) injeta uma suspensão a 2% de carvão macerado em pó bem fino no fêmur de coelhos jovens e adultos; nos animais jovens observa necrose e liquefação da cartilagem epifisária distal e diminuição do comprimento longitudinal do fêmur; relata necrose total da cabeça do fêmur em um coelho jovem embora o fenômeno estivesse relacionado à ruptura do ligamento redondo e dos vasos que atingem o osso na região trocanteriana.

Bohr et al. (1965) induzem a necrose avascular da cabeça femoral em coelhos com dois dias de idade por meio de luxação da articulação com um deslocamento cranial, tendo observado, então, a desvascularização quase completa, levando a um crescimento retardado do centro de ossificação da cabeça femoral e a um conseqüente achatamento da epífise.

Salter (1966) demonstra a possibilidade de produzir a necrose avascular da cabeça femoral em porcos jovens por meio de ligadura arterial, de injeção intra-articular de fluido, ocasionando uma pressão contínua nos vasos do molde cartilaginoso da cabeça femoral; pressão de cerca de 70 mmHg. Na investigação o primeiro sinal radiológico de necrose foi uma falha na parte ossificada da cabeça femoral, que fica sem crescer durante o período de isquemia. O crescimento contínuo do molde de cartilagem da cabeça femoral é o responsável pelo aumento da espessura da cartilagem na articular. A revascularização da cabeça femoral isquêmica está associada com a ossificação de porções previamente não ossificadas do molde cartilaginoso produzindo a aparência radiográfica da “cabeça dentro da cabeça”. Segundo o autor nos porcos jovens, era o osso vivo recém-formado no processo de cicatrização que se deformava gradualmente e não o osso necrótico. Estas investigações levam a um conceito da plasticidade biológica da cabeça femoral revascularizada em oposição ao antigo conceito de amolecimento físico da cabeça femoral durante a fase de cicatrização.

Freeman e England (1969) induzem a isquemia da cabeça femoral em cães por meio de ligadura do colo femoral, seccionam o ligamento redondo e ainda cauterizam os tecidos moles peri-articulares. Os animais são eutanasiados nos períodos entre dois dias e sete meses após ao procedimento cirúrgico. Os autores concluem que a interrupção experimental do suprimento arterial e venoso para a epífise capital femoral no cão imaturo causa a morte do centro secundário de ossificação, além de ocasionar anormalidades histológicas na cartilagem articular.

Salter et al. (1969) desenvolvem um modelo experimental com suínos, em que utilizam uma causa mecânica (pressão pela posição do quadril) para a indução da necrose. Os autores formulam a hipótese em desenho experimental para explicar a necrose isquêmica da cabeça femoral sugerindo a seguinte possibilidade: se os músculos abdutores estão tensos quando o quadril está reduzido, a abdução extrema do quadril aumenta de modo considerável a pressão entre a cabeça femoral e o acetábulo. A pressão continua, assim, sendo exercida e mantida pela imobilização do quadril. No intuito de simular a situação clínica de crianças pequenas sendo tratadas para a luxação congênita do quadril, o experimento foi projetado para produzir uma contratatura mecânica de abdução dos quadris no porco, durante a qual os quadris foram imobilizados na “posição de rã”.

Henard e Calandruccio (1970) descrevem uma reprodução bem-sucedida de indução da osteonecrose da cabeça femoral, por meios não invasivos. No protocolo de indução, mantiveram os quadris de coelhos filhotes (seis semanas), em posição de flexão, abdução e rotação interna durante vinte e quatro horas.

Sanchis et al. (1973) utilizam nove cães em modelo experimental para indução da necrose da cabeça femoral, método descrito por **Freeman e England (1969)**. Os animais são induzidos à necrose isquêmica por meio de um deslocamento ventral da cabeça femoral, de modo que os vasos circunflexos da articulação femoral podem ser observados na superfície do colo femoral e reingressando na epífise proximal. Nesse trabalho, os autores argumentam que, se no caso de o prognóstico da deformidade da cabeça femoral da doença de Perthes depender da frequência com que a cabeça femoral é infartada, a atual atitude clínica para com a doença deve mudar. A preocupação deve ser dirigida

não tanto para proteger a cabeça femoral das forças mecânicas que atuam sobre ela (uma vez que tais forças contribuem pouco para a sua deformação), mas sim especialmente para a detecção e prevenção de episódios repetidos de enfarte.

Robichon et al. (1974) utilizam inicialmente as espécies caninas e leporinas, a técnica de ligadura do colo femoral descrita por **Salter (1966)**, para induzir a necrose isquêmica na cabeça femoral em suínos, na pesquisa sustentam a teoria de que a diminuição do suprimento sanguíneo para a cabeça femoral não só provoca necrose da epífise mas, também, uma diminuição na produção de células cartilaginosas na camada germinativa da placa epifisária, causando diminuição do crescimento ósseo longitudinal. A perturbação resultante do remodelamento normal deve levar a um colo femoral largo e curto, como o que ocorre na DLCP.

Cruess et al. (1975) reproduzem em um modelo experimental onde a condição clínica de necrose avascular da cabeça femoral é induzida por altas doses de esteroides. Os autores observaram nas cabeças femorais, perda de substância óssea com “córteses” finos e osteopenia subcondral evidente. A explicação mais sustentável para essa série de eventos, que ocasionam a diminuição e/ou obstrução do fluxo sanguíneo na região subcondral da cabeça femoral, é que seja devido a diversos episódios subsequentes de êmbulos gordurosos e trombos de fibrina liberados pelo fígado esteatótico e da medula óssea adipocítica.

Chakraborty (1975) utiliza como técnica cirúrgica, em porcos, a luxação da articulação coxofemoral. Como resultado, encontra: indução da necrose avascular nas cabeças femorais e proliferação fibroblástica na cápsula articular

a partir do segundo dia. O acetábulo também é analisado e apesar das alterações da cabeça femoral não há indícios de alterações importantes.

Singleton e Jones (1979) e **Kemp et al. (1981)** em um trabalho semelhante pesquisam a indução da necrose da cabeça femoral em duas raças caninas distintas, como técnica cirúrgica realizam artrotomia e o tamponamento intra-articular com uma “cera de glicol” introduzida por meio de uma cânula. Os animais da raça poodle são as mais suscetíveis à indução da necrose em comparação com os mestiços. Isso, provavelmente, se deve à diferença na vascularização intraóssea na região do colo femoral: nos mestiços, noventa e quatro por cento estão intraósseos, enquanto nos poodles, somente vinte por cento. Os autores concluem que, nos mestiços, a vascularização da cabeça femoral fica protegida de compressões intracapsulares, explicando o porquê de essa raça ser mais resistente à DLCP idiopática.

Fisher et al. (1972) utilizam o coelho adulto como modelo experimental, e reproduzem um modelo de necrose com a administração cumulativa de acetato de metilprednisolona, o estudo é baseado na extração do tecido lipídico ósseo normal comparado com o patológico, como resultado, é encontrado aumento da concentração lipídica nos tecidos ósseos das cabeças femorais dos coelhos tratados com o esteroide em comparação com o grupo controle

Smith et al. (1982) com o objetivo de causar um processo isquêmico na região proximal do fêmur, como modelo experimental a espécie suína, utiliza um protocolo de indução onde injetaram microesferas de vidro na circulação sanguínea na região dos membros pélvicos, nos exames histológicos observaram a diminuição da placa de crescimento dentro da metáfise femoral,

essa alteração pode estar associada à isquemia da epífise adjacente, causando assim a deformidade intrínseca da cabeça femoral.

Gershuni et al. (1983) induzem a necrose avascular em um modelo experimental da espécie suína, com uma técnica semelhante à de **Singleton e Jones (1979) e Barta et al. (1978)** em que por meio de uma cânula, perfuram a capsula articular e injetam um fluido, com o objetivo de causar um aumento na pressão intra-articular, mantendo uma pressão de 150 a 200 mmHg, mantida por 10 a 12 horas ; relatam que há ocorrência de uma sinovite transitória que provavelmente atua como um fator de tamponamento dos vasos subsinoviais intracapsulares para a epífise da cabeça femoral.

Calvert et al. (1984) descrevem uma reprodução bem-sucedida de indução da osteonecrose por meios não invasivos. No protocolo de indução, mantiveram os quadris de coelhos filhotes (seis semanas), em posição de flexão, abdução e rotação interna durante vinte e quatro horas. Os resultados identificaram leve espessamento na cartilagem articular, porém o modelo não reproduz as características descritas na doença de LCP.

Hirano et al. (1988) e Sagara et al. (1990) encontraram, em ratos espontaneamente hipertensos, o aparecimento da osteonecrose da cabeça femoral antes da maturidade (nove semanas), além disso, observam que o remodelamento ósseo foi acompanhado por tecido regenerativo vascular de granulação e também de novo osso aposicional, ou seja, a mesma sequência de eventos que ocorre na DLCP.

Rang (1993), fundamentado no trabalho de **Salter (1966)**, produziu alterações semelhantes à doença de LCP, em cabeça do fêmur em crescimento em 100 suínos por meio da ligadura ao redor do colo do fêmur dos animais .

Segundo o autor a cartilagem articular fica espessada, começa a haver a subluxação lateral da epífise femoral e o achatamento da mesma.

Malizos et al. (1993) propôs outro modelo experimental de indução da necrose da cabeça femoral na espécie canina que consiste na luxação da articulação coxofemoral e, em seguida, no congelamento da parte proximal do fêmur por meio de nitrogênio líquido, incluindo colo e cabeça femoral. A intenção é criar uma área uniforme de necrose, padronizando a lesão para melhor estudo dos processos fisiológicos e posteriormente de cura. Embora a lesão da cartilagem articular tenha sido causada com sucesso, a sua localização na cabeça femoral e tamanho da lesão mostraram não ser um modelo experimental compatível com a DLCP em humanos

Wang et al. (1994) utilizam o coelho como modelo experimental, têm como objetivo induzir a necrose avascular por meio de formação de embolos gordurosos na vascularização arterial. Como protocolo administram corticoide intravenoso (12,45 mg de metilpredisolona/semana). A superdosagem de corticoide leva a lipídemia e hipertrofia das células de gordura. Com isso os autores observam um significativo aumento da pressão intra-articular, onde a pressão normal é de 25 cmH₂O após a medicação chega próximo de 60 cmH₂O. Concluem que o protocolo de indução é capaz de diminuir o fluxo sanguíneo na região epifisária femoral podendo levar a indução da necrose avascular da cabeça femoral.

Newton et al. (1994) utilizam a espécie caprina como modelo experimental, como método de indução da necrose realizam por meio cirúrgico a ablação da fise anterolateral, deixando o máximo possível do anel pericondrial intacto. Porém pela dificuldade em reproduzir a técnica cirúrgica em todos os animais,

não foi possível observar o mesmo padrão de lesão em todos os animais, porém os que desenvolveram a necrose isquêmica reproduziram lesões compatíveis com a isquemia da cabeça femoral em crianças.

Jaramillo et al. (1996) seguindo o modelo experimental de **Salter (1969)** induzem a necrose avascular da cabeça femoral em suínos que são colocados em uma posição de abdução máxima do quadril, e os autores realizam o exame por ressonância magnética contrastada para avaliar a isquemia vascular na região da cabeça femoral. Como resultado observam a detecção da isquemia precoce das cartilagens epifisárias, podendo ser reversível dentro de seis horas após voltar à posição normal.

Nishino et al. (1997) desenham um estudo hemodinâmico para determinar a vascularização da cabeça femoral em cães. Como resultado, concluíram que a região é alimentada por vasos sanguíneos das artérias femorais circunflexas medial e lateral, artéria ligamentar redonda e artéria glútea caudal, que se comunica com esses vasos. Além desses vasos, a cabeça femoral é suprida pela cavidade medular do colo femoral. Esse suprimento sanguíneo explica o porquê da dificuldade em induzir a osteonecrose nos cães sem manipular diretamente a cabeça femoral.

Hofstaetter et al. (1997) estabelecem um modelo de coelho adulto de osteonecrose traumática da cabeça femoral. Eles conseguiram isso por meio da remoção cirúrgica completa da cápsula articular do quadril, incluindo cauterização circunferencialmente ao periósteo e nos vasos sanguíneos que cobrem o colo femoral, no intuito de interromper o fluxo sanguíneo para região.

Kim e Su (2002) seguem um modelo experimental de indução da necrose isquêmica na espécie suína desenvolvido por **Salter em 1966**, por meio da

colocação de uma ligadura de sutura não absorvível ao redor do colo femoral após capsulotomia e transecção do ligamento redondo. A placa de crescimento ao redor do centro de ossificação se tornou necrótica. Esse modelo apresentou necrose da placa de crescimento em torno do centro secundário de ossificação. Além disso, pequenos centros ectópicos novos de ossificação apareceram na cartilagem epifisária, explicando em parte a aparência radiográfica fragmentada do centro secundário de ossificação.

Yamamoto et al. (1995) desenvolvem um modelo de osteonecrose em coelhos induzidos por uma única injeção intravenosa de lipopolissacarídeo (LPS), ocasionando uma reação não imunológica no qual a endotoxina induz reação local e sistêmica como a coagulação intravascular disseminada (Reação de Shwartzman). A combinação de LPS e corticoide, mostraram uma incidência significativamente maior de osteonecrose na cabeça femoral e no úmero do que as alterações necróticas encontrada quando aplicadas isoladamente. **Irisa et al. (2005)** modificam o protocolo de indução nos coelhos, diminuindo a dose do LPS. Notaram uma resposta imediata na medula femoral, encontrando a osteonecrose em 77 por cento dos animais.

Conzemijs et al. (2002) induzem osteonecrose da cabeça femoral em um novo modelo experimental, na intenção de reproduzir o que seria semelhante ao que ocorre nos humanos. Elegeram a ema (*Dromaius nouaehollandie*) por ser bípede. Para a indução da osteonecrose isquêmica foram realizados dois procedimentos: Ligadura das artérias femorais circunflexas laterais e mediais e injeção de nitrogênio líquido na região subcondral da cabeça femoral.

Nos resultados histológicos encontram similaridade com a anatomopatologia humana: substituição da medula óssea normal por um tecido fibroso com reabsorção óssea e fragmentação trabecular.

Manggold et al. (2002) induzem a osteonecrose em ovelhas por meio de injeção de etanol na região intraóssea da cabeça femoral., foi documentado uma necrose parcial no período após 12 semanas em todos os animais testados. A escolha do etanol como agente químico foi devido à sua alta toxicidade, ocasionando uma degradação enzimática completa na região.

Tsuji et al. (2003) descrevem um modelo de osteonecrose semelhante a **Matsui et al. (1995)**, induzido por reação imune por injeção intravenosa de soro equino. Algumas lesões necróticas foram detectadas em uma semana e outras na metáfise foram detectadas com 12 semanas após a injeção. Desde que a avaliação foi feita por imagens de ressonância magnética, concluem que este exame poderá ser útil como preditor da necrose.

Alpaslan et al. (2007) desenvolvem com sucesso um modelo experimental com o objetivo de diminuir as possíveis alterações adicionais ocorridas na indução da necrose por capsulotomias ou por luxações articulares. Os autores realizam uma cateterização e embolização nas artérias circunflexas da cabeça femoral, pois a trombose destas artérias seria uma das possíveis etiologias da DLCP nas crianças.

Cheon et al. (2015) utilizando-se da mesma técnica, puderam observar, por meio de ressonância magnética, mudanças precoces na perfusão e consequente dano tecidual devido à oclusão da vascularização na região da cabeça femoral em suínos.

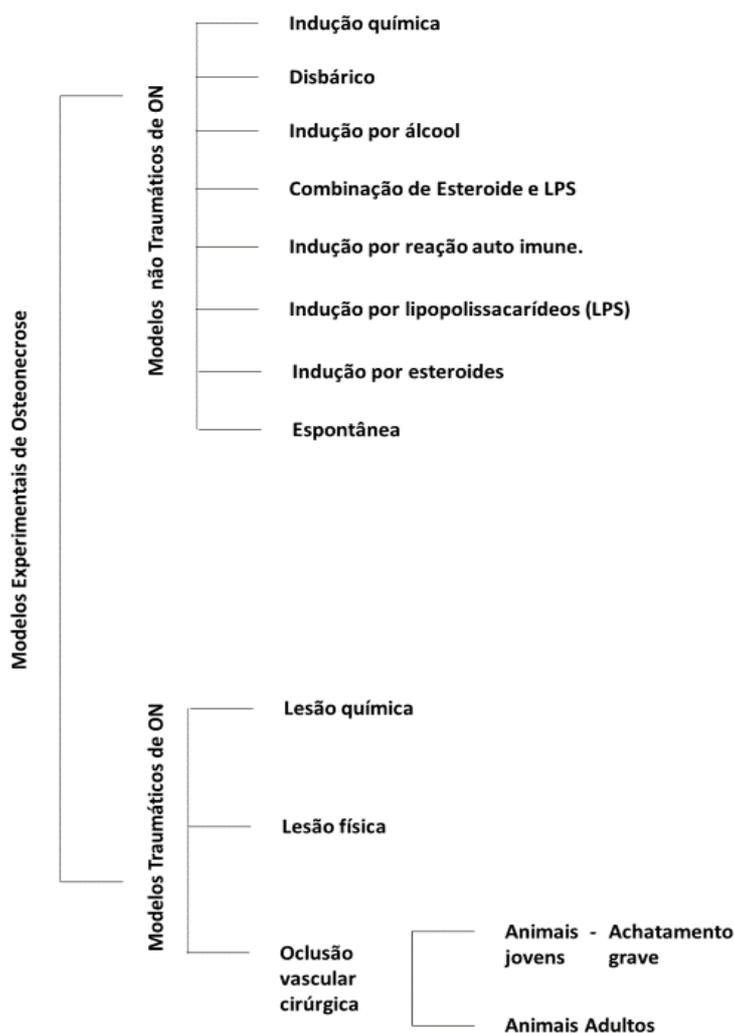


Figura 1 – Tipo de modelos experimentais de osteonecrose (ON).
Fonte: Adaptado de Fan et al., 2011

3.2 Anatomia do quadril em suínos

3.2.1 Anatomia da articulação coxofemoral dos suínos

A articulação coxofemoral é composta de duas estruturas osteoarticulares básicas: a cavidade acetabular e o fêmur proximal. O acetábulo é uma cavidade

cotilóide composta pelo ílio, ísquio, púbis e osso acetabular, que sofrem uma fusão durante a vigésima semana de vida intrauterina e finalizam o processo até o término do primeiro ano.

O lábio acetabular (*labrum acetabulare*) é uma faixa de fibrocartilagem localizada na borda acetabular que se estende pela incisura acetabular com o ligamento acetabular transverso (*ligamentum transversum acetabulli*).

O fêmur tem função central de postura e locomoção. Sua superfície é caracteristicamente modelada, semelhante ao úmero, pela origem e fixação de músculos fortes, tendões, protuberâncias ósseas proeminentes e sulcos. O fêmur pode ser dividido em três segmentos básicos: extremidade proximal que sustenta a cabeça (*caput ossis femoris*), diáfise do fêmur (*corpo ossis femoris*) e extremidade distal com o côndilo medial e lateral (*condylus lateralis et medialis*). A cabeça femoral é acentuadamente curva, é demarcada no sentido do lado medial por uma tuberosidade um tanto grande para a inserção do ligamento da cabeça do fêmur. O colo é distinto. O trocânter maior, embora maciço, não se estende acima do nível da cabeça. O terceiro trocânter está ausente (**Sisson e Grossman,1975**).

A extremidade proximal se curva medialmente e carrega a cabeça femoral proeminente, que é deslocada do longo eixo do osso, a cabeça femoral possui uma superfície articular hemisférica para a articulação com o acetábulo, que é interrompida por uma incisão na cabeça (*ligamento capitis ossis femoris*), essa incisão é circular e em formato de cunha. A cabeça femoral é separada da diáfise femoral por um colo (*collum ossis femoris*) nos carnívoros e no porco. Lateral à cabeça projeta-se um grande processo (trocânter maior), que se estende além do limite dorsal da cabeça do fêmur nos grandes animais, mas

permanece ao nível da cabeça em animais pequenos e no porco. O trocânter maior dá fixação aos músculos glúteos, agindo como um braço de alavanca extensora da articulação do quadril. O trocânter maior e o colo do fêmur são separados pela fossa trocantérica onde se inserem as musculaturas mais profundas do quadril (**König e Liebich, 2019**).

Em relação ao suprimento sanguíneo, em investigação experimental prévia, usando várias técnicas de injeção intravascular observaram que o suprimento para a cabeça femoral em leitões infantis era comparável àqueles em bebês humanos, não apenas em relação à distribuição de vasos para a cabeça femoral, mas também em relação à sua distribuição dentro da cabeça. Os vasos epifisários entram na cabeça de sua periferia à placa epifisária e avançam através do modelo de cartilagem pré-septuosa para suprir o núcleo ossificante e a cartilagem globalizada não circundante. Dentro da cartilagem pré-óssea, ou não, da cabeça femoral, os vasos terminam em delicadas expansões sinusoidais com uma arteríola central e vênulas circundantes. No porco, um pequeno núcleo ossificante está presente na cabeça femoral ao nascer, enquanto no humano esse núcleo não aparece formalmente até aproximadamente 6 meses de idade. Assim, no nascimento, a cabeça femoral do porco é semelhante à cabeça femoral humana até aproximadamente 1 ano de idade. Tanto no porco como no humano, na cartilagem pré-óssea, contendo o contraste epifisário, os vasos são resilientes e compressíveis (**Salter et al., 1969**).

No porco, a artéria femoral profunda se ramifica da artéria femoral logo além do ligamento inguinal. O curso da artéria femoral profunda é semelhante ao da artéria circunflexa medial do fêmur no humano. A artéria circunflexa

femoral medial do porco se origina na artéria femoral profunda logo posterior ao trocânter e ascende no intertrocântérico. A artéria circunflexa femoral lateral se ramifica na artéria femoral mais distal do que a artéria circunflexa femoral profunda **(Sisson e Grossman, 1975)**.

A perfusão da epífise femoral na espécie suína esqueleticamente imatura, foi aferida por meio de fluxometria laser doppler e observou que a artéria femoral lateral, ramo principal da artéria femoral superficial, é amplamente responsável pela perfusão da cabeça do fêmur em oito dos nove porcos **(Basset et al., 1991)**.

Sob o músculo reto femoral, o sulco de vários ramos da artéria circunflexa lateral do fêmur supre a musculatura adjacente. Um ramo ascendente da artéria circunflexa lateral do fêmur entra na cápsula do quadril anteromedialmente entre as bandas ascendentes e transversal do ligamento, esse ramo ascendente se comunica com o anel intra-articular de anastomose e fornece a maior parte da vascularização anteromedial da condroepífise **(Howe et al., 1950)**.

3.3 Histologia da cabeça femoral em crescimento

A cabeça femoral de um animal recém-nascido na sua avaliação histológica está completamente formada por células cartilaginosas, contendo canais vasculares distribuídos por toda a epífise femoral; esta vascularização é responsável pelo fornecimento do suporte nutricional; um centro secundário de ossificação é formado por meio de ossificação endocondral na região central da epífise cartilaginosa, ao mesmo tempo, a camada profunda da cartilagem articular (também chamada de cartilagem epifisária) recobre o núcleo ósseo, se

estabelecendo como uma placa de crescimento esférica, a cartilagem epifisária é responsável pelo crescimento circunferencial do centro secundário, até que o tamanho total da cabeça femoral seja alcançado **(Kim et al., 2004; Kim e Herring, 2011)**.

Na cabeça femoral imatura, a cartilagem articular é mais espessa, e a camada profunda da cartilagem articular é dependente dos canais da cartilagem e da vascularização subcondral para sua nutrição, devido à essa diferença, a perda de um suprimento vascular para a cabeça femoral em crescimento, produzirá um dano necrótico e também uma lesão na cartilagem de crescimento em torno do centro secundário de ossificação. Conforme o centro secundário aumenta, a espessura da cartilagem articular diminui e os canais da cartilagem regridem e desaparecem **(Kim et al., 2011)**.

3.4 Fisiopatologia da osteonecrose da cabeça femoral no modelo experimental

É importante reconhecer que esta descrição da fisiopatologia da necrose isquêmica não relata com total precisão o que ocorre na doença de Legg Calvé Perthes, já que é ocasionada por indução cirúrgica em que é causada uma lesão aguda e ocorre um prolongamento no tempo da isquemia, a sutura continua estrangulando o colo femoral enquanto o seu diâmetro aumenta com o crescimento aposicional do periósteo **(Kim e Herring, 2001)**.

A osteonecrose é causada pela falta de suprimento sanguíneo para o osso, portanto, pode ser observada em qualquer condição em que ocorra lesão

vascular e que comprometa o fluxo sanguíneo. A etiologia mais comum é o trauma, fraturas e luxações, quando há uma interrupção mecânica no suprimento de sangue, pode ocorrer as obstruções vasculares por origem não traumáticas e entre as causas mais comuns estão: alcoolismo, altas doses de corticoides, hemoglobinopatias, hiperlipidemia, fenômenos sépticos e fatores genéticos **(Abraham e Malkani, 2004; Adapala e Kim, 2016)**.

A evolução da necrose óssea pode ser dividida em duas fases sucessivas: isquemia e regeneração **(Guerado e Caso, 2016)**.

Fase isquêmica

A diminuição do suprimento sanguíneo para a cabeça femoral além de provocar a necrose da epífise, também causa a diminuição na produção de células cartilaginosas na camada germinativas da placa epifisária; as células da medula óssea são a primeira população a morrer, seguidas pelos osteoblastos e osteócitos, evento que caracteriza histologicamente o diagnóstico de osteonecrose **(Catto et al., 1965; Robichon et al., 1974)**.

Inicialmente não há deformidade da cabeça femoral pois a estrutura é mantida pela cartilagem e trabéculas ósseas, porém com a continuidade do processo isquêmico a apoptose de células ósseas resultarão em colapso ósseo com envolvimento subsequente da cartilagem sobrejacente; alguns mediadores moleculares induzem a migração das células-tronco mesenquimais a migrar para área necrótica **(Shapiro et al., 2009, Guerado e Caso, 2016)**.

Após a segunda semana da indução da isquemia, muitas lacunas são observadas na zona hipertrófica da cartilagem epifisária, são observadas na junção condro-óssea a ausência de invasão vascular dos condrócitos

hipertróficos terminais e nova formação óssea, indicando interrupção da ossificação endocondral, também são observados extensa morte celular e desorganização do estroma medular. O osso trabecular dentro da epífise óssea adquire lacunas vazias e uma perda de revestimento de osteoblastos na sua superfície **(Kim et al., 2004)**.

Após duas a quatro semanas, observa-se formação de uma neovascularização na periferia da cabeça femoral infartada estimulados pelo Fator de Crescimento de Vascularização Endotelial (VEGF) e invasão de tecido de vascular de granulação constituído por capilares e células fibroblásticas **(Kim et al., 2004)**.

É formado um tecido de reparo fibrovascular que contém um número aumentado de macrófagos pró-inflamatórios ativados por um padrão específico do receptor de reconhecimento (TLR4), também podem ser vistos um aumento dos macrófagos pró-inflamatórios no tecido regenerado que levará a um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, TNF-a e IL-6 e o TLR4) **(Adapala et al., 2016)**.

Na quarta a oitava semana após a indução da osteonecrose da cabeça femoral, os osteoclastos estão presentes à frente a neovascularização, reabsorvendo ativamente o osso necrótico, resultando na substituição da medula necrótica e o osso trabecular com tecido fibrovascular, o tecido vascular de granulação também invade a zona necrótica e hipertrófica da cartilagem, onde os condroclastos se encontram reabsorvendo a cartilagem **(Kim et al., 2004)**.

Fase regenerativa

A deformidade da cabeça femoral ocorre em associação com a resposta de reparação à isquemia e à necrose. Esta fase é iniciada pela revascularização da cartilagem epifisária, com a ossificação secundária permitindo que o tecido fibrovascular forneça células mesenquimais indiferenciadas para a reparação; osteoclastos surgem para reabsorver tanto os tecidos necróticos como o tecido de reparação precoce **(Shapiro et al., 2009)**.

Por uma perspectiva mecânica, a cabeça femoral começa a deformar quando são aplicadas forças na articulação; pelo fato de a carga ser maior que a sua capacidade em resistir vai adquirindo seu formato achatado característico.

Para que ocorram sinais radiográficos, é necessário que o osso necrótico e o segmento recebam a revascularização que conduz as células-troncos mesenquimais (MSCs) a migrarem para a área necrótica, onde ocorreria sua multiplicação e diferenciação em osteoblastos ocorrendo a formação de novo osso aposicional, estes eventos constituem os primeiros passos da fase regenerativa **(Kim e Su, 2002)**.

A revascularização e a restauração da ossificação endocondral não ocorrem globalmente em toda a região da cabeça femoral, mas, sim, na região periférica inicialmente. Com estes fenômenos ocorre uma assimetria no crescimento do centro secundário de ossificação e como consequência uma aparência achatada da cabeça femoral; a região do centro secundário de ossificação cresce, mas não a região central. Na fase de reparação são formados novos centros de ossificação na região epifisária da cartilagem, contribuindo para que uma imagem radiográfica demonstre áreas fragmentadas e irregulares **(Kim et al., 2001)**.

Animais eutanasiados entre a sexta e a oitava semana apresentam alterações histopatológicas em diferentes regiões da epífise femoral superior, na região periférica da cartilagem epifisária com áreas de formação de osso novo e restauração da ossificação endocondral. Nesta fase é observada a diferenciação dos condrócitos em proliferação e hipertróficos com invasão vascular; os osteoblastos estão ausentes das poucas superfícies esponjas primárias remanescentes. Na região central da epífise da cabeça femoral, a placa de crescimento necrótica ainda está presente, sem evidência de restauração da ossificação endocondral **(Kim et al., 2001)**.

Ocorre baixa invasão vascular de condrócitos hipertróficos terminais e uma diminuição na quantidade de osso esponjoso primário na junção condro-óssea, indicando a cessação da ossificação endocondral **(Kim et al., 2001)**.

Dois fenômenos diferentes ocorrem no interior da cabeça femoral necrótica; por um lado o osso subcondral compacto sustentará a reabsorção por aposição negativa, gerada pelos osteoclastos (células originadas da coalescência dos monócitos, que expressam o fenótipo de uma célula gigante multinucleada). que atuarão removendo a cartilagem rígida; e, por outro lado, o osso esponjoso situado no centro da cabeça terá um resultado positivo e um equilíbrio aposicional **(Yan et al., 2009)**.

O aumento considerável da largura da cabeça femoral no membro isquêmico após as primeiras quatro semanas de indução ocorre, em grande parte, pelo crescimento assimétrico; ao contrário de remodelação, a cabeça colapsa e este colapso leva a deformidade da cabeça femoral, portanto, dois eventos ocorrerão simultaneamente: a ampliação em uma dimensão e o encurtamento em outra, levando assim a deformidade da cabeça femoral; o

crescimento externo da cartilagem articular está em equilíbrio com a conversão da cartilagem para o osso localizado na periferia fisária de formato hemisférico do centro de ossificação secundário, como consequência, a espessura da cartilagem articular epifisária aumenta no lado onde houve a ligadura cirúrgica **(Shapiro et al., 2009)**.

Em um experimento com animais imaturos, observa-se que a revascularização da região necrótica tem fluxo sanguíneo maior do que o normal. A neovascularização traz novas células mesenquimais, fenômeno este importante, pois tais células são capazes de diferenciar em várias linhas celulares como por exemplo: osteoblastos, condrócitos e adipócitos, células estas responsáveis pelo processo de regeneração **(Yan et al., 2009)**.

Em relação ao acetábulo, sabe-se que o processo de reparação da cartilagem também será exagerado, de tal forma que a cabeça femoral fica maior do que a cavidade acetabular, resultando em uma eventual subluxação, que é conhecida por ser um sinal de mau prognóstico para a DLCP **(Upasani, 2018)**.

Após a oitava semana de indução operatória, a restauração da ossificação endocondral pode ser observada; nas áreas onde a cartilagem necrótica foi completamente reabsorvida ocorreu a diferenciação dos condrócitos proliferativos em condrócitos hipertróficos **(Kim et al., 2004)**. Devido a esta hipertrofia reativa da região cartilaginosa e pela compressão mecânica na região articular, ocorre o início precoce da coxa magna, crescimento este compensador do colo femoral a fim de manter a esfericidade normal da cabeça femoral; como resultante o colo femoral adquire um formato largo e curto bem característico, como ocorre na DLCP **(Rowe et al., 2005; Guerardo e Caso, 2016)**.

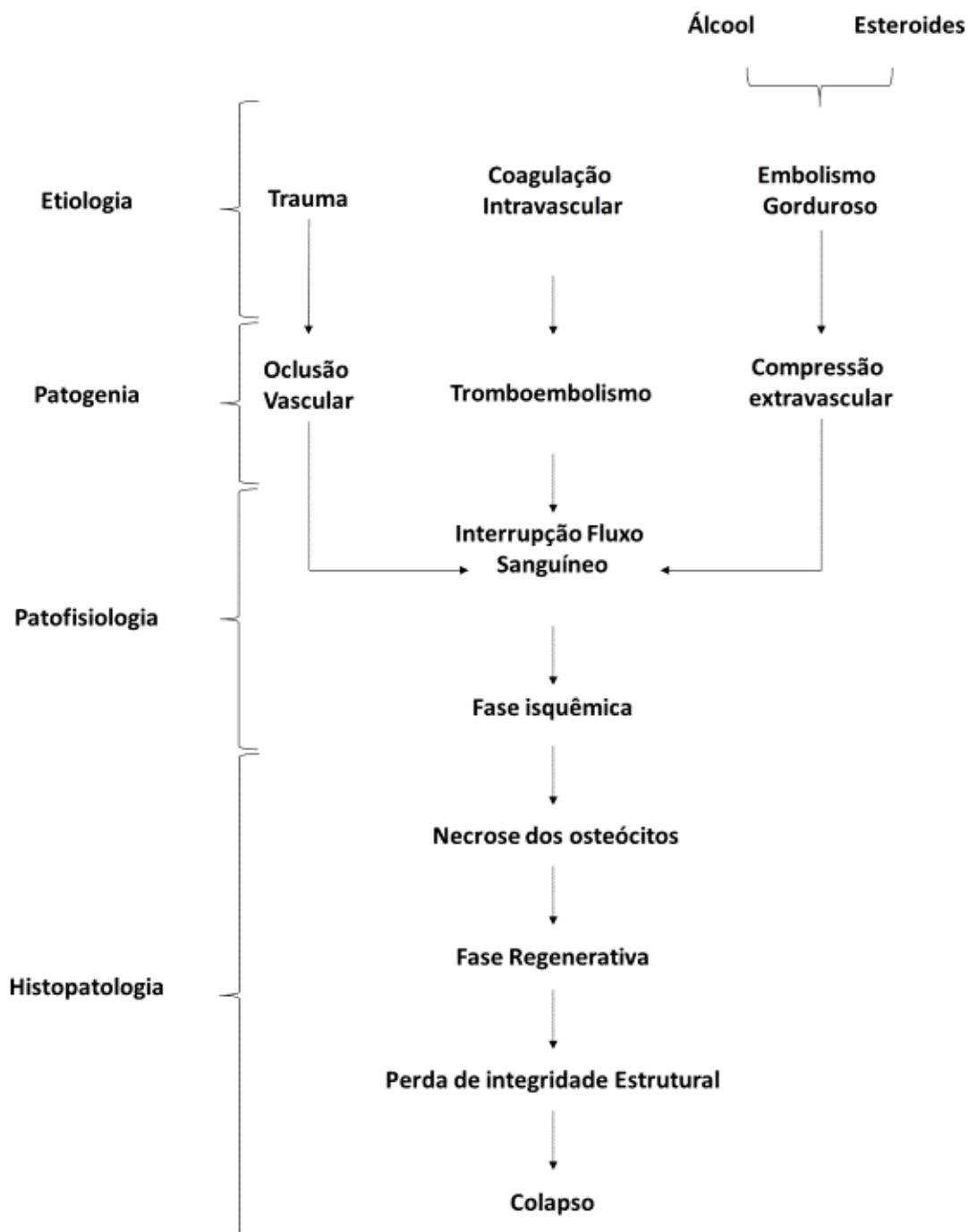


Figura 2 – Etiologia, patogenia, patofisiologia e histopatologia da ON
Fonte: Adaptado de Fan et al.,2011

4. MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Construção do modelo experimental: estudo piloto

Após a aprovação pelo Comitê de Ética da instituição, sob número de protocolo 141/15 (**Anexo A**), utilizamos o modelo experimental no suíno em crescimento.

Para realização da experimentação piloto seguimos as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (**COBEA, 1991**).

4.2 Desenho do estudo piloto

O estudo foi desenhado para a sistematização de um protocolo de indução da necrose isquêmica da cabeça do fêmur em crescimento. Foi escolhido o modelo da espécie suína. Foi operado um animal na articulação coxofemoral direita, permanecendo a articulação coxofemoral esquerda como controle não operado.

Foi utilizado um animal com quatro semanas de vida e com peso de 8 kg.

4.3 Cuidados com o animal

Foi utilizado um porco filhote procedente da Granja RG que foi mantido no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP, um local adequado para a manutenção da espécie, com a presença de cuidadores familiarizados com o trato destes animais. Utilizamos os serviços de limpeza e de despejo adequado dos dejetos segundo as normas sanitárias locais, com água *ad libidum* e ração adequadas para a espécie.

4.4 Cuidados pré-operatórios

No período pré-operatório o animal ficou em jejum durante oito horas.

4.5 Procedimento anestésico

O animal recebeu medicação pré-anestésica com associação de cetamina (3mg/kg IM) e midazolan (0,4mg/kg IM). A indução da anestesia foi realizada com isoflurano (3,5%) com auxílio de máscara e a manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano (2%) e fentanil (0,2µg/kg/h IV). Para a intubação foi administrado 5mg/kg de propofol. Imediatamente antes do início da cirurgia, foi realizada antimicrobianoterapia profilática com cefazolina (30mg/kg IV) e administrado anti-inflamatório não esteroideal (meloxicam 0,4mg/kg IM).

Ao final do procedimento cirúrgico, foi realizada analgesia com dipirona (25mg/kg IV) e morfina (3mg/kg IV), curativo na região da ferida cirúrgica e foi colocado um cateter periférico para administração de fármacos analgésicos e anti-inflamatório no pós-operatório.

4.6 Procedimento cirúrgico

Após a indução e a anestesia, uma incisão longitudinal foi realizada na região cranial a articulação coxofemoral direita do animal em condições estéreis (**Figura 3**). Para o acesso da capsula articular é feita a tração dos músculos glúteo médio e superficial com auxílio de um afastador tipo Farabeuf. É realizada a capsulotomia articular parcial e a tração longitudinal do membro inferior é efetuada para luxar a articulação. O ligamento redondo é seccionado para facilitar a ligadura (looping) de uma sutura dupla circunferencial no colo do fêmur dos animais (**Figura 4**).

Com a utilização de um instrumento curvilíneo, tipo Mixer curvo ou passador de fio, um fio de sutura absorvível 2 é posicionado ao redor do colo femoral (linha verde) (**Figura 5**) e amarrado com a maior tensão possível, para bloquear a circulação arterial dos vasos ascendentes cervicais que suprem a epífise femoral proximal (**Figura 6**). A ferida operatória é suturada por planos até a pele (**Figura 7**). Não foi utilizado imobilização externa no período pós-operatório.



Figura 3 – Procedimento cirúrgico: incisão longitudinal e cranial à articulação coxo femoral (linha branca)

Fonte: Arquivo pessoal do orientador



Figura 4 – Procedimento cirúrgico: acesso da cápsula articular
Fonte: Arquivo pessoal do orientador

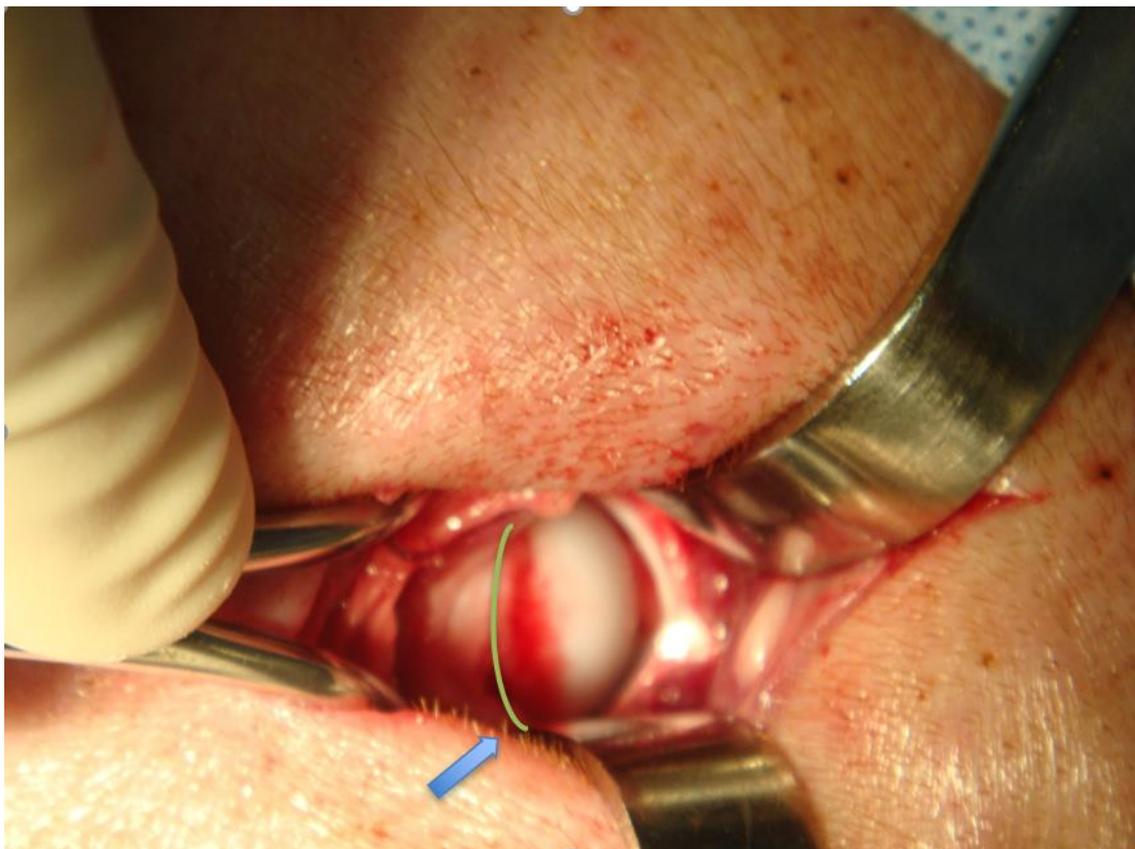


Figura 5 – Procedimento cirúrgico: exposição e ligadura do colo femoral
Fonte: Arquivo pessoal do orientador



Figura 6 – Procedimento cirúrgico: afastamento dos músculos glúteo médio e superficial
Fonte: Arquivo pessoal do orientador

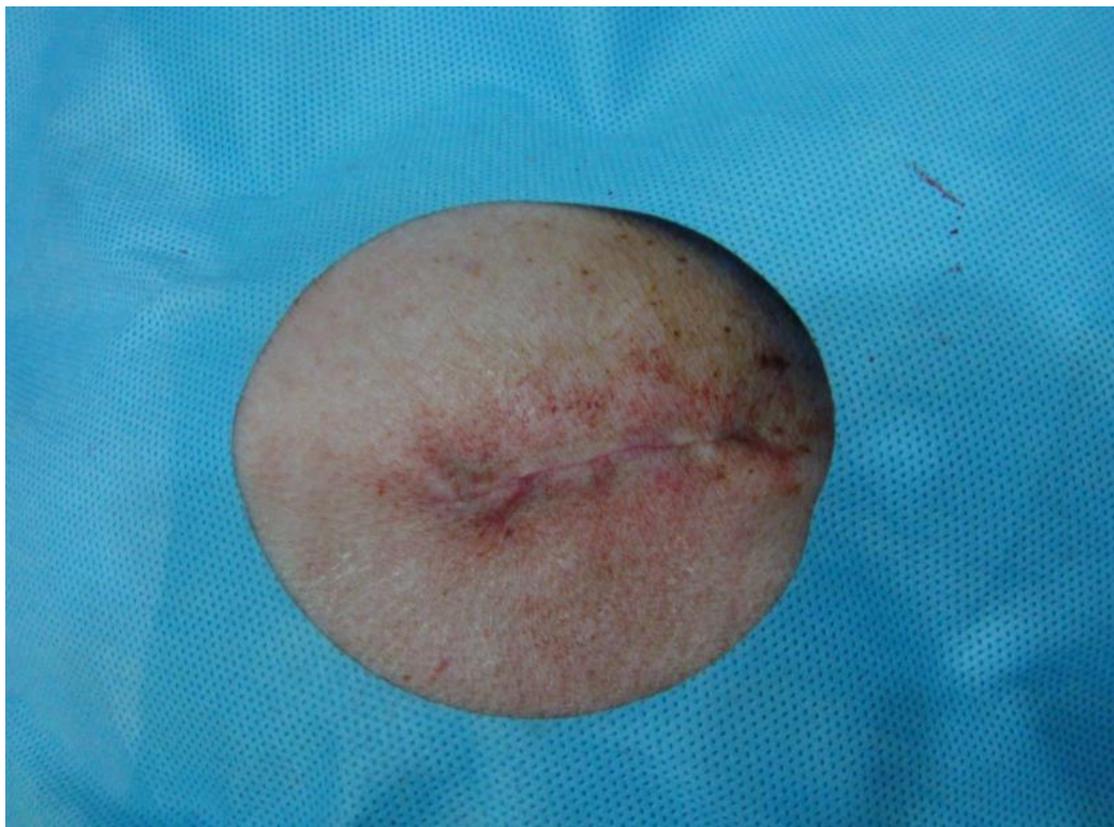


Figura 7 – Procedimento cirúrgico: aspecto final após sutura de pele
Fonte: Arquivo pessoal do orientador

4.7 Procedimento pós-operatório

Foi preconizado tratamento pós-operatório com dipirona (25mg/kg IV) e cloridrato de tramadol (3mg/kg IV) a cada 12 horas por 5 dias, meloxicam (0,4mg/kg SC) a cada 24 horas por 5 dias e morfina (3mg/kg IV) sempre que observados sinais de dor característicos da espécie suína (apatia, anorexia e vocalização em repouso ou durante a palpação da ferida cirúrgica).

4.8 Eutanásia

Após seis semanas da indução da necrose o animal foi submetido à morte indolor induzida. Foi utilizada medicação pré-anestésica com associação de cetamina (3mg/kg IM) e midazolam (0,4mg/kg IM). A indução da anestesia foi realizada com isoflurano (3,5%) com auxílio de máscara para facilitar a venopuntura da veia auricular. Após confirmação do plano anestésico, foi administrado cloreto de potássio por via endovenosa.

4.9 Avaliação por imagem

Os exames de imagem foram realizados por fluoroscopia no momento da operação da indução da necrose isquêmica e com seis semanas de pós-operatório no momento da eutanásia do animal. O quadril esquerdo servindo como controle.

4.10 Avaliação macroscópica e histológica

O quadril direito e o esquerdo do animal foram cuidadosamente dissecados. Foram realizados exames macroscópicos e microscópicos das amostras assim obtidas.

Para a histologia somente a amostra do quadril direito (operado) do animal foi fixada em formalina a 10%, embebida em parafina e cortada em fatias com

6µm. As secções assim obtidas foram coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e examinadas sob microscopia óptica comum. Com a avaliação microscópica procuramos responder os seguintes quesitos:

- presença de um número aumentado de osteoclastos;
- aumento da reabsorção óssea;
- presença de tecido regenerativo vascular de granulação;
- proliferação cartilagem articular.

5. RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Estudos de imagem

5.1.1 Radiologia

Na figura demonstra a articulação coxofemoral direita onde foi induzida a necrose avascular

Na **Figura 8** observamos em “a” sub-luxação lateral da cabeça do fêmur; em “b” aparência triangular da cabeça do fêmur caracterizando o achatamento da mesma. A imagem da articulação coxofemoral esquerda normal (controle).

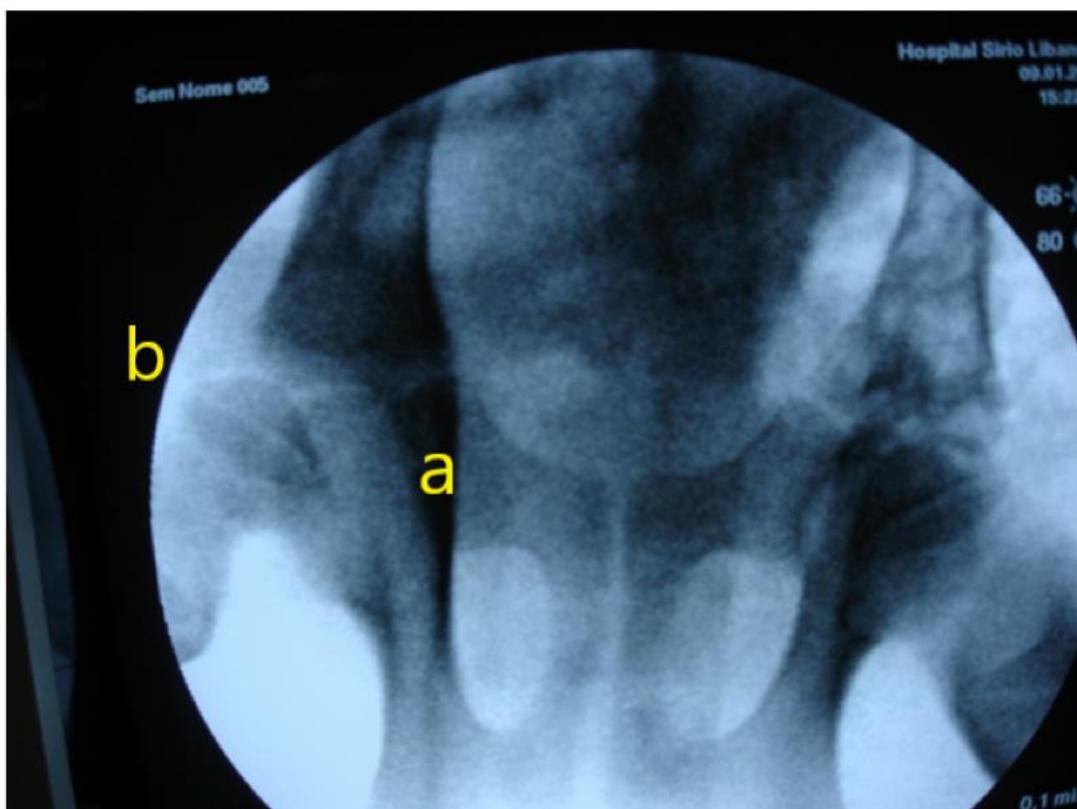


Figura 8 – Imagem de fluoroscopia após seis semanas de pós-operatório
Fonte: Arquivo pessoal do orientador

5.2 Macroscopia

Foi feita a análise macroscópica das amostras do quadril direito e esquerdo logo após a eutanásia (**Figura 9**). Notar o achatamento da cabeça femoral direita com alargamento e encurtamento do colo femoral, quando comparado com o quadril controle (esquerda).

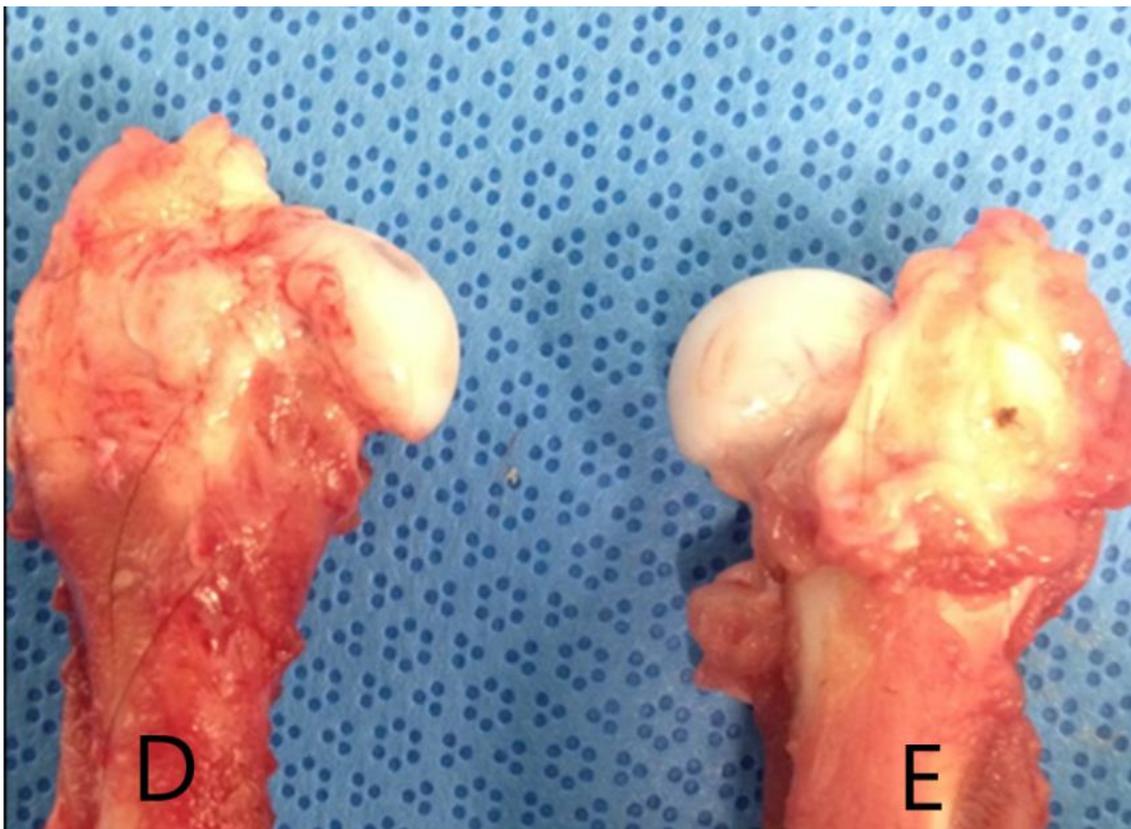


Figura 9 – Avaliação macroscópica dos fêmures direito e esquerdo (controle)
Fonte: Arquivo pessoal do orientador

5.3 Avaliação histológica

Na **Figura 10**, notar a proliferação da cartilagem articular (a); presença de tecido regenerativo vascular de granulação (b), na região metafisária do colo femoral. Presença de células gordurosas no tecido de granulação (c)

A **Figura 11** complementa nossa análise mostrando a presença de osteoclastos (d), tecido fibrocartilagenoso e condrócitos (e).

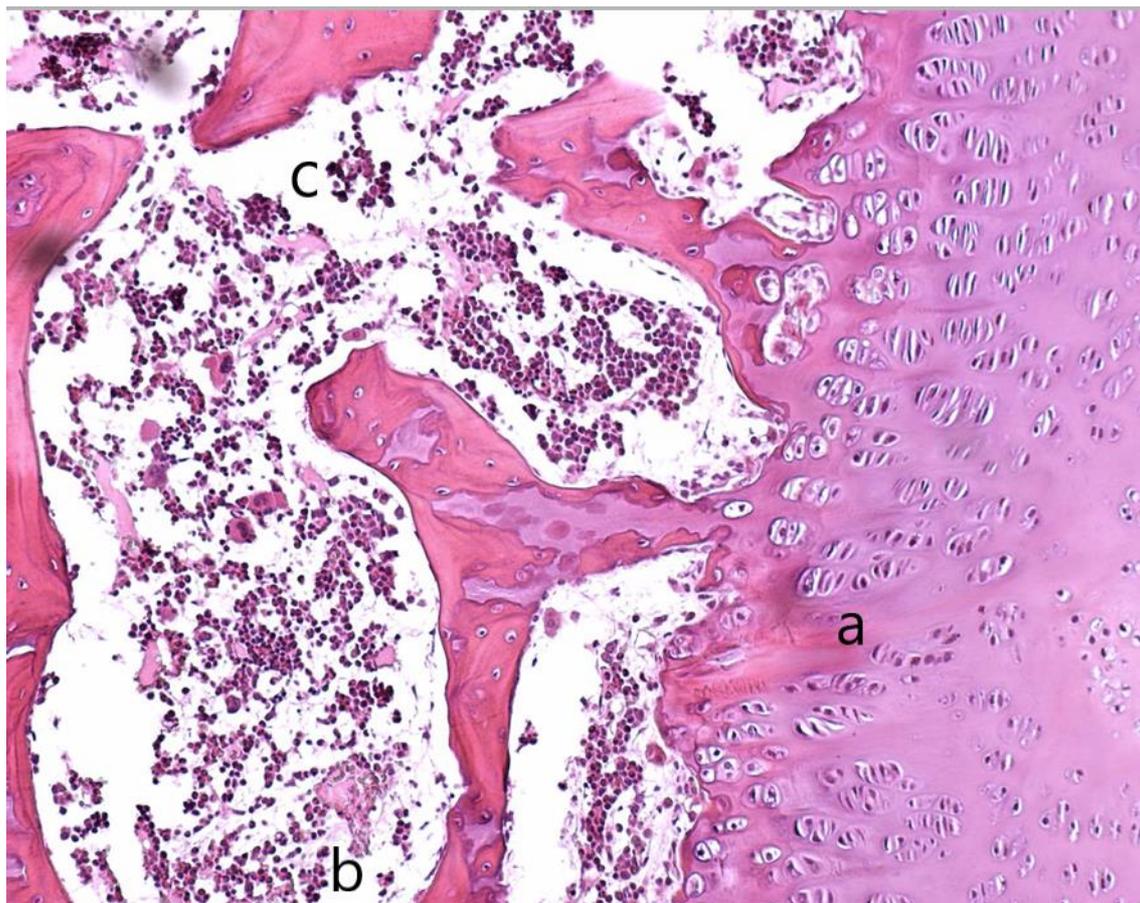


Figura 10 – Corte histológico da amostra com aumento de 20x, coloração HE.

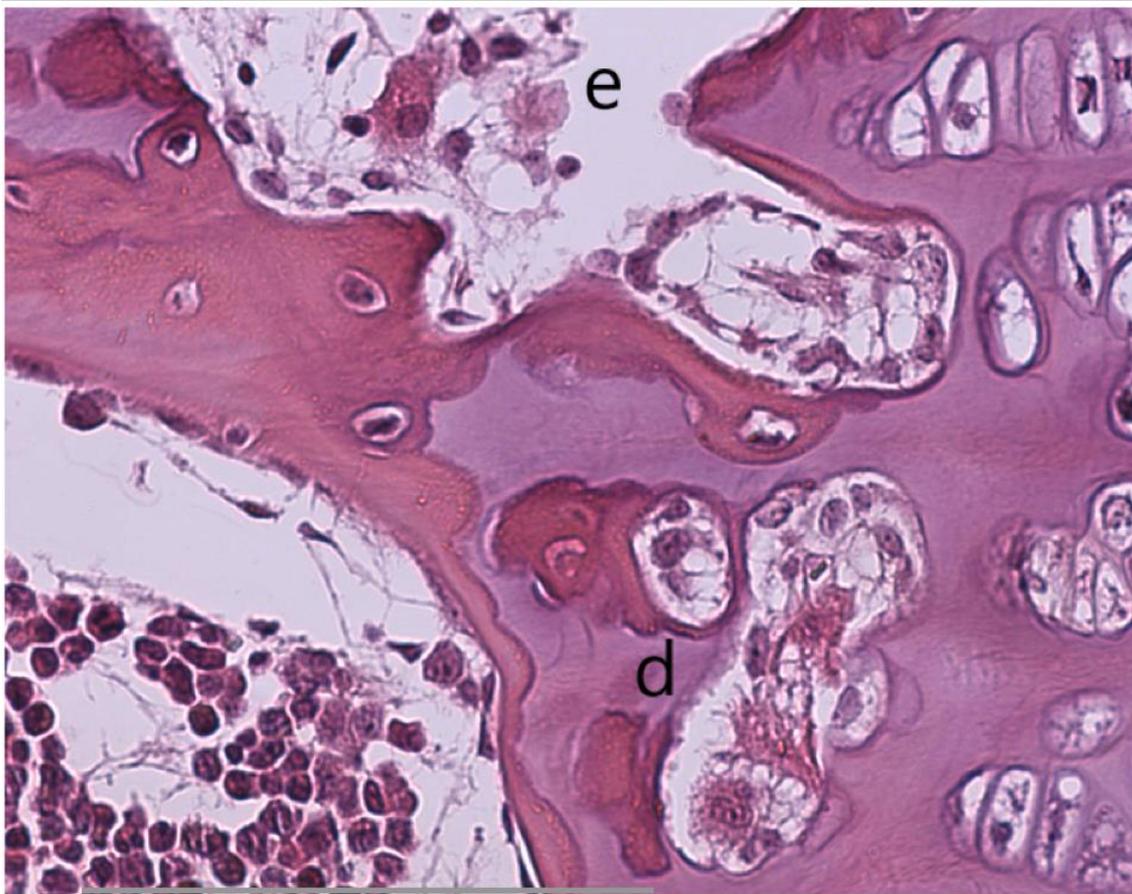


Figura 11 – Maior aumento 40x – osteoclastos + tecido fibrocartilaginoso + condrócitos (cartilagem articular)

Fonte: arquivo pessoal do orientador

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este trabalho tem fundamentalmente dois objetivos: a revisão da literatura concernente aos modelos experimentais da necrose avascular da cabeça do fêmur em crescimento e a demonstração da reprodutibilidade no modelo experimental do suíno, por meio de um estudo piloto.

A necrose avascular da cabeça femoral é um problema ortopédico presente no cotidiano, tanto da medicina como da veterinária. Pode ser uma afecção articular especialmente incapacitante causando limitações funcionais e dor, tanto para as crianças como para os animais, especialmente os cães. Como ainda não dispomos de tratamentos completamente eficazes, tanto na medicina humana como na veterinária, os modelos experimentais têm importância para responder às inúmeras indagações ainda existentes, principalmente em relação à etiologia. Concordamos com **Rang (1993)**, quando o autor enfatiza a necessidade dos modelos experimentais para reproduzirem a doença de forma mais fidedigna.

Desde 1933 até os dias de hoje, foram publicados inúmeros artigos relacionados à indução da necrose avascular da cabeça femoral em crescimento com diversas espécies animais sendo utilizadas; concordamos com os autores que a espécie suína é a que melhor reproduz a anatomia vascular quando comparada a articulação coxofemoral humana, pois, este animal quando filhote, com três semanas de idade, tem sua anatomia correspondente à das crianças com três a cinco anos de idade óssea (**Guarniero et al., 1995; Kim e Su, 2002; Boss e Misselevich; Mariano, 2003; Menezes et al., 2007; Zhang et al., 2010; Jones e Allen et al., 2010**).

A maioria dos modelos animais para estudo da necrose isquêmica concentrou-se nos quadrúpedes, incluindo suínos, coelhos, cães, ratos e cabras. A investigação dos bípedes foi limitada ao frango (**Cui et al., 1997**) e à ema. A lista de técnicas de tentativas em induzir a osteonecrose da cabeça femoral é extensa.

A lista de técnicas de tentativas em induzir a osteonecrose da cabeça femoral é extensa, incluindo métodos como administração de esteroides (**Wang et al., 1994; Boss e Misselevich, 2003; Drescher et al., 2004**), endotoxinas (**Schulitz et al., 1977**), capsulotomia parcial, subluxação da cabeça femoral, transecção do ligamento redondo e sutura colo femoral (**Kim et al., 2001**), embolia dos vasos periarticulares (**Smith et al., 1982**), osteotomia femoral e isolamento ósseo (**Favenesi et al., 1983**), luxação coxofemoral (**Freeman e England, 1969; Chakraborty et al., 1975**), criogenia da cabeça femoral (**Malizos et al., 1993**), eletrocauterização dos vasos articulares (**Kamegaya et al., 1990; Crawford et al., 1995**) e hipertensão espontânea (**Hirano et al., 1988**), abdução do quadril (**Salter et al., 1969; Jaramillo et al., 1996**) e outras combinações de lesões.

Abaixo, nos **Gráficos de 1 a 3**, as principais espécies e técnicas de induções com maiores relevância observadas na revisão de literatura.

Gráfico 1 – Modelos experimentais para indução da necrose avascular da cabeça e diversas intervenções testadas nos suínos

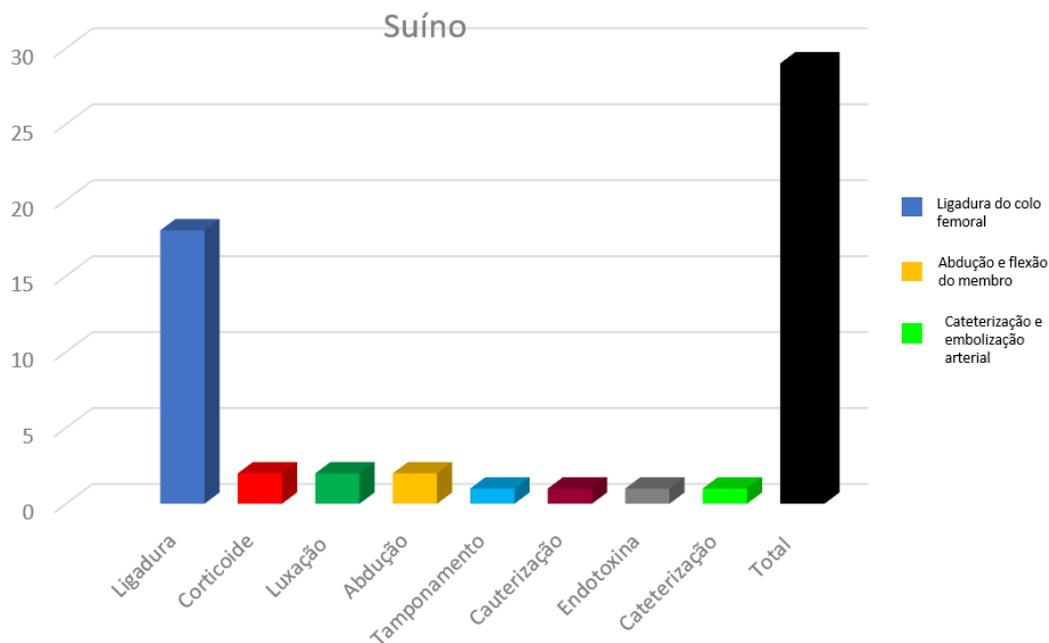


Gráfico 2 – Modelos experimentais para indução da necrose avascular da cabeça e diversas intervenções testadas nos coelhos

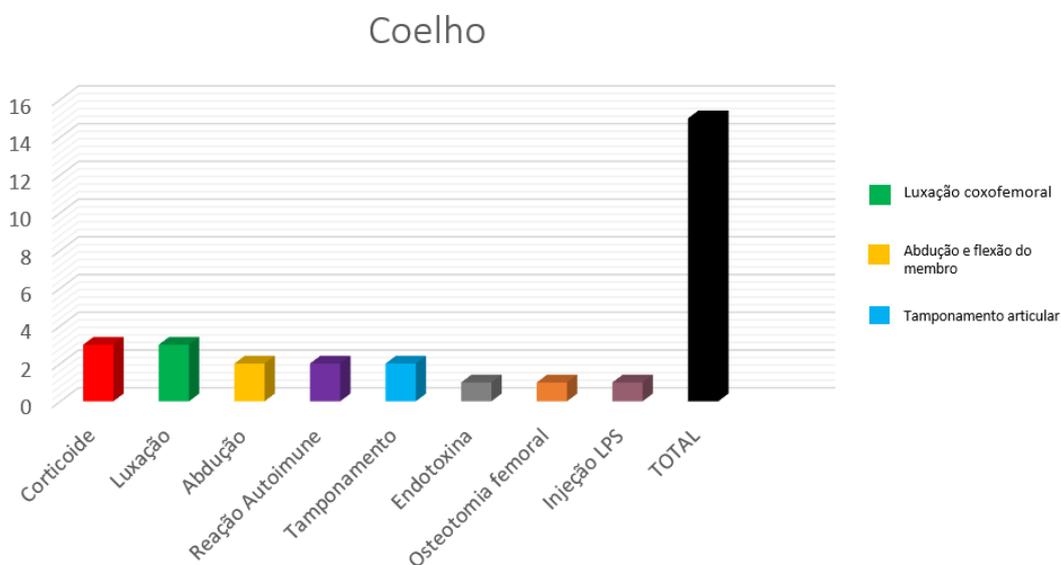
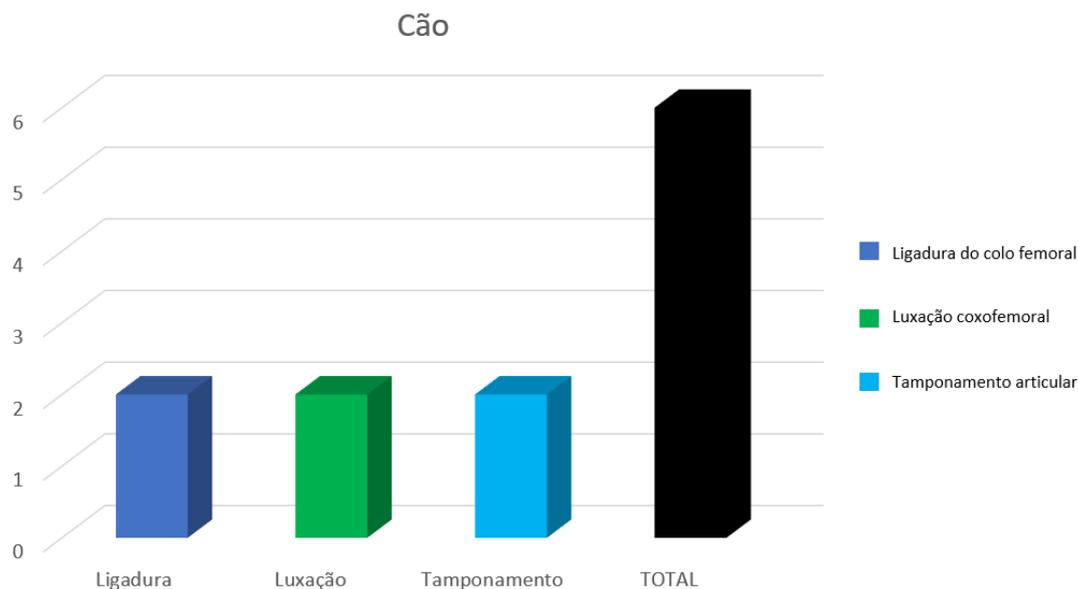


Gráfico 3 – Modelos experimentais para indução da necrose avascular da cabeça e diversas intervenções testadas nos cães



Comparando o modelo suíno com os de outras espécies, o coelho por possuir um colo femoral curto, não permite a correta aplicação da ligadura, e quando utilizada em cães, por possuírem uma vascularização na região do colo femoral maior em comparação aos suínos, ocasionará uma revascularização mais rápida após a indução da osteonecrose **(Robichon et al., 1974)**.

Também vale salientar que comparando os suínos com os ratos, os suínos têm o ciclo de remodelação óssea semelhante ao que ocorre com os humanos, quando comparado com os ratos **(Litten-Brown et al., 2010)**.

Pensando na biomecânica do quadril humano, a Ema por ser bípede, tem grande vantagem na semelhança anatômica em relação aos quadrúpedes, além

de ser um animal com uma dimensão da articular semelhante à das crianças. **(Conzemijs et al., 2002).**

Concordamos com autores como **Salter (1966), Kim e Su (2002) e Rang (1993)**, que a indução por ligadura operatória do colo femoral é a mais apropriada para a reprodução dos resultados observados em humanos, sendo útil principalmente para elucidar o desenvolvimento da patogênese da DLCP, servindo também para estudos de prevenção e terapêuticas para a doença. Em comparação aos métodos não invasivos, as vantagens das técnicas traumáticas, são devido as lesões necróticas concentrarem-se na cabeça femoral, diferentemente das técnicas não traumáticas onde a lesão atinge a metáfise femoral e outros ossos, quando induzida por uma reação sistêmica. Outra vantagem das técnicas invasivas é que podemos determinar o momento exato da lesão isquêmica, possibilitando o controle dos exames por imagem e histológico em todos os estágios do processo fisiopatológico, desde a fase isquêmica à fase de remodelamento.

6.1 Justificativa ao projeto piloto

No planejamento de uma pesquisa é essencial conduzir um projeto piloto. Somente com esta ação podemos descobrir os eventuais problemas que poderão surgir durante o desenvolvimento do projeto. O estudo piloto revelará os problemas de logística que poderão advir. Anestesia, custos com o armazenamento dos animais, facilidades e complicações em se trabalhar com a espécie animal elegida, a disponibilidade dos aparelhos de imagem e

laboratoriais onde serão realizados os exames durante os controles da evolução da doença no período pré e pós-operatório, a disponibilidade de instrumental cirúrgico específico para correta aplicação da técnica cirúrgica e os cuidados com o animal no pós-operatório.

6.2 Crítica ao método

Por ser um projeto piloto onde foi utilizado um único exemplar, não foi possível analisar as fases iniciais do processo isquêmico e as fases de remodelamento da osteonecrose. Salientamos, portanto, que o estudo de todo o processo de desenvolvimento da doença que segundo **Kim e Su (2002)** seriam da segunda até a décima segunda semana pós indução operatória, é de fundamental importância em trabalhos futuros, principalmente quando forem testados novos protocolos de tratamento para a DLCP.

No estudo piloto priorizamos demonstrar a factibilidade da indução da lesão isquêmica da cabeça femoral pela técnica operatória de capsulotomia parcial e ligadura do colo, método justificado por diversos trabalhos de Kim (**Kim e Su, 2002; Kim et al., 2004; Kim e Herring, 2011**).

Concordamos que houve a ausência da análise histológica comparativa com o lado controle (esquerdo), contudo, a avaliação histológica no piloto, serviu como prova objetiva da lesão isquêmica, em concordância com os achados de Rang e Kim, verificamos a proliferação da cartilagem epifisária da cabeça do fêmur do animal, a presença de osteoclastos e lacunas vazias dos osteocitos, com tecido vascular e adiposo de granulação; as alterações anatômicas ficaram

evidentes e na microscopia do fêmur operado, as alterações teciduais e celulares confirmaram o processo isquêmico.

Na avaliação radiográfica confirmamos a isquemia da cabeça femoral, bem semelhante aos resultados dos trabalhos descritos anteriormente. Foi possível observar o achatamento da cabeça femoral com aparência triangular da epífise e sub luxação lateral da articulação.

6.3 Novas perspectivas

Uma vez verificado que a indução da osteonecrose femoral por meio operatório causa alterações adicionais teciduais periarticulares, a indução por meio de cateterização e embolização das artérias femorais circunflexas, pode eliminar vieses causados pelo processo inflamatório e cicatricial adicional na análise da fisiopatologia no modelo.

O presente estudo evidenciou a similaridade entre os métodos de indução da osteonecrose por ligadura do colo femoral descritos anteriormente na revisão da literatura; o modelo piloto realizado na nossa pesquisa com a utilização da espécie suína obteve sucesso na indução da necrose avascular, assim confirmando ser factível em nossa instituição, servindo para estudos futuros. Mesmo se tratando de uma peça única, verificamos que o tempo de seis semanas pós indução cirúrgicas é capaz de induzir a osteonecrose devido às diversas alterações radiológicas, anatômicas e celulares que foram observadas.

A ausência de uma terapia plenamente satisfatória para a doença de Legg Calvé Perthes e a morbidade associada à lesão articular justificam a manutenção

de pesquisa científica sobre o tema e mesmo diante da evolução de “softwares” programas de computação capazes de mimetizar os eventos anatomopatológicos, a manutenção da experimentação animal para o estudo da necrose avascular da cabeça femoral ainda se faz necessária. A espécie canina também desenvolve a necrose asséptica da cabeça femoral, também sem nenhum tratamento completamente efetivo, sendo somente possível realizar a ressecção da cabeça femoral ou prótese total do quadril, procedimentos que podem causar limitação funcional (**Aguado e Goyenvalle, 2020**). Portanto, defendemos ainda a continuação do estudo experimental da isquemia da cabeça femoral, e a espécie suína foi a que melhor reproduziu a doença por sua similaridade anatômica ao humano, um relativo baixo custo de manutenção, facilidade em se trabalhar com a espécie e ainda por existir uma ampla literatura sobre o tema.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Podemos inferir que o modelo experimental suíno pode servir como uma ferramenta valiosa para a reprodutibilidade das alterações anatomopatológicas da necrose isquêmica da cabeça femoral em crescimento. O modelo é reprodutível e factível, servindo para estudos futuros sobre a anatomopatologia da necrose da cabeça do fêmur em crescimento.

8 ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo A - Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**MODELO EXEPERIMENTAL DO ESTUDO DA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES (DLCP) – ESTUDO EXEPERIMENTAL EM SUÍNOS**” protocolo nº 141/15 sob a responsabilidade de **Roberto Guarniero e Gustavo Bispo dos Santos**, apresentado pelo Departamento de Ortopedia e Traumatologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 25.09.2015

Vigência do Projeto	Agosto de 2017
Espécie/linhagem	Suíno Mini Pig Br1
Nº de animais	10
Peso/Idade	9 semanas
Sexo	macho
Origem	JR Mariano

CEUA-FMUSP, 25 de Setembro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

9. REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

Abraham R, Malkani AL. The etiology and pathogenesis of osteonecrosis. *Semin Arthroplasty*. 2004;15:132-9.

Adapala NS, Kim HK. Comprehensive genome-wide transcriptomic analysis of immature articular cartilage following ischemic osteonecrosis of the femoral head in piglets. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153174.

Adapala NS, Yamaguchi R, Phipps M, Aruwajoye O, Kim HKW. Necrotic bone stimulates proinflammatory responses in macrophages through the activation of Toll-Like Receptor 4. *Am J Pathol*. 2016;186(11):2987-99.

Aguado E, Goyenvalle E. Legg Calvé Perthes disease in the dog. *Morphologie*. 2020:S1286-0115(20)30121-1.

Alpaslan AM, Aksoy MC, Yazici M. Interruption of the blood supply of femoral head: an experimental study on the pathogenesis of Legg-Calve-Perthes Disease. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2007;127(6):485-91.

Barta O, Szepesi J, Molnár L. [Experimental aseptic necrosis of the femoral head in rabbits due to increase of the intraarticular pressure (author's transl)]. *Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb*. 1978;21(3):194-200.

Bassett GS, Apel DM, Wintersteen VG, Tolo VT. Measurement of femoral head microcirculation by laser doppler flowmetry. *J Pediatr Orthop*. 1991;11(3):307-13.

Bohr H, Baadsgaard K, Sager P. The vascular supply to the femoral head following dislocation of the hip joint: an experimental study in new-born rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1965;35:264-78.

Boss JH, Misselevich I. Osteonecrosis of the femoral head of laboratory animals: the lessons learned from a comparative study of osteonecrosis in man and experimental animals. *Vet Pathol*. 2003;40(4):345-54.

Calve J. Sur une forme particulière de pseudo-coxalgie greffée sur des déformations caractéristiques de l'extrémité. *Revue de Chirurgie*. 1910;42:54-84.

Calvert PT, Kernohan JG, Sayers DC, Catterall A. Effects of vascular occlusion on the femoral head in growing rabbits. *Acta Orthop Scand*. 1984;55(5):526-30.

de Camargo FP, de Godoy RM Jr, Tovo R. Angiography in Perthes' disease. *Clin Orthop Relat Res*. 1984;(191):216-20.

de Camargo FP. Revascularization of the neck of the femur in Legg-Calvé-Perthes syndrome; a new surgical technic; experience of 80 cases. *Clin Orthop*. 1957;10:79-86.

Catto M. A histological study of avascular necrosis of the femoral head after transcervical fracture. *J Bone Joint Surg Br.* 1965;47(4):749-76.

Chakraborty T. Dislocation of the hip joint (an experimental study). *J Western Pacific Orthop Assoc.* 1975;12:25-36.

Cheon JE, Yoo WJ, Kim IO, Kim WS, Choi YH. Effect of arterial deprivation on growing femoral epiphysis: quantitative magnetic resonance imaging using a piglet model. *Korean J Radiol.* 2015;16(3):617-25.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). *Princípios éticos na experimentação animal.* São Paulo: COBEA; 1991.

Conzemius MG, Brown TD, Zhang Y, Robinson RA. A new animal model of femoral head osteonecrosis: one that progresses to human-like mechanical failure. *J Orthop Res.* 2002;20(2):303-9.

Crawford CJ, LaBerge M, Allen BL Jr, Powers DL. Growth profiles and articular cartilage characterization in a goat model of Legg-Calve-Perthes disease. *J Invest Surg.* 1995;8(6):391-408.

Cruess RL, Ross D, Crawshaw E. The etiology of steroid-induced avascular necrosis of bone. A laboratory and clinical study. *Clin Orthop Relat Res.* 1975; 178-83.

Cui Q, Wang GJ, Su CC, Balian G. The Otto Aufranc Award. Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;(344):8-19.

Drescher W, Weigert KP, Büniger MH, Ingerslev J, Büniger C, Hansen ES. Femoral head blood flow reduction and hypercoagulability under 24 h megadose steroid treatment in pigs. *J Orthop Res.* 2004;22(3):501-8.

Fan M, Peng J, Qin L, Lu S. Experimental animal models of osteonecrosis. *Rheumatol Int.* 2011;31(8):983-94.

Favenesi JA, Gardeners JWM, Huiskes R, Sloof TJ. Mechanical properties of normal and avascular cancellous bone. In: Ducheyne P, Van der Perre G, Aubert AE, editors. *Biomechanics and biomaterials*. Amsterdam: Elsevier; 1983. p. 121-6.

Fisher DE, Bickel WH, Holley KE, Ellefson RD. Corticosteroid-induced aseptic necrosis. II. Experimental study. *Clin Orthop Relat Res.* 1972;84:200-6.

Freeman MA, England JP. Experimental infarction of the immature canine femoral head. *Proc R Soc Med.* 1969;62(5):431-3.

Gershuni DH, Hargens AR, Lee YF, Greenberg EN, Zapf R, Akeson WH. The questionable significance of hip joint tamponade in producing osteonecrosis in Legg-Calvé-Perthes syndrome. *J Pediatr Orthop.* 1983;3(3):280-6.

Godoy Junior RM. *A arteriografia na moléstia de Legg-Calvé-Perthes* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1988.

Guarniero R, Adachi PP, Gouveia LAM. The results of femoral varus osteotomy for the treatment of Legg-Calvé-Perthes disease. *MAPFRE Med.* 1995;6(Suppl III):139-40.

Guarniero R, Ishikawa MT, Luzo CA, Montenegro NB, de Godoy RM. Resultados da osteotomia femoral varizante no tratamento da doença de Legg-Calvé-Perthes (DLCP). *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 1997;52(3):132-5.

Guarniero R. Legg-calvé-perthes disease: 100 years. *Rev Bras Ortop.* 2011;46(1):1-2.

Guerado E, Caso E. The physiopathology of avascular necrosis of the femoral head: an update. *Injury.* 2016;47 Suppl 6:S16-S26.

Henard DC, Calandruccio RA. Experimental production of roentgenographic and histological changes in the capital femoral epiphysis following abduction, extension, and internal rotation of the hip. *J Bone Joint Surg Am.* 1970;52(3):600-1.

Hirano T, Iwasaki K, Yamane Y. Osteonecrosis of the femoral head of growing, spontaneously hypertensive rats. *Acta Orthop Scand.* 1988;59(5):530-5.

Hofstaetter JG, Wang J, Yan J, Glimcher MJ. The effects of alendronate in the treatment of experimental osteonecrosis of the hip in adult rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(3):362-70.

Howe WW Jr, Lacey T, Schwartz RP. A study of the gross anatomy of the arteries supplying the proximal portion of the femur and the acetabulum. *J Bone Joint Surg Am*. 1950;32(4):856-66.

Irisa T, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Iwamoto Y, Sugioka Y, Sueishi K. Osteonecrosis induced by a single administration of low-dose lipopolysaccharide in rabbits. *Bone*. 2001;28(6):641-9.

Jaramillo D, Villegas-Medina OL, Doty DK, Dwek JR, Ransil BJ, Mulkern RV, Shapiro F. Gadolinium-enhanced MR imaging demonstrates abduction-caused hip ischemia and its reversal in piglets. *AJR Am J Roentgenol*. 1996;166(4):879-87.

Jones LC, Allen MR. Animal models of osteonecrosis. *Clin Rev Bone Miner Metab*. 2011;9:63-80.

Kamegaya M, Shinada Y, Akita T, Ogata S, Someya M, Tsuchiya K. Experimental avascular necrosis of the femoral capital epiphysis and induced subluxation of the hip in young rabbits. *J Pediatr Orthop*. 1990;10(1):1-5.

Kemp HB. Perthes' disease: the influence of intracapsular tamponade on the circulation in the hip joint of the dog. *Clin Orthop Relat Res.* 1981;(156):105-14.

Kim HK, Su PH. Development of flattening and apparent fragmentation following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis in a piglet model. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(8):1329-34.

Kim HK, Bian H, Randall T, Garces A, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Increased VEGF expression in the epiphyseal cartilage after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. *J Bone Miner Res.* 2004;19(12):2041-8.

Kim HK, Herring JA. Pathophysiology, classifications, and natural history of Perthes disease. *Orthop Clin North Am.* 2011;42(3):285-95

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;83(5):688-97.

Kistler G. Sequences of experimental infarction of the femur in rabbits. *Arch Surg.* 1934;29:589-611.

König HE, Liebich HG (editores). *Veterinary anatomy of domestic animals: textbook and colour atlas.* 7^o ed. Viena, Munique: Thieme; 2019.

Legg AT. An obscure affection of the hip joint. 1910. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;451:11-3.

Litten-Brown JC, Corson AM, Clarke L. Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *Animal.* 2010;4(6):899-920.

Malizos KN, Quarles LD, Seaber AV, Rizk WS, Urbaniak JR. An experimental canine model of osteonecrosis: characterization of the repair process. *J Orthop Res.* 1993;11(3):350-7.

Manggold J, Sergi C, Becker K, Lukoschek M, Simank HG. A new animal model of femoral head necrosis induced by intraosseous injection of ethanol. *Lab Anim.* 2002;36(2):173-80.

Mariano M. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental: o minipig br1. *Acta Cir Bras.* 2003;18(5):387-91.

Matsui M, Ohzono K, Nakamura N, Sugano N, Masuhara K, Nakata K, Takaoka K, Ono K, Ochi T. The immune reaction to heterologous serum causes osteonecrosis in rabbits. *Virchows Arch.* 1995;427(2):205-11.

Menezes NM, Connolly SA, Shapiro F, Olear EA, Jimenez RM, Zurakowski D, Jaramillo D. Early ischemia in growing piglet skeleton: MR diffusion and perfusion imaging. *Radiology.* 2007;242(1):129-36.

Miltner LJ, Hu CH. Osteochondritis of the head of the femur: an experimental study. *Arch Surg*. 1933;27(4):645-57.

Newton B, Crawford CJ, Powers DL, Allen BL Jr. The immature goat as an animal model for Legg-Calvé-Perthes disease. *J Invest Surg*. 1994;7(5):417-30.

Nishino M, Matsumoto T, Nakamura T, Tomita K. Pathological and hemodynamic study in a new model of femoral head necrosis following traumatic dislocation. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1997;116(5):259-62.

Perthes G. Uber arthritis deformans juvenilis. *Deutsch Zeit f Chir*. 1910;107:111-59.

Rang M. Perthes Disease. IN: Wenger DR, Rang M. *The art of practice of children's orthopaedics*. New York: Raven Press; ©1993. Chap 10. p. 297-330.

Robichon J, Desjardins JP, Koch M, Hooper CE. The femoral neck in Legg-Perthes' disease. Its relationship to epiphysial change and its importance in early prognosis. *J Bone Joint Surg Br*. 1974;56(1):62-8.

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;25(3):300-4.

Sagara K. [Avascular necrosis in the femoral head of spontaneously hypertensive rats--correlation between microangiographic and histological findings]. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1990;64(4):240-8.

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;12(1):44-61.

Salter RB. Experimental and Clinical Aspects of Perthes Disease. In: Proceedings of a Joint Meeting of the American Physicians' Fellowship and the Israeli Orthopaedic Society. *J Bone and Joint Surg Br*. 1966; 48(2):393-4.

Sanchis M, Zahir A, Freeman MA. The experimental simulation of Perthes disease by consecutive interruptions of the blood supply to the capital femoral epiphysis in the puppy. *J Bone Joint Surg Am*. 1973;55(2):335-42.

Schulitz KP, Dustmann HO, Sinn H. [May Perthes' disease be due to venous block? Experimental investigations on growing pigs]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 1977;115(3):299-304.

Shapiro F, Connolly S, Zurakowski D, Flynn E, Jaramillo D. Acetabular changes associated with avascular necrosis of the femoral head in a piglet model. *Bone Joint Res*. 2014;3(4):130-8.

Shapiro F, Connolly S, Zurakowski D, Menezes N, Olear E, Jimenez M, Flynn E, Jaramillo D. Femoral head deformation and repair following induction of ischemic necrosis: a histologic and magnetic resonance imaging study in the piglet. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(12):2903-14.

Singleton WB, Jones EL. The experimental induction of subclinical Perthes' disease in the puppy following arthrotomy and intracapsular tamponade. *J Comp Pathol.* 1979;89(1):57-71.

Sisson S, Grossman JD. *Anatomia de los animales domesticos.* Barcelona: Salvat; 1975.

Smith SR, Malcolm AJ, Gregg PJ. Metaphyseal changes in Perthes' disease: an experimental study. *Br J Exp Pathol.* 1982;63(6):633-8.

Tsuji T, Sugano N, Sakai T, Yoshikawa H. Evaluation of femoral perfusion in a non-traumatic rabbit osteonecrosis model with T2*-weighted dynamic MRI. *J Orthop Res.* 2003;21(2):341-51.

Upasani VV, Jeffords ME, Farnsworth CL, Padilla D, Lopreiato N, Aruwajoye OO, Kim HKW. Ischemic femoral head osteonecrosis in a piglet model causes three dimensional decrease in acetabular coverage. *J Orthop Res.* 2018;36(4):1173-7.

Wang KZ, Mao LZ, Hu CG. [Experimental study on mechanism of steroid-induced avascular necrosis of femoral head]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 1994;32(9):515-7.

Yamamoto T, Hirano K, Tsutsui H, Sugioka Y, Sueishi K. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. *Clin Orthop Relat Res*. 1995;(316):235-43.

Yan 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;83(5):688-97.

Yan Z, Hang D, Guo C, Chen Z. Fate of mesenchymal stem cells transplanted to osteonecrosis of femoral head. *J Orthop Res*. 2009;27(4):442-6.

Zhang P, Liang Y, Kim H, Yokota H. Evaluation of a pig femoral head osteonecrosis model. *J Orthop Surg Res*. 2010 6;5:15.