

HENRIQUE MACEDO NEUENSCHWANDER

Comparação dos efeitos da aplicação intra-articular de ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo de sinovite aguda induzida por LPS em equinos



São Paulo
2016

HENRIQUE MACEDO NEUENSCHWANDER

Comparação dos efeitos da aplicação intra-articular de ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo de sinovite aguda induzida por LPS em equinos

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

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

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

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3365
FMVZ

Neuenschwander, Henrique Macedo

Comparação dos efeitos da aplicação intra-articular de ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo de sinovite aguda induzida por LPS em equinos / Henrique Macedo Neuenschwander. -- 2016.

81 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

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

1. Ácido hialurônico. 2. LPS. 3. Equinos. 4. Sinovite. 5. Líquido sinovial. I. Título.

BIOÉTICA



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comparação dos efeitos da aplicação intra-articular de diferentes pesos moleculares de ácido hialurônico em modelo de sinovite aguda induzida por LPS em equinos", protocolado sob o CEUA nº 4376260615, sob a responsabilidade de **Raquel Yvone Arantes Baccarin e equipe; Henrique Macedo Neuenschwander** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 20/05/2016.

We certify that the proposal "Comparison of the effects of intra-articular application of different molecular weight hyaluronic acid in a model of LPS-induced acute synovitis in the horse", utilizing 12 Equines (12 males), protocol number CEUA 4376260615, under the responsibility of **Raquel Yvone Arantes Baccarin and team; Henrique Macedo Neuenschwander** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/20/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07.2015** a **11.2015** Área: **Clínica Médica Veterinária**

Procedência: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Equídeos** sexo: **Machos** idade: **a** N: **12**
Linhagem: **Árabe** Peso: **a**

Resumo: A sinovite e as osteoartrites são umas das principais afecções do sistema locomotor sendo responsável por até 60% das claudicações (McILWRAIT, 2012). Devido a sua alta prevalência e por impedir que os cavalos exerçam a sua função é crescente a procura por novas opções terapêuticas que venham abreviar o curso dessas enfermidades, reduzir o processo inflamatório e suas sequelas.

O desenvolvimento dessas afecções está associado com uma cascata de eventos bioquímicos mediados por citocinas, enzimas proteolíticas e outras substâncias pro-inflamatórias.

As principais opções terapêuticas para os equinos são os Aines e corticoides, que além de inúmeros efeitos colaterais, o seu uso é limitado para os atletas por se tratar de uma substância proibida nas competições. Por isso o ácido hialurônico e outras terapias regenerativas tem ganhado espaço, porém estudos que comprovem qual a quantidade, e qual o melhor momento precisam ser feitos.

O modelo de indução de sinovite por LPS é bem estudado e delineado em equinos, sendo consideração ideal para o estudo de afecções agudas em equinos, por ter um padrão de citocinas inflamatórias bem parecido com as lesões ortopédicas e por se tratar de um modelo de inflamação transitória.

Local do experimento:

São Paulo, 27 de junho de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NEUENSCHWANDER, Henrique Macedo

Título: **Comparação dos efeitos da aplicação intra-articular de ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo de sinovite aguda induzida por LPS em equinos**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Ricardo e C athia, por
me darem a oportunidade e apoio
de perseguir meus sonhos,*

*Aos meus amigos e familiares, por
serem a base de tudo.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Anhembi Morumbi, onde tudo começou e que me deu a base necessária para realizar meu trabalho.

Ao meu amigo, professor e colega, Neimar Roncati, obrigado pela oportunidade de trabalhar e conviver ao seu lado, pela paciência e ensinamentos, e por permitir e entender a importância da realização do mestrado.

Aos meus amigos e professores Carla B. Belli, Wilson R. Fernandes, Luís Claudio Lopes Correa da Silva, André L.V. de Zoppa, Rodrigo Romero Correa, Cristina O. Massoco Salles Gomes.

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

À minha orientadora Raquel Yvonne Arantes Baccarin, que me permitiu conciliar meu trabalho a campo com o mestrado, teve paciência e sabedoria de gerenciar o andamento do trabalho.

Às minhas companheiras de pós-graduação, Cynthia, Fernanda, Juliana, Joice, Sarah, que me ajudaram em todos os momentos, desde o cuidado com os cavalos, coletas, análises, confecção e entrega.

Aos meus colegas e amigos de residência e mestrado, Kaio, Paulo, Maria Leticia, Guilherme, Ayrton, Talissa, Fernandas, Cris, Paolo, Thiago, Gustavo, Patricia, Caroline, por tornarem essa experiência fantástica.

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

Aos funcionários Rosendo, Gervásio, Felipe, Ganga e a toda equipe de residentes.

À Profa Yara M Michelacci, Prof. Marcelo, Ciça, que generosamente nos receberam na UNIFESP, para realização do trabalho e sugestões para mensuração do AH.

À Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, Herculano e Vagner, pela ajuda com a citometria de fluxo,

À Nicole, sem você nada disso teria acontecido, obrigado pela ajuda com a citometria, análise e estatística

Aos meus pais e minha namorada, que sempre me ajudaram em todos os momentos.

Aos animais que, involuntariamente, ajudaram neste trabalho.

EPÍGRAFE

“ Se vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

NEUENSCHWANDER, H. M. **Comparação dos efeitos da aplicação intra-articular de ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo de sinovite aguda induzida por LPS em equinos.** [Comparison of the effects of intra-articular application of different molecular weights of hyaluronic acid in a model of LPS-induced acute equine synovitis]. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Diversos experimentos em humanos e equinos discutem a eficácia do uso intra-articular do ácido hialurônico (AH). Pouco se sabe a respeito de seu potencial pró ou anti-inflamatório, bem como sobre a eficácia das moléculas de AH de diferentes pesos moleculares. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos anti-inflamatórios, anabólicos e antioxidantes da aplicação intra-articular de AH em sinovite aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em equinos. Foram utilizadas 24 articulações metacarpofalangeanas hípidas de 12 equinos jovens, avaliadas por exame físico, radiográfico e ultrassonográfico. As articulações foram divididas aleatoriamente em três grupos de oito, sendo o grupo controle tratado com triancinolona (TA) (10 mg), o grupo AH de baixo peso molecular (AH-BPM), e o grupo AH de alto peso molecular (AH-APM). Inicialmente, foram aplicados 0,25 ng de LPS por via intra-articular (momento 0). Após uma hora (momento 1), coletou-se líquido sinovial (LS) para contagem celular e imediatamente após realizado o tratamento com TA, AH-BPM ou AH-APM. Posteriormente, LS foi coletado nos momentos 8, 24 e 48 horas para contagem celular, avaliação do *burst* oxidativo, quantificação de prostaglandina E₂ (PGE₂), condroitim sulfato (CS), AH e mensuração do peso molecular do AH. Exame físico dos animais, incluindo mensuração da circunferência articular e avaliação de claudicação por meio do equipamento Lameness Locator® foi realizado em todos os momentos. As frequências cardíaca e respiratória dos animais aumentaram em todos os grupos às 8 horas (P<0,05), sendo menor no grupo TA. Em relação à circunferência articular o grupo AH-BPM apresentou maior aumento às 24 e 48 horas em relação aos outros grupos (p<0,05). O grau de claudicação do grupo AH-APM foi maior que o do grupo TA às 8 e 24 horas, mas similar ao grupo AH-BPM. O grupo TA apresentou maior quantidade de células nucleadas no LS do que o grupo AH-BPM as 24 e 28 horas e do que o grupo AH-APM às 48 horas. A concentração de PGE₂ foi menor no grupo TA em relação ao grupo AH-APM às 8 horas, e a ambos os grupos que receberam AH às 48 horas (p<0,05). O grupo AH-APM mostrou maior concentração de AH às 8 horas do que os outros grupos, contudo às 48 horas o grupo TA mostrou maior concentração de AH do que os outros grupos (p<0,05). Também às 48 horas o grupo TA foi o que apresentou a menor

porcentagem de AH de alto peso molecular ($p < 0,05$). A maior concentração de CS no LS às 24 e 48 horas ocorreu no grupo TA, também observou-se o grupo TA foi o único em que a concentração de CS aumentou as 8 horas em relação aos valores basais. O grupo AH-APM foi o que apresentou menor concentração de CS às 8 horas ($p < 0,05$). O grupo tratado com AH-BPM apresentou maior intensidade de fluorescência nos momentos 24 e 48 horas ($p < 0,05$). Apesar da triancinolona possuir efeito superior ao ácido hialurônico no controle da inflamação, ela possui efeito catabólico sobre a cartilagem articular, demonstrado pelo aumento da concentração de CS, além de quebra da molécula de AH no líquido sinovial. O AH-APM é mais indicado para terapia intra-articular em equinos uma vez que demonstrou menor efeito catabólico e oxidativo do que o AH-BPM.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. LPS. Equinos. Sinovite. Líquido sinovial.

ABSTRACT

NEUENSCHWANDER, H. M. **Comparison of the effects of intra-articular application of different molecular weights of hyaluronic acid in a model of LPS-induced acute equine synovitis.** [Comparação dos efeitos da aplicação intra-articular de ácido hialurônico de diferentes pesos moleculares em modelo de sinovite aguda induzida por LPS em equinos]. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Several experiments have compared the efficacy of intra-articular usage of hyaluronic acid (HA) within horses. Little is known about the effectiveness of different subtypes of HA in terms of its pro- and anti-inflammatory potential. The goal of this study was to investigate the anti-inflammatory, anabolic and antioxidant effects of intra-articular application of HA in acute synovitis induced by lipopolysaccharide (LPS) in horses. 24 metacarpophalangeal joints of 12 young horses without musculoskeletal alterations were subjected to lameness examination (Lameness Locator®), radiography and ultrasound. These joints were divided into three groups: a positive control group treated with triamcinolone acetone (TA) (10mg) and 2 experimental groups treated with either hyaluronic acid of low molecular weight (HA-LMW) or hyaluronic acid of high molecular weight (HA-HMW). Initially, all joints were injected with 0.25ng of LPS. After an hour, synovial fluid (SF) was collected for cell counting. TA, HA-HMW or HA-LMW treatments were then applied to the joints. After treatment applications, SF was collected at 3 different time points (8, 24 and 48 hours) for cell counts, oxidative burst evaluation, prostaglandin E2 (PGE₂) quantification, chondroitin sulfate (CS), HA and molecular weight measurements. Physical examinations, circumference measurements and lameness evaluations were carried out at each time point. The heart and respiratory rate of the animals increased in all groups at 8 hours ($p < 0.05$), that increase was lower in the TA group. Regarding the circumference of the joint the HA-LMW group showed a greater increase at 24 and 48 hours compared to the other groups ($p < 0.05$). The lameness of the HA-HMW group was higher than the TA group at 8 and 24 hours, but similar to the HA-LMW group. The TA group had a higher nucleated cells count in the SF compared to the HA-LMW group at 24 hours and 28 hours, and higher than the HA-HMW group at 48 hours. The PGE₂ concentration was lower in the TA group in relation to the HA-HMW group at 8 hours, and lower than both groups that received HA at 48 hours ($p < 0.05$). The HA-HMW group showed higher HA concentration at 8 hours than the other groups at 48 hours. However, the TA group showed higher HA concentration than the other groups ($p < 0.05$). Also, at 48 hours the TA group was the one with the lowest percentage of high molecular weight HA ($p < 0.05$).

The highest concentration of CS in SF at 24 and 48 hours occurred in the TA group, and it was also observed in the TA group was the only one in which the concentration of CS increased at eight hours compared to baseline. The HA-HMW group showed the lowest concentration of CS at 8 hours ($p < 0.05$). The group treated with HA-LMW showed higher fluorescence intensity at 24 and 48 hours ($p < 0.05$). Although triamcinolone has a superior effect of hyaluronic acid in controlling inflammation, it has catabolic effects on cartilage, shown by increased concentration of CS, and breakage of the HA molecule in synovial fluid. The HA-HMW is recommended for intra-articular therapy in equine joints since it showed less oxidative and catabolic effects.

Keywords: Hyaluronic acid. Equine. LPS. Synovitis. Synovial fluid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem fotográfica indicando a localização dos sensores Lameness Locator® para exame de claudicação 35
- Figura 2 - Coleta de líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana no momento 0 hora. 37
- Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 0, 8, 24, 48 horas de um equino do grupo tratado com TA 50
- Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 0, 8, 24, 48 horas de um equino do grupo tratado do AH-BPM 50
- Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do líquido sinovial nos momentos 0, 8, 24, 48 horas de um equino do grupo tratado do AH-APM 51
- Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose do peso molecular do AH, respectivamente referentes a dois animais tratados com TA, dois animais tratados com AH-APM, padrão de traqueia bovina e padrão crista de galo 53

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Média da frequência cardíaca dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 201643
- Gráfico 2 - Média da frequência respiratória dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 201644
- Gráfico 3 - Média da temperatura retal dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 201645
- Gráfico 4 - Média da circunferência articular dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 201646
- Gráfico 5 - Média da soma de vetores na avaliação realizada pelo equipamento lameness locator (claudicação) dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 201647
- Gráfico 6 - Média da contagem total de células nucleadas presentes no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM– São Paulo - 201648
- Gráfico 7 - Concentração média de PGE2 presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 201649
- Gráfico 8 - Concentração média de ácido hialurônico presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 201651

Gráfico 9 - Concentração média de condroitim sulfato presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016	52
Gráfico 10 - Porcentagem de AH de alto peso molecular presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016	53

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Raça, idade (meses), peso (quilogramas) e sexo dos animais utilizados e tratamento administrado em cada articulação metacarpofalangeana – São Paulo – 2016.....	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
AH	Ácido hialurônico
AH-APM	Ácido hialurônico de alto peso molecular
AH-BPM	Ácido hialurônico de baixo peso molecular
AP-1	Proteína ativadora-1
Cetavlon	Brometo de cetiltrimetilamônio
CS	Condroitim sulfato
CD44	Molécula de adesão pertencente à família glicoproteínas transmembranas
Da	Dalton
DMB	Azul de 1,9-dimetilmetileno
DI	Decilitro
ERK	Quinase regulada pela sinalização extracelular
EROs	Espécies reativas do oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
g	Grama
GAG	Glicosaminoglicano
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IKK	Inibidor da quinase κB
IκB	Inibidor do NF-κB
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-18	Interleucina 18
IRAK-M	Quinase associada ao receptor IL-1
kDa	Quilodalton
LPS	Lipopolissacarideo
LS	Líquido sinovial
M	Molar
MAP	Proteína ativada por mitógenos
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
MPK-1	Proteína quinase ativada por fosfatase -1
mg	Miligrama
MIF	Média de intensidade de fluorescência
ml	Mililitro
mm	Milímetros
MKP-1	Mitógeno da proteína quinase ativada fosfatase-1
MMP	Metaloproteinase

ng	Nanograma
NF- κ B	Fator nuclear κ B
OA	Osteoartrite
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Proteoglicanos
pH	Potencialde hidrogênio
TA	Triancinolona
TAK-1	Quinase 1 ativadora do fator de crescimento β
TLR4	Receptor <i>toll-like</i> 4
TRAF-6	Fator de necrose tumoral associado ao receptor do fator 6
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	SINOVITE.....	22
2.1.1	Sinovite experimentalmente induzida	23
2.2	TERAPIAS INTRA-ARTICULARES.....	24
2.2.1	Ácido hialurônico	24
2.2.1.1	Métodos para quantificação do AH.....	27
2.2.1.2	Peso molecular	27
2.2.2	Triancinolona	28
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	31
5	MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1	ANIMAIS.....	32
5.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	33
5.2.1	Exame clínico para seleção dos animais	33
5.2.2	Exame ultrassonográfico	33
5.2.3	Exame radiográfico	34
5.2.4	Avaliação física dos animais	34
5.2.4.1	Avaliação física articular.....	34
5.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
5.4	INDUÇÃO DA SINOVITE COM LPS	36
5.5	PREPARO DO ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR	36
5.6	ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL (LS).....	37
5.6.1	Coleta do LS	37
5.6.2	Processamento do LS	38
5.6.3	Contagem total de células	38
5.6.4	Determinação da PGE2	38
5.6.5	Determinação dos GAGs	39
5.6.6	Mensuração do peso molecular do AH do líquido sinovial	40
5.6.7	Análise do burst oxidativo por citometria de fluxo	40
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42

7	RESULTADOS	43
7.1	AVALIAÇÃO FÍSICA DOS ANIMAIS	43
7.1.1	Frequência cardíaca	43
7.1.2	Frequência respiratória	43
7.1.3	Temperatura retal	44
7.1.4	Circunferência articular	45
7.1.5	Análise de Claudicação	46
7.2	CONTAGEM TOTAL DE CÉLULAS	47
7.3	PROSTAGLANDINA E2	48
7.4	DETERMINAÇÃO DOS GAGS	49
7.4.1	Concentração de AH	49
7.4.2	Condroitim sulfato (CS)	52
7.5	PORCENTAGEM DE AH DE ALTO PESO MOLECULAR PRESENTE NO LS	52
7.6	BURST OXIDATIVO	54
8	DISCUSSÃO	55
9	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Os equinos têm sido amplamente utilizados tanto para o trabalho quanto para o esporte. A crescente utilização desses animais nas diferentes modalidades atléticas tem gerado uma série de lesões articulares, sendo a osteoartrite (OA) e, conseqüentemente o seu processo inicial, a sinovite, as mais comuns. A procura de terapias que prolonguem a vida atlética desses animais e que, especialmente, possam ser utilizadas em competições, é desejada.

A OA é uma das principais afecções do sistema locomotor dos equinos; estudos estimam que seja responsável por 60 % das claudicações nesta espécie (McILWRAITH, 2012). O desenvolvimento da OA está associado a uma cascata de eventos bioquímicos mediados por citocinas, enzimas proteolíticas e outras substâncias pró-inflamatórias como prostaglandinas e óxido nítrico, culminando na degradação cartilágnea, formação de osteofítos, esclerose do osso subcondral, alteração de cápsula articular e inflamação da membrana sinovial (SAMUELS; KRASNOKUTSKY; ABRAMSON, 2008).

Dentre as potenciais causas de OA nos equinos, o microtrauma repetitivo é, provavelmente, o fator patogênico mais comum, e a consistente relação com o local das lesões em cavalos atletas suporta esta hipótese (CARON, 2011).

A queda de performance ou encerramento precoce das atividades nos animais acometidos faz com que seja crescente a procura por opções terapêuticas que venham abreviar o curso destas enfermidades, reduzir o processo inflamatório e suas sequelas. É desejado que essas terapias, tenham os menores efeitos colaterais possíveis, e que possam ser utilizadas em animais que são constantemente submetidos ao controle de antidopagem.

A injeção intra-articular de ácido hialurônico (AH) foi introduzida na década de 90 como uma opção para o tratamento de OA em equinos (GAUSTAD; LARSEN, 1995). O AH, também chamado de hialuronan ou hialuronato, consiste em unidades repetidas de dissacarídeos (ácido D-glicurônico e N-acetil-D-glicosamina) e é sintetizado na porção citoplasmática da membrana celular (STERN; ASARI; SUGAHARA, 2006). Ele é um importante componente da matriz extracelular de praticamente todos os tecidos conjuntivos de mamíferos, e também da cartilagem, onde desempenha papel fundamental na organização e manutenção dos agregados de agregam, responsáveis pela retenção de água no tecido. Além disso, HA é um importantíssimo componente do líquido sinovial, sendo responsável por suas propriedades viscoelásticas.

A viscosuplementação é a injeção de AH exógeno nas articulações diartrodiais, visando restaurar as propriedades reológicas do líquido sinovial (LS), com objetivo mecânico, analgésico, anti-inflamatório e condroprotetor (DE RENDE; DE CAMPOS, 2012).

A maioria dos trabalhos a respeito das funções físico-químicas protetoras do AH aponta para um efeito diretamente proporcional ao peso molecular. Porém, grande parte desses trabalhos são experiências *in vitro*, e alguns autores acreditam que o efeito *in vivo* não seria o mesmo, pois justamente o grande tamanho molecular impediria o AH de passar do meio intra-articular para o meio intercelular, sendo assim, incapaz de agir nos sinoviócitos e condrócitos.

Verificou-se também que a presença de HA de menor peso molecular (produto de degradação parcial) se correlaciona com dor (BAND et al., 2015) e que HA de alto peso molecular possui maior efeito inibitório sobre a expressão de prostaglandina E₂ (PGE₂) do que HA de baixo peso molecular, resultando em maior efeito condroprotetor (YASUI et al., 2015), além de várias outras ações (FIERLINGER et al., 2015).

Diante destas controvérsias, este estudo visa avaliar os efeitos da aplicação intra-articular de AH de diferentes pesos moleculares, observando os efeitos anti-inflamatório, anabólico e antioxidante em articulações com sinovite aguda induzida por LPS. Também pretendeu-se comparar estes efeitos com os produzidos por um corticosteroide comumente utilizado nas injeções intra-articulares em equinos, a triancinolona.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SINOVITE

A sinovite é caracterizada por edema articular, decorrente do espessamento sinovial ou da efusão articular. A sinovite que ocorre na OA pode ser um fenômeno primário, consequência de trauma ou sobrecarga articular, ou, ainda, pode ocorrer após infecção ou injeção intra-articular. Estudos utilizando ultrassom e ressonância magnética demonstraram a presença de sinovite em OA, com quase nenhuma alteração cartilágnea ou no osso subcondral (BENITO et al., 2005).

As células da membrana sinovial são as maiores fontes dos componentes do LS. O LS é um filtrado do plasma, grande parte dos seus íons e moléculas é encontrada no plasma, com a exceção do AH, que é encontrado em grande concentração somente no LS (MCILWRAITH; TROTTER, 1996). Os componentes do LS contribuem para as propriedades funcionais da superfície articular e modulam a atividade dos condrócitos. Duas moléculas importantes produzidas pelas células de revestimento sinovial, são a lubrificina e o ácido hialurônico (AH), que ajudam a proteger e manter a integridade das articulações diartrodiais (HUI et al., 2012).

A membrana sinovial age como uma membrana semipermeável controlando a passagem de moléculas para dentro e fora do espaço articular, mantendo a composição do LS, essencial para preservação do estado fisiológico da cartilagem articular. Em condições normais, moléculas de alto peso molecular, como AH, não são prontamente permeáveis, enquanto moléculas menores como fatores de crescimento, e citocinas são difundidas pela membrana sinovial. Essa permeabilidade permite a retenção de moléculas de alto peso molecular dentro da articulação, e previne que moléculas grandes, como proteínas plasmáticas, de adentrem e serem depositadas; ou alterarem a viscosidade e composição do LS. Uma vez a membrana sinovial estando inflamada, ocorre aumento de permeabilidade, resultando na alteração da concentração de AH e lubrificina e no peso molecular de AH, fatos observados em doenças articulares (SCANZELLO; GOLDRING, 2012).

Com a progressão do estímulo, a membrana sinovial se torna uma potencial fonte de liberação direta de PGE₂, óxido nítrico, espécies reativas do oxigênio (EROs), citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1), e enzimas lisossomais, particularmente metaloproteinases neutras e agreganases, resultando na degradação da matriz

extracelular cartilaginosa (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; SCANZELLO; GOLDRING, 2012).

2.1.1 Sinovite experimentalmente induzida

A infiltração intra-articular de LPS é um modelo estabelecido para indução de inflamação local em cavalos (KAY et al., 2008). Quando comparado com cães e outros mamíferos, os equinos são considerados como sendo 10 vezes mais suscetíveis ao LPS, sugerindo que seus condrócitos podem ser mais responsivos quando comparado a outras espécies (MACDONALD et al., 1994).

Com o objetivo de estudar o efeito causado no metabolismo intra-articular de diferentes doses de LPS, obtido da *Escherichia coli* O55: b5, foram utilizados 19 potros quarto de Milha jovens, submetidos à infiltração da articulação radiocárpica com 0,25 ng e 0,50 ng de LPS. Coletas do LS foram realizadas nos tempos 0, 2, 12, 24, 168 e 336 horas pós injeção, para quantificação de PGE₂ e glicosaminoglicanos, por meio de *kit* comercial de ELISA. Além disso, foi mensurada temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória, circunferência articular e análise da claudicação. Foi observado que a circunferência e a escore de claudicação aumentou de acordo com o tempo, e que o grupo tratado com LPS, apresentou maior escore a partir de 12 horas, comparado com o grupo controle. A concentração de PGE₂ foi linearmente influenciada pelo tratamento, com o pico às 12 horas após injeção. A frequência cardíaca e respiratória e temperatura retal, não mostraram sinais de doença sistêmica (LUCIA et al., 2013).

Ross et al. (2012) avaliou a resposta inflamatória, comparando dois modelos de indução de sinovite aguda. Foram utilizados 12 equinos adultos, que receberam na articulação radiocárpica 0,50 ng de LPS ou 100 ng de interleucina recombinante equina 1 beta. A avaliação da resposta clínica, bem como frequência cardíaca, respiratória, temperatura retal e exame de claudicação, foram realizadas nos tempos 0, 4, 8 e 240 horas pós-injeção. Foi feita coleta do líquido sinovial para contagem e diferenciação celular e proteína total, nos tempos 0, 4, 8, 24, 48 horas pós-injeção. No momento 8 horas após a injeção foi realizada biópsia da membrana sinovial e da cartilagem articular. Todos os animais apresentaram maior grau de claudicação no tempo 4 horas pós-injeção, o que se manteve às 8 horas. Tanto a PGE₂ e a metaloproteinases demonstraram valores mais elevados quando comparados ao controle.

Outro estudo, investigou os efeitos do tratamento com fenilbutazona, na inflamação articular e biomarcadores derivados da cartilagem em equinos submetidos à sinovite aguda induzida com LPS. Foi feita a indução da sinovite com 1ng de LPS; o líquido sinovial foi coletado nos tempos 0, 8, 24, 48, 168, 336 e 672 horas, sendo realizada a contagem de leucócitos e concentração de proteína total, substância P, glicosaminoglicanos, atividade das metaloproteinases, marcador de clivagem de colágeno C2C e marcador de síntese CPII. Artroscopias foram realizadas nos tempos -504, 48, 672 horas. A injeção de LPS causou uma sinovite transitória sem alteração cartilaginosa. Apenas a concentração de CPII foi menor nos tempos 24 e 168 horas no grupo tratado, quando comparado ao placebo (DE GRAUW et al., 2014).

2.2 TERAPIAS INTRA-ARTICULARES

2.2.1 Ácido hialurônico

O AH é um glicosaminoglicano, não sulfatado composto exclusivamente de unidades dissacarídicas repetitivas de N-acetilglucosamina e ácido glucurônico. Embora tenha uma estrutura química menos complexa que outros glicosaminoglicanos, as cadeias podem alcançar 10^5 - 10^7 daltons (Da). O seu alto peso molecular e o volume que ocupa em solução contribuem para sua propriedade como lubrificante e absorvente de choques. É encontrado predominantemente em LS, humor vítreo e cordão umbilical (DEVLIN, 2006; STERN; ASARI; SUGAHARA, 2006).

A molécula de AH é encontrada primariamente como um polímero de alto peso molecular, acima de 500 kilodaltons (kDa), capaz de promover quiescência e ação anti-inflamatória em condrócitos, osteoblastos, osteoclastos e sinoviócitos, o que, conseqüentemente, promove manutenção da integridade tecidual (DU SOUICH, 2014).

Dois mecanismos foram propostos para elucidar a ação do AH de alto peso molecular (AH-APM): a inibição competitiva de receptores de membrana, bloqueando a ativação de cascatas de sinalização intracelular, e a interação com um grupo distinto de receptores, culminando na expressão de moléculas capazes de interferir em cascatas de sinalização, como

a quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK-M) e ao mitógeno da proteína ativada fosfatase -1 (MKP-1) (DU SOUICH, 2014).

Acredita-se que a interação entre AH-APM e receptores de membrana, como o receptor *Toll-like 4* (TLR4), seja capaz de impedir que outras moléculas presentes na matriz extracelular se liguem a ele e ativem cascatas inflamatórias (CAMPO et al., 2009). Entre os possíveis ligantes que interagem com TLR4, encontram-se fragmentos da cadeia de AH, gerados em condições patológicas como consequência do desequilíbrio entre síntese e degradação do AH (CHAJARA et al., 2000). Alternativamente, a fragmentação do AH pode ser provocada pela ação de EROs durante episódios de lesão tecidual e inflamação (STERN; ASARI; SUGAHARA, 2006). Além disso, a interação entre AH-APM e TLR4 previne a ativação desse receptor por moléculas presentes em microrganismos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (CAMPO et al., 2009).

Em um estudo conduzido por Campo et al. (2012), condrócitos oriundos de cartilagem de camundongos foram utilizados para investigar os efeitos do AH de diferentes pesos moleculares em receptores do tipo *Toll-4*. Silenciadores genéticos foram utilizados para bloquear a expressão de TLR4 em um grupo de condrócitos, que, posteriormente, foi exposto a fragmentos de AH (tetrâmeros). Como resultado, observou-se acentuada redução da expressão de mediadores inflamatórios em comparação com células que receberam somente o tratamento com AH de baixo peso molecular. No entanto, a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1-beta, IL-6 e IL-18 não foi completamente inibida, o que sugere a existência de vias alternativas de sinalização intracelular mediadas por fragmentos de AH.

Outro mecanismo proposto para explicar a ação anti-inflamatória do AH-APM consiste na ativação de receptores CD44 e a molécula de adesão intercelular -1 (ICAM-1) em condrócitos, osteoblastos, osteoclastos e sinoviócitos (TURLEY; NOBLE; BOURGUIGNON, 2002; VAN DER KRAAN et al., 2002; YASUDA, 2007; HASHIZUME; MIHARA, 2010; DU SOUICH, 2014). O receptor CD44 é responsável por mediar interações intercelulares, assim como interações entre células e a matriz extracelular por meio de sua afinidade por componentes como AH, colágenos e metaloproteinases (OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013), sendo fundamental na manutenção estrutural da matriz extracelular (KNUDSON et al., 1996). CD44 é considerado o principal receptor para AH e, no tecido cartilágneo, é responsável por facilitar a retenção de proteoglicanos na superfície de condrócitos, formando uma matriz pericelular gelatinosa (KNUDSON; LOESER, 2002).

A ativação do receptor CD44 por moléculas de AH de alto peso molecular induz a expressão de IRAK-M (YATABE et al., 2009), responsável por bloquear a ação de proteínas da família IRAK. Quando ativadas, proteínas IRAK formam um complexo com o fator de necrose tumoral associado ao receptor do fator 6 (TRAF-6). Este complexo então se dissocia do receptor transmembrana e ativa um complexo presente no citosol, chamado de quinase 1 ativadora de fator transformante de crescimento β (TAK1), que, por sua vez, é capaz de fosforilar e ativar o complexo Inibidor da quinase κ B (IKK). Uma vez ativo, IKK fosforila e inativa o inibidor do NF- κ B (I κ B,) que perde a capacidade de manter o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) no compartimento citosólico (OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013).

Nesse estágio, NF- κ B está livre e adquire a habilidade de atravessar a membrana nuclear e de ligar-se a regiões específicas da molécula de DNA, regulando a expressão de múltiplos genes, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular que possuem papel fundamental na patogenia da inflamação sinovial e degradação de tecido ósseo e cartilaginoso (SMOLEN; PETER; LIPSKY, 2007). Portanto, a indução de IRAK-M impede que proteínas IRAKs sejam ativadas, bloqueando toda a cascata de sinalização e, conseqüentemente, bloqueando a ação do fator NF- κ B.

Além de estar envolvido na ativação do fator de transcrição NF- κ B, o complexo TAK1 adiciona grupos fosfato a membros da denominada cascata das proteínas ativadas por mitógenos (MAP). Como resultado, ocorre a fosforilação e ativação da quinase regulada pela sinalização extracelular (ERK), capaz de atravessar a membrana nuclear e fosforilar o fator de transcrição EIK-1, o qual se associa a uma segunda proteína para ativar a transcrição do gene *fos*. A proteína *Fos* é então fosforilada pela ERK, em associação com a proteína *Jun*, forma o complexo de transcrição AP-1 (proteína ativadora-1), também responsável pela expressão de citocinas (OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013).

Dessa forma, a interação entre AH-APM e o receptor CD44, ao induzir a expressão de IRAK-M, também interfere na ativação de AP-1, justificando a ação anti-inflamatória do ácido hialurônico de alto peso molecular.

Além de estimular a expressão de IRAK-M, a ligação entre AH-APM e CD44 induz a expressão da fosfatase MKP-1 (Proteína quinase ativada por fosfatase -1), que remove grupos fosfato da enzima *ERK*, pertencente à cascata MAP quinase (HASHIZUME; MIHARA, 2010). Interferindo com a cascata MAP quinase, a proteína quinase ativada por fosfatase -1 (MKP-1) também é responsável por impedir a ação do complexo de transcrição AP-1. Hashizume e Mihara (2010), constataram que a expressão de MKP-1 após engajamento de CD44 em condrócitos humanos resultou, em última instância, na inibição de

metaloproteinases (MMP): MMP-1, MMP-3 e MMP-13, as quais degradam a matriz extracelular. O tratamento com anticorpo anti-CD44 reverteu o efeito descrito. Logo, evidências corroboram o papel do AH como mediador da integridade tecidual.

Outro receptor que possui afinidade por moléculas de AH de alto peso molecular é ICAM-1 (OWEN; PUNT; STRANFORD, 2013). Experimentos realizados por Yasuda (2007), revelaram que anticorpos contra ICAM-1 reverteram o efeito anti-inflamatório promovido por AH de alto peso molecular (2.700 kDa) em macrófagos estimulados por LPS. Constatou-se que o bloqueio do receptor ICAM-1 provocou redução nos níveis de fosforilação de I κ B, isto é, reduziu a inativação de I κ B, que permaneceu associado ao NF- κ B no citoplasma, impossibilitando a transcrição gênica de diversos mediadores pró-inflamatórios. O autor ressalta o papel de macrófagos ativados como importante fonte de citocinas pró-inflamatórias durante processos de inflamação articular em humanos.

2.2.1.1 Métodos para quantificação do AH

Lee e Cowman (1994) descreveram um método de quantificação do AH por meio de eletroforese em gel de agarose 0,5%, seguido por detecção do AH com um corante catiónico. A quantidade a amostra necessária foi de 7 mg. A calibração do método com os padrões de AH de peso molecular conhecido estabeleceu uma relação linear entre a mobilidade eletroforética e o logaritmo do peso molecular médio.

Outro método para determinação da concentração do AH foi proposto e validado por Aaltonen et al. (2015), utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta performance e detecção por fluorescência.

2.2.1.2 Peso molecular

Smith e Ghosh (1987) demonstraram em um estudo *in vitro* que fibroblastos sinoviais, quando estimulados com AH de peso molecular maior que 5×10^5 daltons, aumentam a síntese do AH de forma concentração dependente. No entanto, quando utilizado o AH com o peso

molecular menor que 5×10^5 Da, o mesmo apresentou pouco ou nenhum efeito, apenas quando utilizado em altas concentrações, no qual gerou uma supressão da biossíntese.

Em um estudo utilizando o modelo de indução de OA em coelhos, o AH de alto peso molecular ($1,9 \times 10^6$ Da) foi mais eficiente do que o de baixo peso molecular ($0,8 \times 10^6$ Da) no controle da degradação articular (KIKUSHI et al., 1996).

Philips (1989), comparando cinco diferentes produtos de AH em equinos com artrite traumática, observou significativa redução do tempo em que os cavalos permaneciam sadios quando utilizado do AH de alto peso molecular (mais que 2×10^6 daltons). Já Aviad et al. (1988) em estudo clínico cego, comparou os efeitos de AH de baixo peso ($0,13 \times 10^6$ daltons) e de alto peso ($2,88 \times 10^6$ daltons) e não observou diferença significativa entre eles.

Halika et al. (2009), demonstrou que o hialuronato com peso molecular de 2×10^6 e $5,4 \times 10^6$ Da, na concentração de 0,1%, atenuou significativamente a fosforilação H2AX e ativação do ATM, induzida pelo *burst* oxidativo com PMA dos leucócitos, além de reduzir a proporção de células marcadas com fluorescência. Efeito que não foi observado com o AH de 6×10^4 Da.

2.2.2 Triancinolona

Corticosteroide é uma das drogas mais utilizadas para o tratamento intra-articular de sinovite não infecciosa, sendo um potente anti-inflamatório e tendo ação analgésica indireta (GOODRICH; NIXON, 2006).

Em uma pesquisa envolvendo veterinários membros da Sociedade Americana de Veterinários de Equinos (AAEP), foram obtidos 831 questionários no qual 77% utilizam triancinolona (TA) para tratar articulações de alto grau de mobilidade (FERRIS et al., 2011). Em um estudo randomizado e multicêntrico envolvendo 80 cavalos com claudicação, observou-se diferença dos tratamentos com TA (12mg) ou TA com AH de alto peso molecular. Concluíram que o tratamento com triancinolona apenas, teve uma taxa de sucesso maior quando comparado ao outro grupo (DE GRAUW et al., 2014b).

A triancinolona (9mg) após a aplicação intra-articular em 12 cavalos Puro Sangue Inglês, na articulação radiocarpica, atingiu a sua maior concentração intra-articular após 6,5 horas e o seu tempo de detecção no plasma foi de 7 dias (KNYCH et al., 2013).

Para verificar o efeito inibitório da triancinolona na síntese de mediadores inflamatórios em equinos, foi feita a aplicação intravenosa de 0,04 mg/kg de TA. Foi feita coleta antes e depois do tratamento com TA. O sangue total foi desafiado com LPS *in vitro*, e observou-se uma diminuição na concentração de eicosanoides durante 2-8 horas pós tratamento (MANGAL et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA

A impossibilidade em se manter a homeostase nas artropatias é devida em grande parte ao aumento das citocinas no ambiente articular. A utilização de terapias que impeçam a progressão da degeneração articular e que atuem na recuperação do equilíbrio articular vem sendo cada vez mais discutida não só para uso em equinos, como também em humanos e outras espécies de animais domésticos.

O AH tem sido amplamente utilizado em humanos e, principalmente em cavalos atletas que são frequentemente submetidos a exame antidopagem. Nestes, o AH é particularmente indicado como terapia intra-articular, como substituo de injeções intra-articulares de corticosteroides, que são proibidas durante os eventos. Porém, a influência do peso molecular do AH ainda é motivo de estudo e controvérsias. Além disso, também é questionada a eficácia do AH comparativamente aos efeitos alcançados pelos corticosteroides.

Neste estudo, comparou-se os efeitos de AH de baixo peso molecular, AH de alto peso molecular e triancinolona, um corticosteróide comumente utilizado em injeções intra-articulares em equinos, em relação aos efeitos anti-inflamatório, antioxidante e anabólico.

4 OBJETIVOS

Comparar os efeitos da aplicação intra-articular de AH de diferentes pesos moleculares, visando o seu efeito anti-inflamatório, anabólico e antioxidante em articulações com sinovite aguda induzida por LPS.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar as concentrações de prostaglandina E2 (PGE₂), AH, condroitim sulfato, produzidos pelas células sinoviais dos equinos.
- Estimar o peso molecular das moléculas de AH, presentes no LS após o tratamento com diferentes pesos moleculares de AH e triancinolona.
- Realizar a contagem total das células nucleadas do líquido sinovial após aplicação intra-articular de diferentes pesos moleculares de AH e triancinolona
- Analisar o *burst* oxidativo das células presentes no LS.
- Quantificar através de análise computacional a claudicação, após o tratamento com diferentes pesos moleculares AH ou triancinolona.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme o protocolo de número 4376260615.

Todas as análises foram realizadas no Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP e no Laboratório de Biologia Molecular da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 24 articulações metacarpofalangeanas de 12 equinos hípidos, sem histórico de doenças articulares, não atletas, machos e fêmeas, com idade entre 2 e 7 anos alojados e cedidos pelo Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). As articulações foram divididas aleatoriamente em três grupos de oito, sendo o grupo controle tratado com triancinolona (TA) (10mg), o grupo AH de baixo peso molecular (AH-BPM), e o grupo AH de alto peso molecular (AH-APM) (Quadro 1).

Os animais foram mantidos em cocheiras sob condições naturais de luz, umidade e temperatura. Receberam ração balanceada e feno de gramínea *coastcross* (*Cynodumdactylum*). Água foi fornecida *ad libitum*.

Quadro 1 - Raça, idade (meses), peso (quilogramas) e sexo dos animais utilizados e tratamento administrado em cada articulação metacarpofalangeana – São Paulo – 2016

Animal	Raça	Idade (meses)	Peso (Kg)	Sexo	Triancinolona	AH-BPM	AH-APM
01	PSA	31 meses	306 Kgs	M	MTE	MTD	
02	PSA	48 meses	305 Kgs	M	MTD	MTE	
03	PSA	26 meses	260 Kgs	M	MTE		MTD
04	PSA	26 meses	320 Kgs	M	MTD		MTE
05	PSA	64 meses	356 Kgs	F	MTE	MTD	
06	PSA	46 meses	286 Kgs	M	MTD	MTE	
07	PSA	60 meses	303 Kgs	F	MTE		MTD
08	PSA	26 meses	293 Kgs	M	MTD		MTE
09	PSA	49 meses	286 Kgs	M		MTD	MTE
10	PSA	40 meses	283 Kgs	M		MTE	MTD
11	PSA	23 meses	294 Kgs	M		MTD	MTE
12	PSA	24 meses	330 Kgs	M		MTE	MTD

MTD: metacarpofalangeana direita; MTE: metacarpofalangeana esquerda; PSA: Puro Sangue Árabe; M: macho.

5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

5.2.1 Exame clínico para seleção dos animais

Os animais selecionados não apresentavam histórico de doenças articulares. Ao exame ultrassonográfico e radiográfico não foram encontradas alterações compatíveis com doença articular. No exame físico não foram observadas alterações na inspeção e palpação das articulações.

5.2.2 Exame ultrassonográfico

Para a realização do exame ultrassonográfico, os equinos foram contidos em tronco apropriado para espécie. As articulações metacarpofalangeanas foram tricotomizadas e foi

utilizado gel para condução. O aparelho utilizado foi o ultrassom ESAOTE MyLab 30 VETGOLD®, com transdutor linear de 7,5 a 12 MHz, utilizando a frequência de 12 MHz.

5.2.3 Exame radiográfico

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

5.2.4 Avaliação física dos animais

A avaliação física consistiu na aferição das frequências cardíaca e respiratória, e mensuração da temperatura retal, sendo realizada no momento 0 (controle) para seleção dos animais e nos momentos 0, 8, 24 e 48 horas.

5.2.4.1 Avaliação física articular

As articulações metacarpofalangeanas incluídas no experimento foram avaliadas diariamente por meio da inspeção e palpação das estruturas componentes. O exame físico articular foi realizado previamente às coletas nos momentos 0, 8, 24 e 48 horas, e constou de:

- a. Inspeção (aumento de volume; postura antálgica em estação)
- b. Mensuração da circunferência da articulação metacarpofalangeana
- c. Presença de claudicação induzida por dor articular

A presença de claudicação nos cavalos foi avaliada de forma objetiva, utilizando equipamento¹ capaz de indicar o membro de origem e quantificar a claudicação (Figura 1). O equipamento é composto por sistema via *bluetooth*, que recebe informações de três sensores sem fio, não invasivos, colocados na cabeça (acelerômetro), face dorsal do membro torácico direito (giroscópio) e pelve (acelerômetro). Os movimentos captados são convertidos em vetores e interpretados pelo programa, que atribui um número ao vetor resultante. Para os membros torácicos, a amplitude total da movimentação de cabeça (soma de vetores) não deve ultrapassar o limiar de 8,5 mm. Esse valor é calculado pelo teorema de Pitágoras ($a^2+b^2=c^2$), onde A é o valor da movimentação máxima da cabeça, B é a movimentação mínima e C é a soma dos vetores.

Figura 1 - Imagem fotográfica indicando a localização dos sensores Lameness Locator® para exame de claudicação



Fonte: Neuenschwander (2016)

¹LamenessLocator®

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Cada articulação foi submetida a uma aplicação intra-articular de LPS (0,25ng/ ml) no momento 0 hora. Após 1 hora o tratamento designado foi realizado aleatoriamente, ou seja, aplicação intra-articular de triancinolona (10mg), AH de baixo peso molecular (20 mg) ou AH de alto peso molecular (20 mg).

Amostras de LS foram coletadas das articulações metacarpofalangeanas imediatamente antes de cada aplicação intra-articular (0 e 1 hora) e nos momentos 8, 24 e 48 horas para contagem total de células, determinação de PGE₂, mensuração do peso molecular de AH e análise do *burst* oxidativo. Nestes mesmos momentos foram realizadas as avaliações físicas articulares.

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

5.4 INDUÇÃO DA SINOVITE COM LPS

Foi utilizado o produto comercial Lipopolysaccharide E.coli O55:B5. A partir da solução estoque de 1mg/ml de LPS em RPMI 1640 Medium (GIBCO), foi feita nova diluição em 50 ml de PBS estéril, atingindo a concentração de 20µg/mL e armazenada essa solução intermediária em frasco de vidroborocilicato a 4°C. A solução de trabalho foi obtida através da diluição de 62,5µl da solução intermediária em 5 ml de PBS estéril, obtendo, assim, a concentração desejada de 0,25 µg/ ml. Todas as etapas foram realizadas em cabine de segurança biológica, com materiais estéreis.

5.5 PREPARO DO ÁCIDO HIALURÔNICO DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR

Para o preparo do AH foi utilizado o produto comercial Hyaluronan (HIGH MW) (100 MG) e Hyaluronan (LOW MW) (100 MG) da empresa R&D Systems Inc. O AH baixo peso molecular (15-40 kDa) foi diluído em 10 ml de solução de PBS estéril, e o AH de alto peso molecular (>950kDa) foi diluído em 20 ml de PBS estéril devido a sua alta viscosidade.

5.6 ANÁLISE DO LÍQUIDO SINOVIAL (LS)

5.6.1 Coleta do LS

Foram coletadas amostras de LS das articulações metacarpofalangeanas, e o volume registrado no momento da colheita. O acesso escolhido foi pelo recesso palmar, descrito por Moyer, Schumacher, Schumacher (2007), utilizando agulhas hipodérmicas 30 x 8² (Figura 2). No local de punção foi feita assepsia com iodo povidona degermante e álcool 70%. O LS foi imediatamente processado no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

Figura 2 - Coleta de líquido sinovial da articulação metacarpofalangeana no momento 0 hora



Fonte: Neuenschwander (2016).

² Agulha descartável BD – PrecisionGlide

5.6.2 Processamento do LS

Após cada coleta, as amostras de LS foram imediatamente centrifugadas³ a 4°C e 2000 G, durante 15 minutos. O sobrenadante foi aliqotado em tubos de 2 ml e congelado a -80°C para futuras análises.

5.6.3 Contagem total de células

A contagem total de células nucleadas foi realizada em câmara de Neubauer⁴, com alíquotas de líquido sinovial *in natura*. As amostras contaminadas com sangue foram diluídas na proporção de 10 µl de LS para 90 ou 190 µL de solução fisiológica 0,9%, e o número de células viáveis foi ajustado para x10 e x20, respectivamente.

5.6.4 Determinação da PGE₂

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

EIA Buffer foi adicionado aos poços de ligação inespecífica (100µl) e aos poços de máxima ligação (50 µl). A curva padrão foi feita em duplicata, adicionando 50 µl em cada poço das fileiras 2 e 3 da placa. Em seguida, 50 µl das amostras de LS foram adicionadas em cada poço, em duplicata. Com exceção dos poços de atividade total e branco, todos os demais receberam 50 µl de *PGE₂tracer*, contendo acetilcolinesterase (AChE). O anticorpo monoclonal anti-PGE₂ foi adicionado na quantidade de 50 µl aos poços, com exceção dos poços de atividade total, ligação inespecífica e branco. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e em seguida lavada⁵ cinco vezes com *Wash Buffer*. Foram adicionados 200 µl de *Ellman's Reagent*, preparado imediatamente antes de sua utilização, em todos os poços, e apenas o poço de atividade total recebeu também 5 µl de *tracer*. A placa foi protegida da luz e mantida no agitador⁶ por 60 a 90 minutos. A absorbância da amostra foi lida à 412nm em

³ Centrífuga 5417 R - Eppendorf

⁴ Neubauer – Hirschmann – EM – Techcolor

⁵ 405 LS - Biotek

⁶ Mini Shaker PSU-2T - Biosan

leitor⁷ de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 7.8 a 1000 pg/ml pelo programa Gen5. Foram utilizadas duas amostras de LS de articulações com artrite séptica para validação do teste.

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

5.6.5 Determinação dos GAGs

Para a determinação de glicosaminoglicanos (GAGs) foram utilizadas as amostras acondicionadas em tubos tipo eppendorf sem anticoagulante a -80°C.

Cinquenta microlitros de cada amostra foram adicionados a 100 µl de protease alcalina P126 maxatase (4mg/ml Tris HCl 0,05M pH 8,0) e incubados em banho-maria a 50°C, *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas⁸ em temperatura ambiente a 3000 G por 15 minutos para a remoção de resíduos insolúveis. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 600 µl e seco em vácuo⁹ por pelo menos 2 horas a 45°C. As amostras foram ressuspendidas em 25µl de água destilada.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, em tampão 1,3-diaminopropano-acetato 0,05M e pH9 (PDA), em cuba refrigerada, por aproximadamente uma hora, como descrito por Jaques et al. (1968) e modificado por Dietrich e Dietrich (1976). Foram utilizados 5µl de um padrão de CS e um padrão de AH, ambos na concentração de 1mg/ml. O corante vermelho de cresol foi adicionado como indicador da distância percorrida. Após a eletroforese os GAGs foram fixados no gel por cetavlon (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,1% pelo tempo mínimo de duas horas. Em seguida o gel foi coberto com papel filtro e seco sob corrente de ar aquecida. O CS foi corado com azul de toluidina 0,1% em solução de ácido acético 1% em etanol 50% por 15 minutos. O excesso de corante foi removido pela solução de ácido acético 1% em etanol 50%. Ato contínuo, oAH foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M.

As lâminas foram escaneadas¹⁰ e as imagens editadas¹¹ para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas¹².

⁷ELx808 - Biotek

⁸Centrífuga 5418 - Eppendorf

⁹Vacufugevacuum concentrator - Eppendorf®

¹⁰Epson Expression 1680®

5.6.6 Mensuração do peso molecular do AH do líquido sinovial

Para determinação do AH do LS, foram acondicionados 50µL de líquido sinovial a – 80°C, em tubos sem anticoagulante. A amostra foi incubada com 100µL de protease alcalina P126 maxatase (4mg/mL Tris HCL 0,05M pH 8,0), por 18 horas em banho-maria a 50°C.

As amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas em temperatura ambiente a 2000 G por 15 minutos para a remoção de resíduos insolúveis. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 600 µl e seco em vácuo por pelo menos 2 horas a 45°C. As amostras foram ressuspensas em 25µl de água destilada.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %, em tampão Tris-acetato-EDTA 1 x 0,04M, pH 8 (acetato 0,02M, EDTA 0,01M), em cuba refrigerada, por aproximadamente 40 minutos. Foram utilizados 5µL de dois padrões de AH de pesos moleculares conhecidos em todas as lâminas, sendo o padrão de crista de galo 2 mg/mL (800 KDa) e o padrão de traqueia bovina 1 mg/mL (20kDa). O corante azul de bromofenol foi adicionado como indicador da distância percorrida. Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de toluidina 0,1% em acetato de sódio 0,025 M pH 5 por 15 minutos, sendo o excesso de corante removido pelo acetato de sódio 0,025 M.

Os géis foram escaneados e as imagens editadas para análise das bandas metacromáticas e obtenção das distâncias de migração, sendo a migração inversamente proporcional ao logaritmo do peso molecular do AH. Em seguida confeccionou-se o gráfico onde o peso molecular é expresso em equação logarítmica e a distância de migração em milímetros.

5.6.7 Análise do *burst* oxidativo por citometria de fluxo

Após a coleta do LS, as amostras foram divididas em alíquotas para análises subsequentes. Cada amostra foi dividida em 3 tubos de ensaio de 12x75mm, em poliestireno cristal transparente: branco, *burst* basal e phorbolmiristato acetato (PMA). Para o *burst* oxidativo no tempo inicial (0h), foram necessários 100µl de amostra em cada tubo de ensaio, já para os tempos seguintes (8, 24 e 48h), 30µl de amostra foram adicionados em cada tubo de

¹¹Laund Silver Fast Epson IT8®

¹²Lauch VisionWorksLS®

ensaio, uma vez que após o estímulo com LPS a celularidade no líquido sinovial aumenta consideravelmente. Apenas nos tubos de ensaio referentes ao burst basal e PMA foram adicionados 200ul do reagente dicloro-diidro-fluoresceína-acetato (DCFH), na concentração final de 55uM, o qual fluoresce em verde na presença de espécies reativas de oxigênio (EROS) e quando excitado em 488nm. Apenas nos tubos denominados PMA foram adicionados 100ul do reagente PMA, na concentração final de 90,9 ng/ml ou aproximadamente 150nM, o qual age como estímulo químico para o *burst* oxidativo, atuando via proteína kinase C (PKC) e fosfolipase D (PLD) em neutrófilos. Em todos os tubos foi adicionada salina tamponada com fosfato (PBS) suficiente para completar o volume final de reação de 1,1ml. Os tubos foram então incubados em estufa a 37°C por 20 minutos. Após a incubação as amostras foram lavadas com 2ml de PBS, centrifugadas a 400g por 7 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 300ul de PBS, para a análise por citometria de fluxo.

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

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov; em seguida utilizou-se o teste T pareado ou não pareado, respectivamente, para comparação dos valores nos diferentes momentos com os valores basais (momento 0) dentro do mesmo grupo, bem como os valores entre grupos no mesmo momento de observação. O grau de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

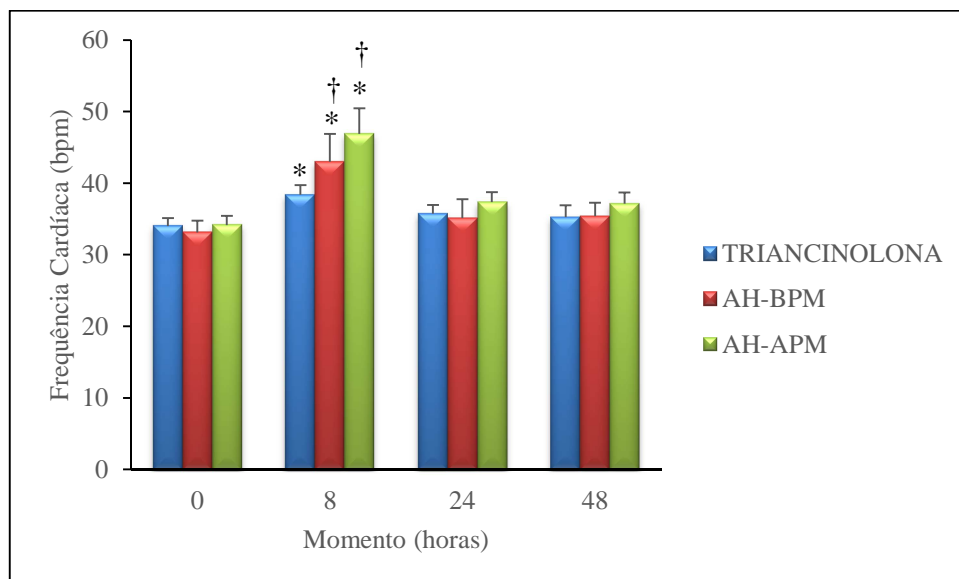
7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO FÍSICA DOS ANIMAIS

7.1.1 Frequência cardíaca

Houve aumento da frequência cardíaca em todos os grupos no momento 8 horas quando comparada aos seus respectivos valores iniciais ($p < 0,05$). Neste momento o grupo tratado com AH-APM apresentou maior valor quando comparado ao grupo TA ($p < 0,05$), porém não mostrou diferença quando comparado ao grupo de AH-BPM ($p > 0,05$) (Apêndice A) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Média da frequência cardíaca dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016



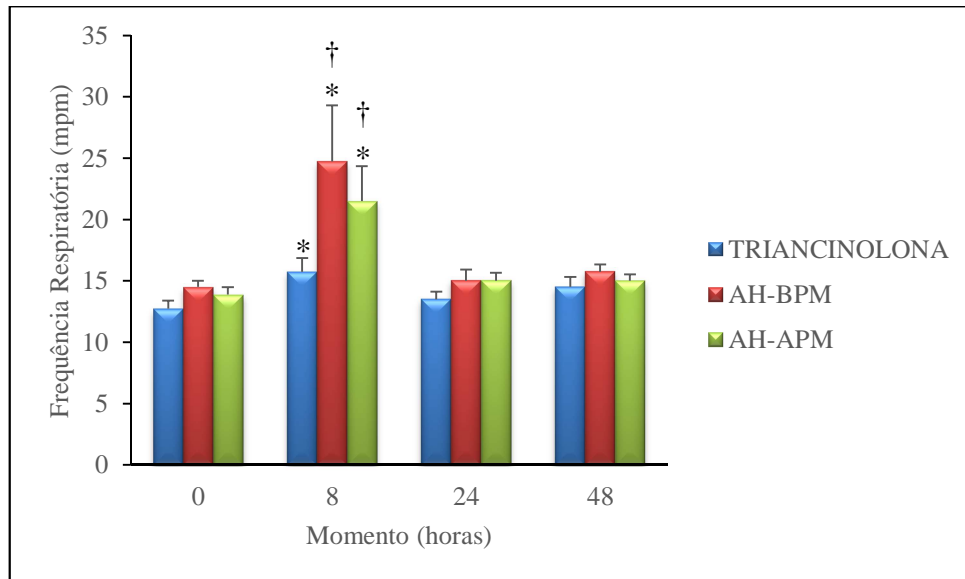
* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA

7.1.2 Frequência respiratória

Da mesma maneira do que o observado na frequência cardíaca, houve aumento da frequência respiratória em todos os grupos no momento 8 horas quando comparada aos

respectivos valores iniciais ($p < 0,05$). Os grupos tratados com AH-APM e AH-BPM apresentaram frequência respiratória maior do que o grupo tratado com triancinolona às 8 horas ($p < 0,05$) (Apêndice B) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Média da frequência respiratória dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016

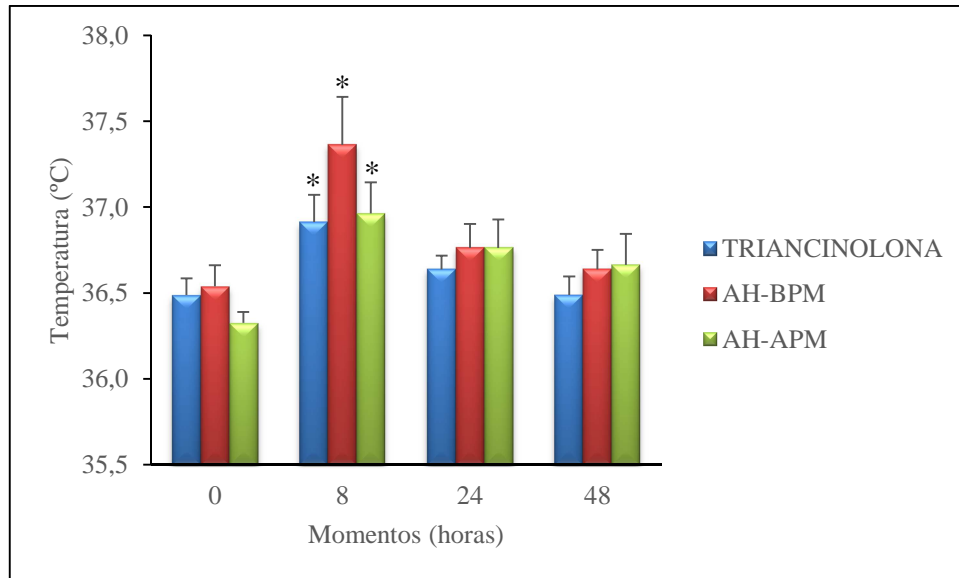


* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA

7.1.3 Temperatura retal

Houve aumento da temperatura retal em todos os grupos tratados no momento 8 horas quando comparado aos valores iniciais ($p < 0,05$), porém não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Apêndice C) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Média da temperatura retal dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016



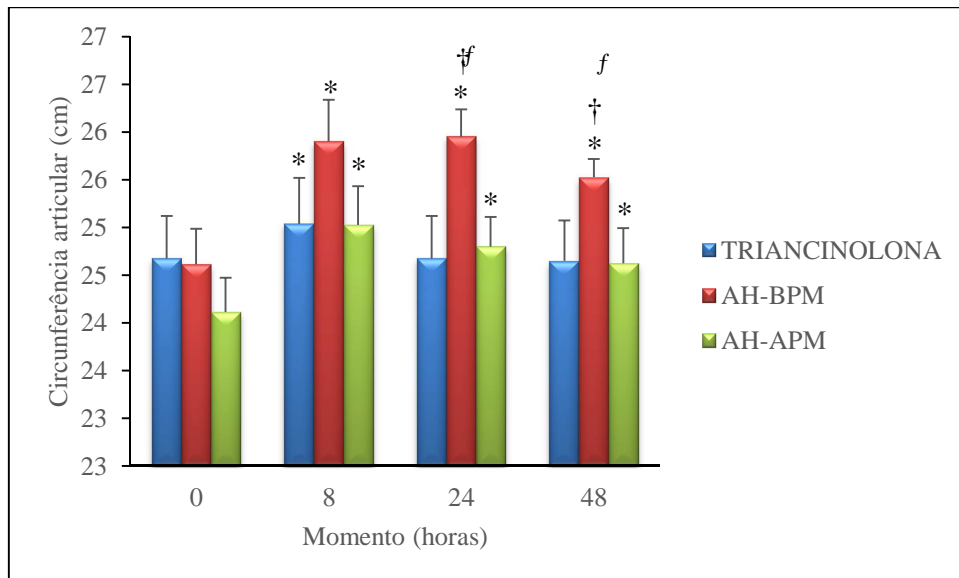
* diferença em relação aos valores iniciais

7.1.4 Circunferência articular

Todos os grupos apresentaram aumento da circunferência articular no momento 8 horas em relação aos valores iniciais ($p < 0,05$). Nos momentos 24 e 48 horas os grupos AH-APM e AH-BPM apresentaram valores maiores que no momento 0 hora, ($p < 0,05$), o que não foi observado no grupo TA ($p > 0,05$).

Nos momentos 24 e 48 horas o grupo tratado com AH-BPM apresentou maior circunferência quando comparado aos grupos tratados com TA e AH-APM ($p < 0,05$). (Apêndice D) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Média da circunferência articular dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016

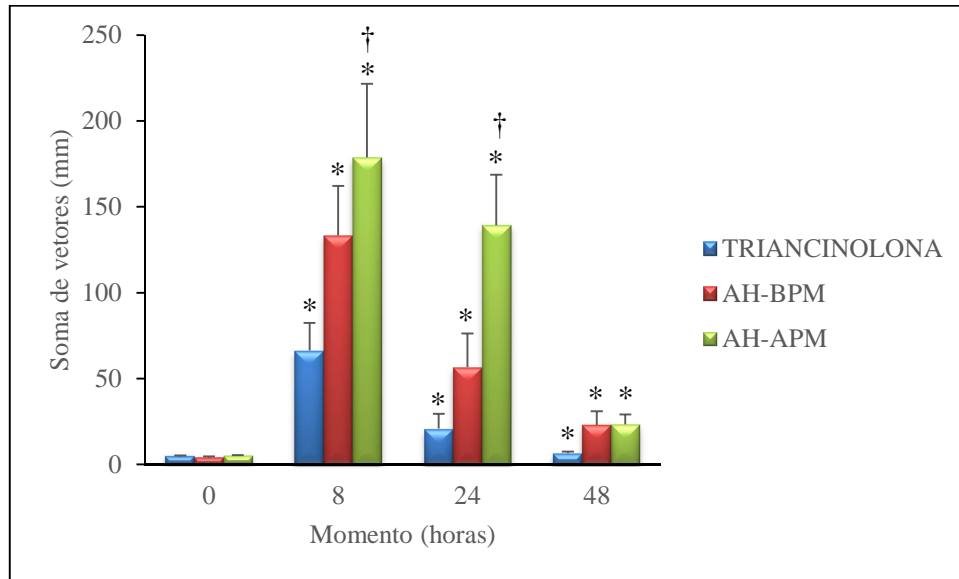


* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA; ‡ diferença em relação ao grupo AH-BPM

7.1.5 Análise de Claudicação

Todos os grupos apresentaram aumento da soma de vetores, indicativo de claudicação pelo equipamento lameness locator, nos momentos 8, 24 e 48 horas quando comparado aos valores iniciais. O grupo tratado com TA apresentou menor grau de claudicação nos momentos 8 e 24 horas do que o grupo tratado com AH-APM ($p < 0,05$) (Apêndice E) (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Média da soma de vetores na avaliação realizada pelo equipamento Lameness Locator®, (claudicação) dos animais submetidos à aplicação intra-articular de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016



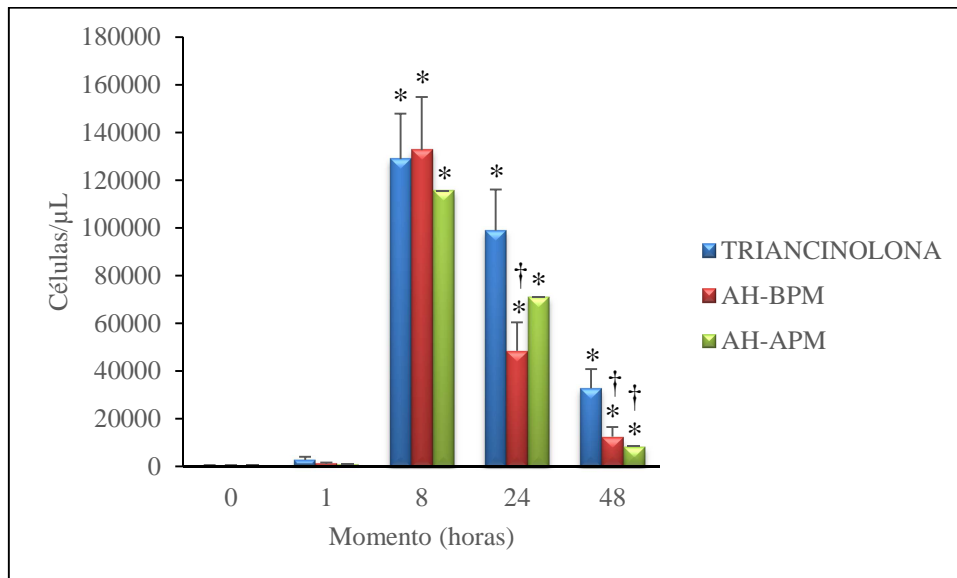
* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA

7.2 Contagem total de células

Todos os grupos apresentaram aumento da quantidade de células no LS nos momentos 8, 24 e 48 horas quando comparados ao momento 0 hora ($p < 0,05$).

Quando realizada a comparação entre grupos, o grupo TA apresentou maior quantidade de células no líquido sinovial do que o grupo AH-BPM nos momentos 24 e 48 horas ($p < 0,05$) e do que o grupo AH-APM às 48 horas ($p < 0,05$) (Apêndice F) (Gráfico 6).

Gráfico 6- Média da contagem total de células nucleadas presentes no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM– São Paulo - 2016

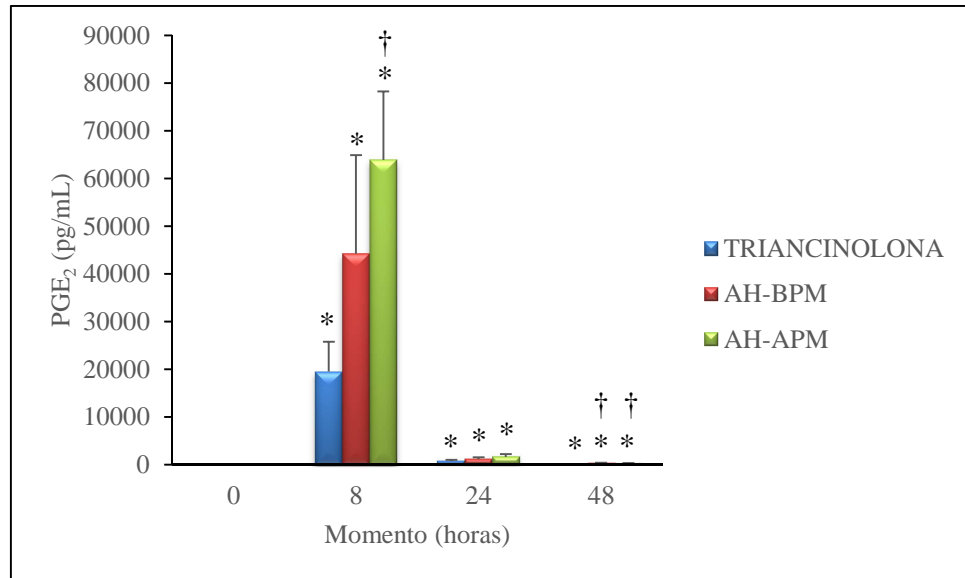


* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA

7.3 Prostaglandina E₂

Todos os grupos apresentaram aumento na concentração de PGE₂ às 8, 24 e 48 horas quando comparados ao momento 0 hora ($p < 0,05$), apesar da gradativa diminuição dos valores nos momentos seguintes. O grupo tratado com TA apresentou menor concentração de PGE₂ do que o grupo tratado com AH-APM às 8 horas ($p < 0,05$). Já às 48 horas o grupo tratado com TA manteve menor concentração de PGE₂ do que o grupo tratado com AH-APM, mas também do grupo tratado com AH-BPM e ($p < 0,05$) (Apêndice G) (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Concentração média de PGE₂ presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-BPM e AH-APM – São Paulo - 2016



* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA

7.4 DETERMINAÇÃO DOS GAGS

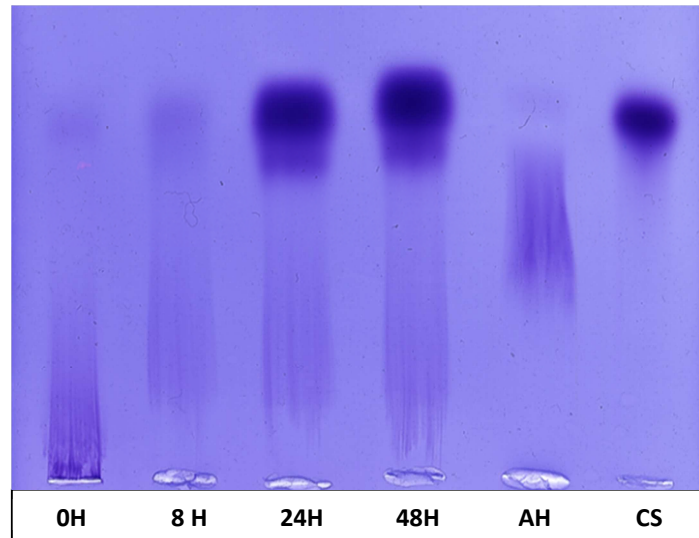
7.4.1 Concentração de AH

As figuras 3 a 5 demonstram a eletroforese em gel de agarose dos GAGs do líquido sinovial nos momentos 0, 8, 24, 48 horas de equino do grupo TA, AH-BPM e AH-APM respectivamente.

O grupo tratado com AH-APM apresentou maior concentração de AH no momento 8 horas quando comparado aos valores iniciais, enquanto os grupos TA e AH-BPM apresentaram diminuição da concentração ($p < 0,05$). Os grupos AH-APM e AH-BPM demonstraram valores menores aos basais as 24 e 48 horas e o grupo TA somente às 24 horas.

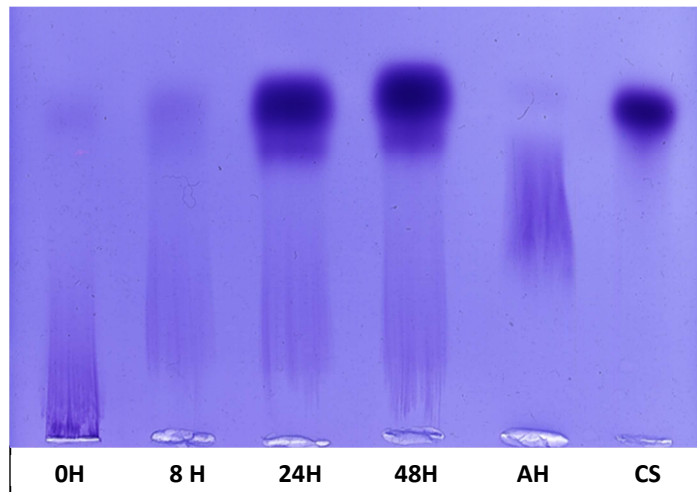
Às 8 horas o grupo AH-APM mostrou maior concentração de AH do que os outros dois grupos, e às 24 horas não foi observada diferença entre os grupos. Já às 48 horas o grupo tratado com TA mostrou valores maiores de AH do que os grupos AH-BPM e AH-APM ($p < 0,05$) (Apêndice H) (Gráfico 8).

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do liquido sinovial nos momentos 0, 8, 24, 48 horas de um equino do grupo tratado com TA. AH = padrão de ácido hialurônico; CS = padrão de condroitim sulfato



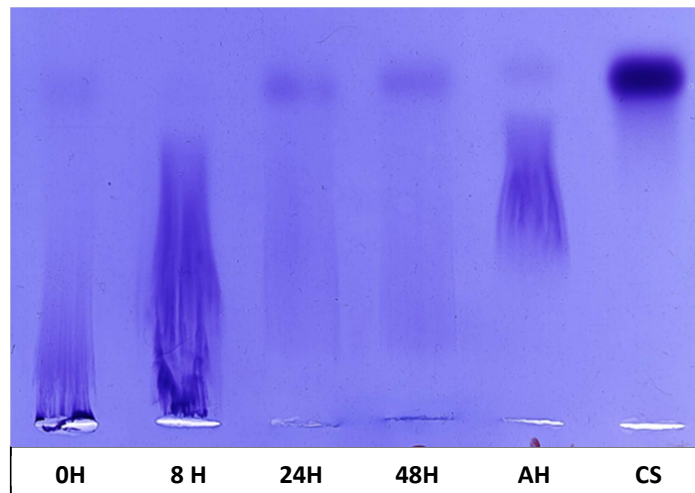
Fonte: Neuenschwander (2016)

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do liquido sinovial nos momentos 0, 8, 24, 48 horas de um equino do grupo tratado com AH-BPM. AH = padrão de ácido hialurônico; CS = padrão de condroitim sulfato



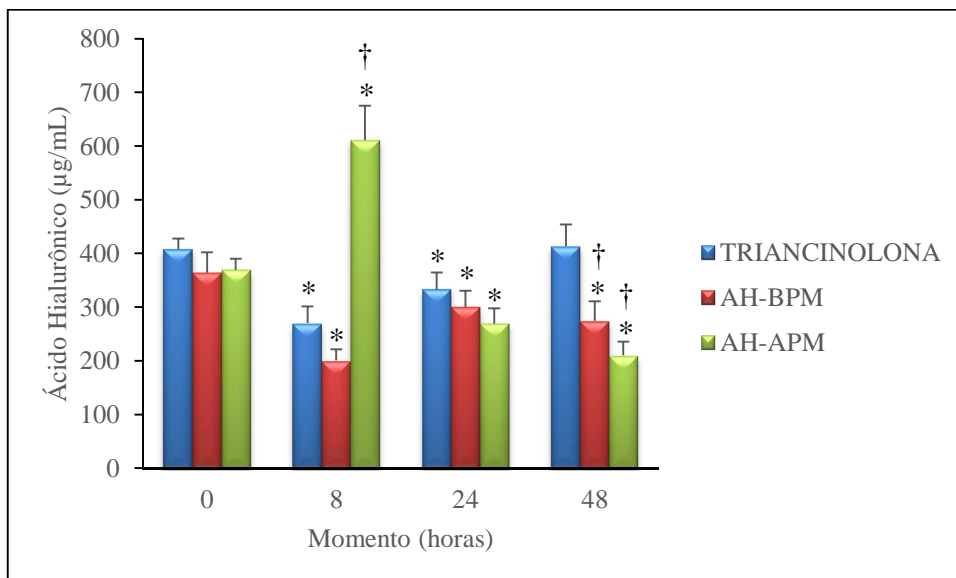
Fonte: Neuenschwander (2016)

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose dos glicosaminoglicanos do liquido sinovial nos momentos 0, 8, 24, 48 horas de um equino do grupo tratado com AH-APM. AH = padrão de ácido hialurônico; CS = padrão de condroitim sulfato



Fonte: Neuenschwander (2016)

Gráfico 8 - Concentração média de ácido hialurônico presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016



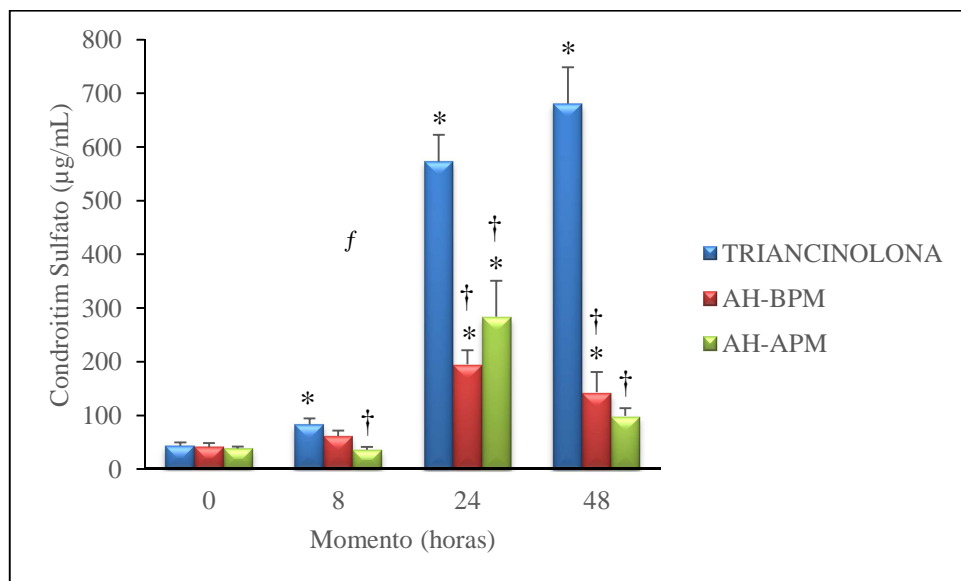
* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA

7.4.2 Condroitím sulfato (CS)

A concentração de CS aumentou às 8, 24 e 48 horas no grupo TA quando comparado aos valores iniciais ($p < 0,05$). No grupo AH-BPM o aumento da concentração de CS foi observada as 24 e 48 horas, e no grupo AH-APM somente às 24 horas ($p < 0,05$).

Observou-se que às 8 horas o grupo AH-APM apresentou valores menores de CS do que os grupos TA e AH-BPM ($p < 0,05$). Já o grupo tratado com TA, apresentou maior concentração de CS nos tempos 24 e 48 horas quando comparado aos grupos tratados com AH-BPM e AH-APM ($p < 0,05$) (Apêndice I) (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Concentração média de condroitim sulfato presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016



* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA; f diferença em relação ao grupo AH-BPM

7.5 PORCENTAGEM DE AH DE ALTO PESO MOLECULAR PRESENTE NO LS

A figura 6 demonstra a eletroforese em gel de agarose para mensuração do peso molecular do AH, respectivamente referentes a dois animais tratados com TA e dois animais tratados com AH-APM.

Todos os grupos avaliados apresentaram diminuição da porcentagem do AH de alto peso molecular presente no LS às 48 horas quando comparados ao momento 0 hora ($p < 0,05$).

O grupo tratado com TA apresentou menor porcentagem de concentração de AH de alto peso molecular do que os grupos AH-BPM e AH-APM às 48 horas ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos tratados com AH no momento 48 horas ($p > 0,05$) (Apêndice H e L) (Gráfico 10).

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose do peso molecular do AH, respectivamente referentes a dois animais tratados com TA e dois animais tratados com AH-APM, padrão de traqueia bovina (Tra) e padrão crista de galo (Cr)

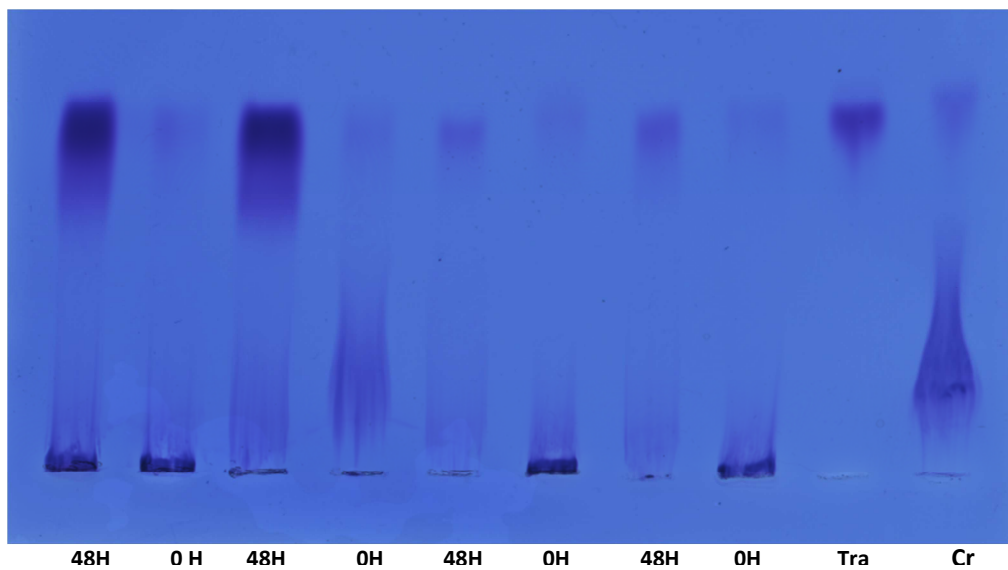
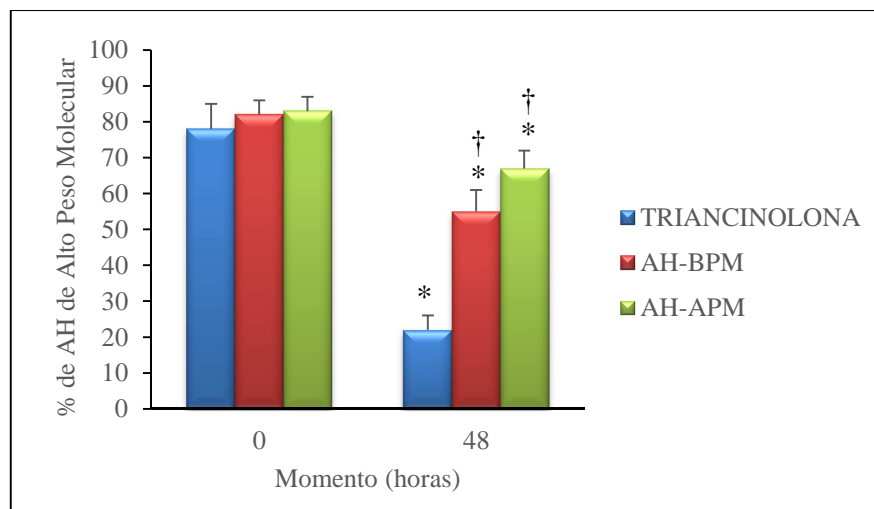


Gráfico 10 - Porcentagem de AH de alto peso molecular presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016



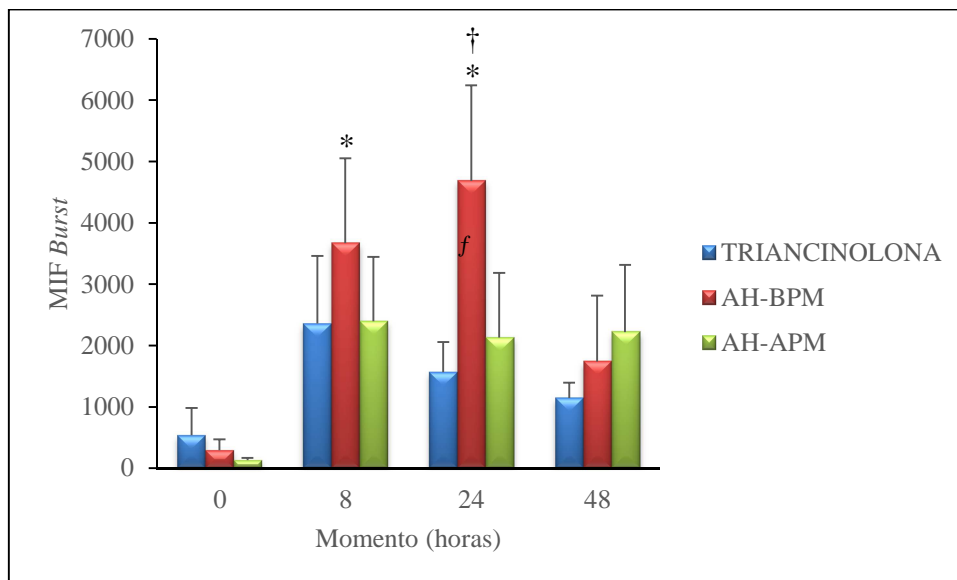
* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA

7.6 BURST OXIDATIVO

O grupo tratado com AH-BPM apresentou nos momentos 8 e 24 horas maior média de intensidade de fluorescência (MIF) quando comparado ao momento 0 hora ($p < 0,05$).

No momento 24 horas, o grupo AH-BPM obteve maior MIF, quando comparado aos grupos TA e AH-APM ($p < 0,05$). (Apêndice M)(Gráfico 11)

Gráfico 11 – *Burst oxidativo* presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais submetidos à aplicação de triancinolona, AH-APM e AH-BPM – São Paulo - 2016



* diferença em relação aos valores iniciais; † diferença em relação ao grupo TA; f diferença em relação ao grupo AH-BPM

8 DISCUSSÃO

A sinovite, assim como a capsulite, é uma alteração comumente observada no início do curso da OA e está presumivelmente associada à ocorrência de trauma repetido. As alterações morfológicas da sinóvia incluem hipertrofia e hiperplasia do epitélio de revestimento e infiltração de células mononucleares no tecido subjacente (PELLETIER et al., 1997). Existe uma interação inegável entre a membrana sinovial e a cartilagem articular na fase inflamatória da OA, que potencializa a degradação cartilágnea; sinovite, capsulite e destruição de cartilagem articular são eventos intimamente relacionados e qualquer uma destas condições pode iniciar ou exacerbar as outras (MCILWRAITH, 1996; CARON, 2011).

Benito et al. (2005) observaram que os tecidos sinoviais de pacientes com OA inicial apresentavam aumento da expressão dos mediadores inflamatórios quando comparados a pacientes com OA em estágios mais tardios, refletindo aumento na ativação das vias fisiopatológicas que contribuem para a degradação cartilágnea progressiva no início da doença. Além disso, estes mesmo autores demonstraram por meio da ultrassonografia e da ressonância magnética que a sinovite já está presente antes de qualquer alteração cartilágnea ou no osso subcondral. Diante destes fatos, optou-se no presente trabalho por utilizar o modelo de sinovite induzida por LPS para se estudar os efeitos da aplicação de diferentes pesos moleculares de AH frente aos processos inflamatórios presentes no ambiente articular, bem como comparar estes efeitos com a utilização intra-articular de triancinolona.

O modelo de indução da sinovite foi o mesmo utilizado por diversos autores (Van LOON et al., 2012; ARNOLD et al., 2013), no qual 0,25 ng de LPS são injetados na articulação desejada gerando inflamação sem repercussão sistêmica. Contudo, no presente estudo, foi observado aumento da frequência cardíaca, respiratória e temperatura retal às 8 horas em todos os grupos, justificado pelo pico da resposta inflamatória do experimento. Assim, podemos inferir que alterações sistêmicas ocorreram decorrente da administração de LPS, apesar dos valores da frequência cardíaca, respiratória e temperatura retal retornarem próximos aos valores basais nos momentos seguintes. O grupo TA apresentou valores de frequência cardíaca e respiratória semelhantes aos basais provavelmente devido à ação analgésica e anti-inflamatória da triancinolona, como sugerido por Kay et al. (2008).

Diferentemente da maioria dos trabalhos, que utilizou as articulações tibiotársica (VAN LOON et al., 2010; VAN LONN et al., 2012) e radiocárpica (VAN LOON et al., 2013; ROSS et al., 2012; PALMER et al., 1996) para o estudo da resposta inflamatória

articular, provavelmente devido ao tamanho da articulação e maior facilidade de obtenção de LS, a articulação metacarpofalangeana foi utilizada em nosso estudo por ser tratar de umas das articulações mais acometidas pela OA em equinos (Kay et al., 2008). A OA é uma condição comum a todos os tipos de cavalos, tende a acometer articulações de movimento mais amplo nos cavalos de esporte, e o contrário nos cavalos de lazer (WHITTON et al., 2000). Segundo Cantley et al. (1999) a articulação metacarpofalangeana é a mais comumente acometida pela OA em cavalos selvagens, ou seja, pela ocorrência natural; e algumas articulações de baixo movimento como a interfalangeana proximal, intertarsianas distal e tarsometatarsiana são especialmente vulneráveis ao desenvolvimento de OA (FIRTH, 1996).

Foi observada variância entre os graus de inflamação causado pela administração intra-articular de LPS dentro do mesmo grupo, o que pode ser devido a resposta individual dos animais. Contudo, deve-se levar em conta a resistência ao LPS na segunda exposição, como sugerido por Hui Li et al. (2006), que observaram diminuição de formação de imunocomplexo após seguidas exposições *in vitro* de LPS. Deve-se lembrar que cada cavalo foi utilizado duas vezes, e apesar do intervalo mínimo respeitado ter sido de 3 semanas a resistência ao LPS pode ter ocorrido em alguns animais. Contudo, não foi possível afirmar que as induções de sinovite foram mais brandas na segunda exposição.

De um modo geral, todos os grupos responderam à indução da sinovite, com aumento da circunferência articular às 8 horas, demonstrando inflamação e edema articular. Kay et al. (2008) observaram pico de edema 12 horas após a indução do LPS, e verificaram que esse edema persistiu até 48 horas pós indução, resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Cabe ressaltar que o grupo TA retornou aos valores iniciais às 24 horas, diferentemente de ambos os grupos tratados com AH. O comportamento da triancinolona era esperado, uma vez que nos cavalos a administração intra-articular é frequentemente empregada para reduzir dor e inflamação que ocorrem na OA, promovendo alívio sintomático e redução da claudicação.

A mesma resposta foi observada na avaliação da claudicação, ou seja, todos os cavalos apresentaram alteração de movimento detectado pelo equipamento Lameness Locator® às 8 horas. Este equipamento é capaz de indicar o membro de origem e quantificar objetivamente a claudicação. De forma semelhante, Tóth et al. (2014) utilizaram o mesmo método para avaliar a eficácia de bloqueios anestésicos em diferentes compartimentos da articulação femorotibiopatelar após indução da sinovite. Um estudo feito por McCracken et al. (2012) induziu claudicação em equinos com ferradura especial e comparou a acurácia do

equipamento com a avaliação de três veterinários experientes, sendo o Lameness Locator mais eficaz e preciso para a detecção da claudicação.

No gráfico 5, fica evidente a redução gradativa da claudicação em todos os grupos até às 48 horas. O grupo AH-APM apresentou maior grau de claudicação do que o grupo TA, contudo não diferiu do grupo AH-BPM. Este aumento maior de claudicação está relacionado à resposta individual de um dos cavalos componentes do grupo AH-APM.

Igualmente a De Grauw et al. (2014) que obtiveram melhores resultados no tratamento de claudicação de equinos quando utilizaram apenas triancinolona intra-articular, também observamos menor grau da claudicação no grupo TA, apesar de não ser estatisticamente significante em relação ao grupo AH-BPM. Goodrich; Nixon (2006), consideram a triancinolona um potente anti-inflamatório com ação analgésica indireta. O alívio da dor é atribuído à inibição da síntese das prostaglandinas, especificamente por inibir a expressão da fosfolipase A2 e COX-2 na cascata do ácido araquidônio (CARON, 2005).

A coleta seriada de LS permitiu acompanhar o perfil das citocinas inflamatórias, o *burst* oxidativo, e o comportamento dos GAGs no LS, apesar da punção articular em curto espaço de tempo agir como estímulo mecânico ao perfurar a membrana sinovial, provocando reação inflamatória transitória (MORAES et al., 2015; MOREIRA et al., 2015).

A contagem total de leucócitos no LS normal em equinos é de até 1000 células/ μ L, sendo 90% mononucleares e 10% polimorfonucleares (KAY et al., 2008). Dessa forma, a quantidade de células no início do nosso experimento pode ser considerada normal em todos os grupos. No estudo feito foi Kay et al. (2008), 12 horas após a indução da sinovite com LPS, o valor médio celular foi de 96759 células/ μ L, independente do grupo tratado, atingindo o pico com o grupo tratado com triancinolona de 170717 células/ μ L. De maneira semelhante no presente trabalho, a indução de sinovite por LPS acarretou em aumento exacerbado de células, com pico às 8 horas em todos os grupos independentemente do tratamento intra-articular instituído. Contudo, observou-se que os grupos tratados com AH mostraram maior redução na contagem de células totais as 24 e 48 horas do que o grupo TA.

A PGE_2 é um indicativo da inflamação articular ativa (MCLLWRAITH; TROTTER, 1996). Gibson et al. (1996) relata a concentração da PGE_2 no LS em articulações sadias em torno de $36,5 \pm 12,20$ pg/mL, e em articulações com OA em torno de $573,50 \pm 314,00$ pg/mL. Moreira et al., (2015) mensurou a PGE_2 em equinos hípidos e obteve a concentração média de $44,7 \pm 10,5$ pg/mL, valor semelhante ao de Moraes et al. (2015) que relata a média de $50,92 \pm 9,2$ pg/mL. De Grauw et al. (2009), em modelo de sinovite aguda com 0,50 ng de LPS, observou um pico da concentração de PGE_2 às 8 horas pós indução. Já no estudo feito por

Lucia et al. (2013), o pico da concentração de PGE₂ ocorreu 12 horas pós indução atingindo 2541,72 ± 127,53 pg/mL. A indução da inflamação articular foi evidenciada em nosso estudo às 8 horas quando ocorreu o pico da concentração de PGE₂ em todos os grupos, apesar de menor no grupo TA. A concentração plasmática máxima da triancinolona é atingida em média após 6,5 horas da administração intra-articular (KNYCH et al., 2013).

O aumento da concentração de PGE₂ manteve-se até às 48 horas, sendo de magnitude menor no grupo TA do que nos grupos tratados com AH (TA=78,71 pg/mL; AH-BPM=320,93 pg/mL; AH-APM=264,45 pg/mL). Mangal et al. (2014) demonstraram a ação da triancinolona na supressão da biossíntese de eicosanoides bioativos em equinos, incluindo PGE₂, semelhante ao que se observou em nosso trabalho. Em estudos realizados *in vitro*, a adição de AH em sinoviócitos equinos pré-tratados com LPS reduziu a concentração de PGE₂, além de IL-6 e MMP-3 (SANTANGELO et al., 2007).

Como esperado, o grupo AH-APM demonstrou maior concentração de AH no momento 8 horas em relação aos valores iniciais, provavelmente devido ao maior peso molecular e dificuldade de diluição no meio, persistindo por mais tempo no ambiente do que o AH-BPM. Contudo, às 24 e 48 horas houve redução da concentração de AH em ambos os grupos que receberam o tratamento com AH, sendo que às 48 horas o grupo TA apresentava concentração de AH maior que os outros dois grupos.

Frente a estes resultados supomos que havia ocorrido um *feedback* negativo na produção de AH endógeno pelos sinoviócitos. Contudo, analisando o peso molecular do AH nos três grupos observamos que apesar de todos os grupos avaliados apresentarem diminuição da porcentagem do AH de alto peso molecular presente no LS às 48 horas quando comparados ao momento 0 hora (p<0,05), o grupo tratado com TA foi o que mais sofreu redução na porcentagem de AH de alto peso molecular (p<0,05). Logo, apesar do grupo TA apresentar maior concentração de AH no LS às 48 horas, a porcentagem de AH de alto peso molecular é menor, inferindo que houve maior quebra das moléculas de AH. Conrozier et al. (2016) verificaram que *in vitro* a TA diminuiu a viscoelasticidade do AH, o que corrobora com o observado no presente estudo *in vivo*.

O CS é um biomarcador eficiente para estimar a degradação da cartilagem, como observado por Machado et al. (2011), Morais et al. (2015), Moreira et al. (2015). Em nosso estudo, apesar da triancinolona se mostrar eficiente na inibição da PGE₂ com consequente melhora da claudicação e circunferência articular no grupo TA, houve maior aumento da concentração de CS nos tempos 24 e 48 horas do que nos grupos tratados com AH. Cabe ressaltar que o grupo TA foi o único que apresentou aumento da concentração de CS às 8

horas ($p < 0.05$) em relação aos valores iniciais, e que neste momento o grupo AH-APM era o que possuía menor concentração de CS ($p < 0,05$).

Halicka et al. (2009) demonstraram *in vitro* que o AH-APM, tem capacidade de atenuar o dano causado por EROs ao DNA dos fagócitos e células vizinhas, sugerindo função anti-inflamatória do AH nos casos de OA. Em nosso estudo, observou-se que o grupo AH-BPM mostrou maior produção de EROs em relação aos valores basais nos momentos 8 e 24 horas e, às 24 horas, apresentou maior produção de EROs do que os grupos TA e AH-APM. Du Souich (2014) descreve ação pró-inflamatória do AH-BPM, porém não relata a ação em EROs.

Apesar do uso de corticosteroides, como a dexametasona, metilprednisolona e triancinolona, tanto em articulações de humanos quanto nas de equinos, ser bem difundido há vários anos, estudos envolvendo os efeitos dos corticosteroides no metabolismo da matriz cartilágnea tem rendido resultados conflitantes, e a preocupação de que seus possíveis efeitos deletérios sobreponham seus efeitos benéficos ainda permanece (GARVICAN et al., 2010). Knych et al. (2015) recomendam cautela com uso intra-articular de triancinolona em equinos, devido a inibição da expressão gênica do colágeno. Por sua vez, Frisbie et al. (1996) trataram equinos submetidos ao modelo de fragmento osteocondral com triancinolona e não observaram diferença com o grupo controle em relação a características da membrana sinovial, LS e parâmetros morfológicos da cartilagem.

No presente trabalho, pode-se demonstrar que o uso intra-articular de triancinolona possui efeito superior ao ácido hialurônico no controle da inflamação articular, por intermédio do controle de liberação de PGE_2 . Contudo, ficou evidente que tal benefício possui o contraponto de aumento evidente da liberação de CS no LS, indicativo de catabolismo articular e quebra da molécula de AH sinovial, além da presença de maior quantidade de células inflamatórias.

Em alguns locais, o uso intra-articular de corticosteroides diminuiu em decorrência de sua substituição pelo uso do ácido hialurônico ou dos glicosaminoglicanos polissulfatados (GOODRICH; NIXON, 2006). Existem evidências de que o uso de triancinolona ou metilprednisolona concomitantemente com ácido hialurônico é benéfico em cavalos (YATES et al., 2006; FRISBIE et al., 2009; MCILWRAITH, 2010).

O uso de AH tem sido objeto de estudos no tratamento de OA tanto em equinos quanto em humanos. Os estudos são controversos, enquanto as metanálises feitas por Richette et al. (2015) e Campbell et al. (2015) acreditam que o AH possa ter um efeito moderado na OA; Rutjes et al. (2012) concluíram que a viscosuplementação é associada a um pequeno e

irrelevante benefício clínico. Diversos estudos clínicos em humanos recomendam o uso de AH no tratamento de OA (DOUGADOS et al., 1993; ASARI et al., 2010; CAMPO et al., 2009; HASHIZUME et al., 2010).

Na comparação entre os grupos AH-BPM e AH-APM, os resultados tendem a indicar preferência ao uso do AH de alto peso molecular em articulações de equinos com sinovite, isto porque o grupo AH-APM demonstrou maior concentração de AH e menor concentração de CS às 8 horas ($p < 0,05$) e o grupo AH-BPM mostrou maior quantidade de EROs às 24 horas ($p < 0,05$).

Du Souich (2014) descreveu a ação pró-inflamatória do AH-BPM, e como foi observado que a fragmentação do AH no líquido sinovial resulta em aumento de MMPs e de receptores CD44 (OHNO-NAKAHARA et al., 2004), supõe-se que a despolimerização do AH contribua para a indução de atividades degradativas da matriz cartilágnea.

Já em relação ao AH-APM, há evidências de que o mesmo reverta os efeitos pró-inflamatórios de fragmentos de matriz extracelular via CD44, TLR4 e ICAM1. Foi proposto que o mecanismo por detrás do efeito do AH-APM seja um simples efeito de competição, em que o AH-APM se liga ao CD44, TLR4 e ICAM1 e impede a ligação de fragmentos de ECM ou do LPS (Campo et al., 2010a, 2010b).

A completa elucidação dos mecanismos moleculares que controlam a quantidade e tamanho molecular do AH ou de como o AH ativa o CD44 podem levar futuramente ao desenvolvimento de estratégias supressoras da inflamação (HELDIN et al., 2008).

9 CONCLUSÕES

- Apesar da triancinolona possuir efeito superior ao ácido hialurônico no controle da inflamação, ela possui efeito catabólico sobre a cartilagem articular, demonstrado pelo aumento da concentração de CS, além de quebra da molécula de AH no líquido sinovial.
- O AH-APM é mais indicado para terapia intra-articular em equinos uma vez que demonstrou menor efeito catabólico e oxidativo do que o AH-BPM.

REFERÊNCIAS

AALTONEN, K.; NIEMELÄ, T.; SANKARI, S.; TULAMO, R.-M. Determination of the unsaturated disaccharides of hyaluronic acid in equine synovial fluid by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 57, n. 1, p. 12, 2015.

ALTMAN, R. D.; MANJOO A.; FIERLINGER, A., NIAZI, F.; NICHOLLS, M. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 16, p. 321, 2015.

ASARI, A.; KANEMITSU, T.; KURIHARA, H. Oral administration of high molecular weight hyaluronan (900 kDa) controls immune system via toll-like receptor 4 in the intestinal epithelium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 32, p. 24751–24758, 2010.

AYRAL, X.; PICKERING, E. H.; WOODWORTH, T. G.; MACKILLOP, N.; DOUGADOS, M. Synovitis: A potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis - Results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 5, p. 361–367, 2005.

BAND, P.A.; HEETER, J.; WISNIEWSKI, H.G.; LIUBLINSKA, V.; PATTANAYAK, C.W., KARIA, R.J.; STABLER, T.; BALAZS, E.A.; KRAUS, V. B . Hyaluronan molecular weight distribution is associated with the risk of knee osteoarthritis progression. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 23, p. 70-76, 2015.

BENITO, M. J.; VEALE, D. J.; FITZGERALD, O.; VAN DEN BERG, W. B.; BRESNIHAN, B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, n. 9, p. 1263–7, 2005.

BRESNIHAN, B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 64, n. 9, p. 1263–7, 2005.

CAMPO, G. M.; AVENOSO, A.; CAMPO, S.; D'ASCOLA, A.; TRAINA, P.; SAMÀ, D.; CALATRONI, A. Glycosaminoglycans modulate inflammation and apoptosis in LPS-treated chondrocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 106, n. 1, p. 83–92, 2009.

CAMPO, G. M., AVENOSO, A., CAMPO, S., D'ASCOLA, A., NASTASI, G., & CALATRONI, A. Molecular size hyaluronan differently modulates toll-like receptor-4 in LPS-induced inflammation in mouse chondrocytes. **Biochimie** v.92, p. 204–215, 2010a.

CAMPO, G. M., AVENOSO, A., CAMPO, S., D'ASCOLA, A., NASTASI, G., & CALATRONI, A. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. **Biochem Pharmacol** v.80, p. 480–490, 2010b.

CARON, J. P. Intra-articular injections for joint disease in horses. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 21, n. 3, p. 559-573, 2005.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2011. p. 655-668.

CAMPO, G. M., AVENOSO, A., D'ASCOLA, A., PRESTIPINO, V., SCURUCHI, M., NASTASI, G. Hyaluronan differently modulates TLR-4 and the inflammatory response in mouse chondrocytes. **Biofactors**, v. 38, p. 69–76(2012a).

CANTLEY, C. E.; FIRTH, E. C.; DELAHUNT, J. W.; PFEIFFER, D. U.; THOMPSON, K. G. Naturally occurring osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of wild horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 31, n. 1, p. 73-81, 1999.

CHAJARA, A.; RAOUDI, M.; DELPECH, B.; LEROY, M.; BASUYAU, J. P.; LEVESQUE, H. Increased hyaluronan and hyaluronidase production and hyaluronan degradation in injured aorta of insulin-resistant rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 6, p. 1480–1487, 2000.

CONROZIER, T.; PATARIN, J.; MATHIEU, P.; RINAUDO, M. Steroids, lidocain and ioxaglic acid modify the viscosity of hyaluronic acid: in vitro study and clinical implications. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 170, 2016.

DE GRAUW, J. C.; VAN LOON, J. P. a M.; VAN DE LEST, C. H. a; BRUNOTT, a; VAN WEEREN, P. R. In vivo effects of phenylbutazone on inflammation and cartilage-derived biomarkers in equine joints with acute synovitis. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 1, p. 51–6, 2014a.

DE GRAUW, J. C.; VISSER-MEIJER, M. C.; LASHLEY, F.; MEEUS, P.; VAN WEEREN, P. R. Intra-articular treatment with triamcinolone compared with triamcinolone with hyaluronate: A randomised open-label multicentre clinical trial in 80 lame horses. **Equine Veterinary Journal**, n. Mc, p. 1–7, 2014b.

DEVLIN, T. M. Manual de bioquímica com correlações clínicas. 2 ed. São Paulo: Blucher, 2006. 1236p.

DU SOUICH, P. Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS.

Pharmacology & Therapeutics, v. 142, n. 3, p. 362–74, 2014.

FERRIS, D. J.; FRISBIE, D. D.; MCILWRAITH, C. W.; KAWCAK, C. E. Current joint therapy usage in equine practice: A survey of veterinarians 2009. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 5, p. 530–535, 2011.

FIRTH, E. C. Functional joint anatomy and its development. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint Disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 80-119.

FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W.; POWERS, B. E. Effects of triamcinolone in an equine in vivo osteochondral fragment model. **Equine Veterinary Journal**, v. 29, p. 270, 1996.

FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; MCILWRAITH, C. W., WERPY, N. M. Evaluation of polysulfated glycosaminoglycan or sodium hyaluronan administered intra-articularly for treatment of horses with experimentally induced osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 2, p. 203-209, 2009.

GARVICAN, E. R.; VAUGHAN-THOMAS, A.; REDMOND, C.; GABRIEL, N.; CLEGG, P. D. MMP-mediated collagen breakdown induced by activated protein C in equine cartilage is reduced by corticosteroids. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 28, n. 3, p. 370-378, 2010.

GAUSTAD, G.; LARSEN, S. Comparison of polysulphated glycosaminoglycan and sodium hyaluronate with placebo in treatment of traumatic arthritis in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, n. 5, p. 356–362, 1995.

Gibson, K. T.; Hodge, H., Whittam.; T. 1996. Inflammatory mediators in equine synovial fluid. **Australian Veterinary Journal**. v.73, p. 148–151

GOODRICH, L. R.; NIXON, A. J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - A review. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 1, p. 51–69, 2006.

HARDY, J.; BERTONE, A.L.; MUIR, W. W. Local hemodynamics, permeability, and oxygen metabolism during acute inflammation of innervated or denervated isolated equine joint. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, n.59, n.10, p.1307-1316, 1998.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. High molecular weight hyaluronic acid inhibits IL-6-induced MMP production from human chondrocytes by up-regulating the ERK inhibitor, MKP-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 403, n. 2, p. 184–189, 2010.

HELDIN, P.; KAROUSOU, E.; BERNERT, B.; PORSCH, H.; NISHITSUKA, K.; SKANDALIS, S. Importance of hyaluronan-CD44 interactions in inflammation and tumorigenesis. *Connective Tissue Research*, v. 49, n. 3, p. 215-218, 2008.

HUI, A. Y.; MCCARTY, W. J.; MASUDA, K.; FIRESTEIN, G. S.; SAH, R. L. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 15–37, 2012.

Ishihara, A., Bertone, A. L.; Rajala-Schultz, P. J. Association between subjective lameness grade and kinectic gait parameters in horses with experimentally induced forelimb lameness. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, p.1805-1815, 2005

KAY, A. T.; BOLT, D. M.; ISHIHARA, A.; RAJALA-SCHULTZ, P. J.; BERTONE, A. L. Anti-inflammatory and analgesic effects of intra-articular injection of triamcinolone acetonide, mepivacaine hydrochloride, or both on lipopolysaccharide-induced lameness in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 12, p. 1646-1654, 2008.

KIKUCHI, T.; YAMADA, H.; SHIMMEI, M. Effect of high molecular weight hyaluronan on cartilage degeneration in a rabbit model of osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 4, n. 2, p. 99–110, 1996.

KNUDSON, W.; AGUIAR, D. J.; HUA, Q.; KNUDSON, C. B. CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis. **Experimental cell research**, v. 228, n. 2, p. 216–228, 1996.

KNUDSON, W.; LOESER, R. F. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 1, p. 36–44, 2002.

KNYCH, H. K.; VIDAL, M. a; CASBEER, H. C.; MCKEMIE, D. S. Pharmacokinetics of triamcinolone acetonide following intramuscular and intra-articular administration to exercised Thoroughbred horses. **Equine veterinary journal**, v. 45, n. 6, p. 715–20, 2013.

LEE, H. G.; COWMAN, M. K. An agarose gel electrophoretic method for analysis of hyaluronan molecular weight distribution. **Analytical biochemistry**, 1994. .

LUCIA, J. L.; COVERDALE, J. A.; ARNOLD, C. E.; WINSKO, K. N. Influence of an intra-articular lipopolysaccharide challenge on markers of inflammation and cartilage metabolism in young horses. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 6, p. 2693–9, 2013.

MacDonald, M. H.; S. M. Stover, S. M.; Willits, N. H.; Benton, H. P. Effect of bacterial lipopolysaccharide on sulfated glycosaminoglycan metabolism and prostaglandin E2 synthesis in equine cartilage explants cultures. **American Journal of Veterinary Research**. v.55, p. 1127-1138, 1994

MACHADO, T. S. L.; CORREIA da SILVA, L. C. L.; BACCARIN, R. Y. A.; MICHELACCI, Y. M. Synovial fluid chondroitin sulphate indicates abnormal joint metabolism in asymptomatic osteochondritic horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n.4, p. 404–411, 2012.

MANGAL, D.; UBOH, C. E.; SOMA, L. R.; LIU, Y. Inhibitory effect of triamcinolone acetonide on synthesis of inflammatory mediators in the equine. **European journal of pharmacology**, v. 736, p. 1–9, 2014.

MCILWRAITH, C. W. General pathobiology of the joint and response to injury. In: MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: WB Saunders, 1996. p. 40-70.

MCILWRAITH, C. W. The use of intra-articular corticosteroids in the horse: what is known on a scientific basis ? **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 6, p. 563-571, 2010.

MORAES, A. P. L.; MOREIRA, J. J.; BROSSI, P. M.; MACHADO, T. S. L.; MICHELACCI, Y. M.; BACCARIN, R. Y. A. Short- and long-term effects of platelet-rich plasma upon healthy equine joints: Clinical and laboratory aspects. **Canadian Veterinary Journal**, v. 56, n. 8, p. 831–838, 2015.

MOREIRA, J. J.; MORAES, A. P. L.; BROSSI, P. M.; MACHADO, T. S. L.; MICHELACCI, Y. M.; MASSOCO, C. O.; BACCARIN, R. Y. A. Autologous processed plasma: Cytokine profile and effects upon injection into healthy equine joints. **Journal of Veterinary Science**, v. 16, n. 1, p. 47–55, 2015.

OWEN, J. A.; PUNT, J.; STRANFORD, S. A. Contemporary targeted therapies in rheumatology. **Kuby immunology**. New York: WH Freeman, p.427-444, 2013.

OHNO-NAKAHARA, M.; HONDA, K.; TANIMOTO, K.; TANAKA, N.; DOI, T.; SUZUKI, A.; YONENO, K.; NAKATANI, Y.; UEKI, M.; OHNO, S.; KNUDSON, W.; KNUDSON, C. B.; TANNE K. Induction of CD44 and MMP expression by hyaluronidase treatment of articular chondrocytes. **Journal of Biochemistry**, v. 135, n. 5, p. 567-575, 2004.

PALMER, B. Y. J. A. N. L.; BERTONE, A. L.; MALEMUD, C. J.; MANSOUR, J. Biochemical and biomechanical alterations in equine articular cartilage following an experimentally-induced synovitis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 4, n. 2, p. 127–137, 1996.

PELLETIER, J. P.; CARON, J. P.; EVANS, C.; ROBBINS, P. D.; GEORGESCU, H. I.; JOVANOVIC, D.; FERNANDES, J. C.; MARTEL-PELLETIER, J. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 6, p. 1012-1019, 1997.

PHILIPS, M. W. Clinical trial comparison of intra-articular sodium hyaluronate products in the horse. **Equine Veterinary Science**, v.9, n.1, p. 39-42, 1989.

RASERA, Luciane. Influência da atividade física sobre a articulação metacarpofalangeana de cavalos de pólo. 2007. 159 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-13122007-125142/>>. Acesso: 05 jun. 2016.

ROSS, T. N.; KISIDAY, J. D.; HESS, T.; MCILWRAITH, C. W. Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: A comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 12, p. 1583–1590, 2012.

SAMUELS, J.; KRASNOKUTSKY, S.; ABRAMSON, S. B. Osteoarthritis: A tale of three tissues. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 66, n. 3, p. 244–250, 2008.

SANTANGELO, K. S.; JOHNSON, A. L.; RUPPERT, A. S.; BERTONE, A. L. Effects of hyaluronan treatment on lipopolysaccharide-challenged fibroblast-like synovial cells. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2007.

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

SCHLUETER, A. E.; ORTH, M. W. Equine osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 1, n. 4, p. 221-231, 2004a.

SMITH, M.M.; GHOSH, P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment **Rheumatology Int**, v.7, p.113-122, 1987

SMOLEN, J.S.; LIPSKY, P.E. New developments in NF-Kb. In: SMOLEN, J.S.; LIPSKY, P.E. Contemporary Targeted Therapies in Rheumatology. Florida: Taylor & Francis, 2007 .p. 285-296

STERN, R.; ASARI, A. A.; SUGAHARA, K. N. Hyaluronan fragments: An information-rich system. **European Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 8, p. 699–715, 2006.

TURLEY, E. A.; NOBLE, P. W.; BOURGUIGNON, L. Y. W. Signaling properties of hyaluronan receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 4589–4592, 2002.

WHITTON, R. C.; HODGSON, D. R.; ROSE, R. J. Musculoskeletal System. In: ROSE, R.F.; HODGSON, D. R. **Manual of equine practice**. 2. ed. Philadelphia: Saunders. 2000. p. 95-186.

VAN DER KRAAN, P. M.; BUMA, P.; VAN KUPPEVELT, T.; VAN DEN BERG, W. B. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: Relevance for articular cartilage tissue engineering. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 10, n. 8, p. 631–637, 2002.

VAN LOON, J. P. A. M.; DE GRAUW, J. C.; BRUNOTT, A; WEERTS, E. A. W. S.; VAN WEEREN, P. R. Upregulation of articular synovial membrane μ -opioid-like receptors in an acute equine synovitis model. **Veterinary journal**, v. 196, n. 1, p. 40–46, 2013.

VAN LOON, J. P. A.M.; DE GRAUW, J. C.; VAN DIERENDONCK, M.; L'AMI, J. J.; BACK, W.; VAN WEEREN, P. R. Intra-articular opioid analgesia is effective in reducing pain and inflammation in an equine LPS induced synovitis model. **Equine veterinary journal**, v. 42, n. 5, p. 412–9, 2010.

VAN LOON, J. P. A. M.; MENKE, E. S.; L'AMI, J. J.; JONCKHEER-SHEEHY, V. S. M.; BACK, W.; RENÉ VAN WEEREN, P. Analgesic and anti-hyperalgesic effects of epidural morphine in an equine LPS-induced acute synovitis model. **Veterinary Journal**, v. 193, n. 2, p. 464–470, 2012.

YASUDA, T. Hyaluronan inhibits cytokine production by lipopolysaccharide-stimulated U937 macrophages through down-regulation of NF- κ B via ICAM-1. **Inflammation Research**, v. 56, n. 6, p. 246–253, 2007.

YASUI, T.; AKATSUKA, M.; TOBETTO, K.; HAYAISHI, M.; ANDO, T. The effect of hyaluronan on interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. **Agents Actions**, v. 37, p. 155–156, 1992.

YATABE, T.; MOCHIZUKI, S.; TAKIZAWA, M.; CHIJIWA, M.; OKADA, a; KIMURA, T.; FUJITA, Y.; MATSUMOTO, H.; TOYAMA, Y.; OKADA, Y. Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, n. 6, p. 1051–1058, 2009.

YATES, A. C.; STEWART, A. A.; BYRON, C. R.; PONDENIS, H. C.; KAUFMANN, K. M.; CONSTABLE, P. D. Effects of sodium hyaluronate and methylprednisolone acetate on proteoglycan metabolism in equine articular chondrocytes treated with interleukin-1. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 12, p. 1980-1986, 2006.

Apêndice A

Frequência cardíaca (BPM) – grupo triancinolona

Animais	0H	8H	24H	48H
2	36	32	36	34
6	32	36	36	34
8	34	36	34	38
4	36	44	38	32
1	28	38	30	28
3	38	40	34	36
7	36	42	42	44
5	32	39	36	36
MÉDIA	34aA	38bA	36aA	35aA
DP	3,21	3,78	3,45	4,65
erro	1,13	1,34	1,22	1,64

Frequência cardíaca (BPM) – grupo AH-BPM

Animais	0h	8H	24H	48H
2	30	34	26	30
6	30	32	30	30
11	42	64	51	46
1	32	36	36	33
5	33	54	36	38
12	38	38	36	38
10	32	42	36	36
9	28	44	30	32
MÉDIA	33aA	43bAB	35aA	35aA
DP	4,64	10,95	7,47	5,37
erro	1,64	3,87	2,64	1,90

Frequência cardíaca (BPM) – grupo AH-APM

Animais	0H	8H	24H	48H
4	32	45	36	36
8	30	36	36	32
11	36	52	36	39
3	28	36	30	30
7	39	68	42	44
12	36	44	39	39
10	36	46	38	39
9	36	48	42	38
MÉDIA	34aA	47B	37aA	37aA
DP	3,72	10,16	3,89	4,42
Erro	1,32	3,59	1,38	1,56

Apêndice B

Frequência respiratória (MPM) – grupo triancinolona

Animais	0H	8H	24H	48H
2	14	16	14	14
6	12	14	14	16
8	12	12	12	14
4	14	16	16	14
1	12	22	12	14
3	16	18	16	18
7	10	14	12	10
5	12	14	12	16
MÉDIA	13aA	16bA	14aA	15aA
DP	1,83	3,11	1,77	2,33
erro	0,65	1,10	0,63	0,82

Frequência respiratória (MPM) – grupo AH-BPM

Animais	0H	8H	24H	48H
2	12	14	12	14
6	14	14	12	14
11	16	48	20	18
1	14	14	14	16
5	14	36	14	16
12	14	34	16	18
10	16	20	16	14
9	16	18	16	16
MÉDIA	15aA	25bB	15aA	16aA
DP	1,41	12,91	2,62	1,67
erro	0,50	4,57	0,93	0,59

Frequência respiratória (MPM) – grupo AH-APM

Animais	0H	8H	24H	48H
4	14	16	14	14
8	12	16	12	14
11	16	22	18	16
3	12	16	14	12
7	15	40	16	16
12	16	20	16	16
10	12	18	14	16
9	14	24	16	16
MÉDIA	14aA	22bB	15Aa	15aA
DP	1,73	8,05	1,85	1,51
Erro	0,61	2,85	0,65	0,53

Apêndice C

Média da Temperatura em °C – grupo triancinolona

Animais	0H	8H	24H	48H
2	36,6	37,1	36,6	36,4
6	36,6	36,5	36,6	36,8
8	36,8	37,8	37	36,8
4	36,8	37,2	36,8	36,6
1	36,3	36,7	36,7	36,3
3	36,5	36,8	36,6	36,8
7	36	36,4	36,2	36
5	36,3	36,8	36,6	36,2
MÉDIA	36,5aA	36,9bA	36,6Aa	36,5Aa
DP	0,27	0,45	0,23	0,31
erro	0,10	0,16	0,08	0,11

Média da Temperatura em °C – AH-BPM

Animais	0H	8H	24H	48H
2	36,2	36,6	36,2	36,2
6	36,4	36,6	36,2	36,2
11	36,6	38,9	37,1	37
1	36	36,8	36,6	36,9
5	36,8	37,8	36,8	36,4
12	36,4	37,8	37	36,8
10	37	37	37,2	36,8
9	36,9	37,4	37	36,8
MÉDIA	36,5aA	37,4bA	36,8Aa	36,6aA
DP	0,35	0,79	0,39	0,32
erro	0,12	0,28	0,14	0,11

Média da Temperatura em °C – AH-APM

Animais	0H	8H	24H	48H
4	36,2	36,6	36,2	36,2
8	36,2	36,4	36,2	36
11	36,2	36,8	37,1	37,2
3	36,4	36,5	37,2	37,3
7	36,6	38	37	36,4
12	36,2	37,1	37,1	37
10	36,6	37,1	37,1	36,2
9	36,2	37,2	36,2	37
MÉDIA	36,3aA	37,0bA	36,8Aa	36,7aA
DP	0,18	0,52	0,47	0,52
Erro	0,06	0,18	0,17	0,18

Apêndice D

Média da circunferência articular em centímetros no grupo triancinolona

Animais	T0	T8	T24	T48
2	24	24,2	24	24
6	24	24	24	24
8	25,2	26	25,2	25,2
4	23	23,2	23	23
1	25	25,4	25	25
3	25	25,6	25	25
7	27,2	27,5	27,2	27
5	24	24,4	24	24
Média	24,68aA	25,04bA	24,68aA	24,65aA
DP	1,26	1,36	1,26	1,20
ERRO	0,44	0,48	0,44	0,42

Média da circunferência articular em centímetros no grupo AH-BPM

Animais	0H	8H	24H	48H
2	24	25	25	25
6	24,8	26,2	27	26
11	26,2	27	27,2	26,2
1	24,2	25,2	25,4	25,2
5	23,3	25	25,6	25,6
12	24	25	25,2	25
10	24,2	25,4	26	25
9	26,2	28,4	26,2	26,2
Média	24,61Aa	25,90bA	25,95bB	25,53Bb
DP	1,06	1,24	0,81	0,54
ERRO	0,38	0,44	0,29	0,19

Média da circunferência articular em centímetros no grupo AH-APM

Animais	0H	8H	24H	48H
4	23	24	24	24
8	25	26,2	25	26
11	24,2	25	25	25
3	24	24,6	24,6	24,2
7	23,5	24,4	24,8	24
12	24,2	25	25	24,8
10	23	23,8	23,5	23
9	26	27,2	26,5	26
Média	24,11aA	25,03bA	24,80bA	24,63bB
DP	1,02	1,15	0,88	1,04
ERRO	0,36	0,41	0,31	0,37

Apêndice E

Análise da soma de vetores (Lameness Locator®) do grupo triancinolona

Animais	0H	8H	24H	48H
2	3,9	4,7	4,9	5,3
6	5,1	58,2	6,2	5,5
8	6,8	149,9	14,7	10,1
4	4,9	100,5	77,9	6
1	3,5	83,6	14,7	5,3
3	3,9	27	25	3
7	6,6	66	17,2	10,7
5	3,6	41,4	7,1	6,1
Média	4,79aA	66,41bA	20,96bA	6,50bA
DP	1,31	45,49	23,96	2,60
ERRO	0,46	16,08	8,47	0,92

Análise da soma de vetores (Lameness Locator®) do grupo AH-BPM

Animais	0H	8H	24H	48H
2	2	75,1	15,2	11
6	4,3	206,7	170,3	72,3
11	5,4	6,3	4,3	3,2
1	1,1	100,4	8,4	4,7
5	5,2	86,8	76,2	19,6
12	5,4	222,2	78,8	26,3
10	7,1	133,1	33,4	34,4
9	1,1	235,8	67	12,9
Média	3,95aA	133,30bA	56,70bA	23,05bA
DP	2,26	81,55	55,06	22,54
ERRO	0,80	28,83	19,47	7,97

Análise da soma de vetores (Lameness Locator®) do grupo AH-APM

Animais	0H	8H	24H	48H
4	6	51,7	96	17,1
8	6,4	144,1	131,8	20,3
11	2,4	20,9	18,4	10
3	5	199,5	149,1	7,9
7	5,3	260	215,4	4,6
12	2,9	408,2	262,2	36,9
10	6	145,5	48,1	46,2
9	5,3	199,4	192,5	43
Média	4,91aA	178,66bB	139,19bB	23,25bA
DP	1,48	121,58	83,40	16,51
ERRO	0,52	42,98	29,49	5,84

Apêndice F

Quantidade de células / μ L no grupo triancinolona.

Animais	T0T	T1T	T8T	T24T	T48T
2	600	4800	124800	93700	28000
6	600	8300	92800	56700	7500
8	265	200	200200	113600	46500
4	65	100	209600	149800	76700
1	950		50825	7500	7500
3	270		122300	156750	36900
7		300	94800	108000	19300
5	100	2200	135600	105100	39300
MÉDIA	407aA	2650aA	128866bA	98894bA	32713Ba
DP	321,32	3309,83	53802,76	48457,07	22864,10
erro	121,45	1351,23	19022,15	17132,16	8083,68

Quantidade de células / μ L no grupo AH-BPM

Animais	T0L	T1L	T8L	T24L	T48L
2	5	500	23100	10500	3900
6	40	3600	56400	26900	3800
11	55	300	183300	62700	7800
1	1000	1200	105500	26700	6400
5	100	100	171800	76500	14700
12	358	400	171700	36400	11500
10		1700	182800	113900	38900
9	120	1700	166000	34400	12800
MÉDIA	407aA	1188aA	132575bA	48500bB	12475bB
DP	354,72	1159,36	63022,26	33793,11	11413,24
erro	134,07	409,89	22281,73	11947,67	4035,19

Quantidade de células / μ L no grupo AH-APM

Animais	T0H	T1H	T8H	T24H	T48H
4	300	1500	150400	70300	9600
8	100	300	20300	45200	8500
11	175	900	132000	105000	6400
3	200	400	12500	52800	3500
7	300	400	140400	49200	13900
12	280	500	165400	90900	15200
10	273	1800	152800	73000	7900
9	125	700	150500	83100	2700
MÉDIA	407aB	813bA	115538bA	71188bAB	8463bB
DP	80,23	556,62	61977,64	21296,37	4450,66
Erro	30,32	196,79	21912,41	7529,41	1573,55

Apêndice G

Concentração de PGE₂ (pg/mL) dos equinos tratados com triancinolona

Animais	0H	8H	24H	48H
2	40,518	957,572	441,074	64,367
6	40,689	9970,35	318,959	64,705
8	24,199	10526,47	331,709	74,91
4	16,844	25098,8	789,447	95,708
1	65,065	790,57	107,586	64,288
3	32,872	24052,75	1099,12	68,587
7		33022,4	2252,1	106,879
5	33,065	51999,2	756,633	90,242
Média	36,18aH	19552,26Ba	762,08bA	78,71bA
DP	15,34	17551,18	681,12	16,66
ERRO	5,80	6205,28	240,81	5,89

Concentração de PGE₂ (pg/mL) dos equinos tratados com AH-BPM

Animais	0H	8H	24H	48H
2	29,283	74,554	49,817	60,636
6	29,65	7729,75	277,595	144,76
11	51,66	15622,2	590,4	271,55
1	66,772	1163,635	742,492	544,024
5	86,864	92073,4	3182,95	203,398
12	34,063	10337,2	716,256	229,743
10		162978	2868,00	619,575
9	37,475	63988,8	783,173	493,727
Média	47,97aA	44245,94Bab	1151,34bA	320,93Bb
DP	21,86	58412,69	1186,70	204,30
ERRO	8,26	20652,01	419,56	72,23

Concentração de PGE₂(pg/mL) dos equinos tratados com AH-APM

Animais	0h	8h	24H	48H
4	17,97	22217,7	863,624	144,293
8	19,988	2506	219,589	55,291
11	24,08	77663,4	641,957	168,64
3	45,916	45004,8	2127,9	306,235
7	174,245	121255	2355,75	576,652
12	31,419	57391,8	804,803	176,716
10	28,192	109366	793,1	174,467
9	22,609	75387,8	5187,8	513,28
Média	45,55aA	63849,06bB	1624,32bA	264,45Bb
DP	52,73	40680,21	1619,81	186,81
ERRO	18,64	14382,63	572,69	66,05

Apêndice H

Concentração do AH ($\mu\text{g/mL}$) dos equinos tratados com triancinolona

Animais	0H	8H	24H	48H
2	365,79	200,11	272,84	341,97
6	461,99	320,39	456,14	589,28
8	499,57	215,09	320,73	373,4
4	379,92	242,33	221,14	328,59
1	411,43	457,98	266,76	576,79
3	362,06	288,36	405,56	281,43
7		253,21	441,72	372,68
5	369,99	182,51	274,95	442,71
Média	407,25aA	270,00bA	332,48bA	413,36Aa
DP	53,90	88,49	89,67	114,30
ERRO	20,37	31,29	31,70	40,41

Concentração do AH ($\mu\text{g/mL}$) dos equinos tratados com AH-BPM

Animais	0H	8H	24H	48H
2	471,26	264,2	388,5	358,61
6	378,71	210,97	404,02	330,42
11	197,49	177,27	251,06	107,11
1	497,94	291,13	389,51	387,48
5	308,2	167,87	239,33	321,09
12	344,28	121,99	189,49	303,11
10		227,55	322,32	250,87
9	348,5	140,82	216,09	137,36
Média	363,77aA	200,23bA	300,04bA	274,51Bb
DP	100,94	59,09	86,60	102,36
ERRO	38,15	20,89	30,62	36,19

Concentração do AH ($\mu\text{g/mL}$) dos equinos tratados com AH-APM

Animais	0H	8H	24H	48H
4	275,44	466,07	334,13	307,88
8	487,05	807,51	391,09	320,57
11	381,91	529,33	236,97	155,59
3	357,97	939,92	188,65	164,78
7	339,2	599,15	156,48	226,72
12	395,38	469,57	229,26	225,55
10	365,08	428,24	336,81	130,15
9	352,47	649,03	278,91	148,87
Média	369,31aA	611,10bB	269,04bA	210,01Bb
DP	59,58	181,06	80,68	73,14
ERRO	21,07	64,01	28,53	25,86

Apêndice I

Concentração de CS ($\mu\text{g/mL}$) dos equinos tratados com triancinolona

Animais	0H	8H	24H	48H
2	42,91	98,02	772,47	879,72
6	77,06	78,23	666,79	850,47
8	35,05	89,77	608,82	454,39
4	28,93	87,93	474,19	402,44
1	24,93	91,54	322,49	532,38
3	49,24	83,11	687,56	831,47
7		8,74	502,6	678,18
5	43,7	125,21	543,4	815,77
Média	43,12aA	82,82bA	572,29bA	680,60bA
DP	17,26	33,14	142,10	192,75
ERRO	6,52	11,72	50,24	68,15

Concentração de CS ($\mu\text{g/mL}$) dos equinos tratados com AH-BPM

Animais	0H	8H	24H	48H
2	68,51	77,7	180,14	131,82
6	36,37	33,16	321,06	100,9
11	12,29	54,46	148,31	61,9
1	39,4	38,27	156,84	78,55
5	24,24	68,54	154,21	244,2
12	42,11	51,33	165,82	108,23
10		46,5	303,91	362,1
9	63,77	122,78	131,3	59,23
Média	40,96aA	61,59aA	195,20bB	143,37bB
DP	20,02	28,76	73,86	106,30
ERRO	7,57	10,17	26,11	37,58

Concentração de CS ($\mu\text{g/mL}$) dos equinos tratados com AH-APM

Animais	0H	8H	24H	48H
4	17,5	48,28	222,89	95,33
8	36,17	26,46	159,51	65,41
11	41,98	38,06	204,49	69,99
3	32,17	12,56	67,36	87,1
7	44,06	62,05	336,1	136,65
12	38,88	36,71	271,43	111,01
10	56,18	27,45	698,45	172,75
9	37,14	37,87	311,75	54,09
Média	38,01aA	36,18aB	284,00bB	99,04aB
DP	10,97	14,88	188,19	39,90
ERRO	3,88	5,26	66,53	14,11

Apêndice H

Peso molecular (kDa) do AH-APM presente no LS

ANIMAL	TEMPO	Triancinolona	AH-BPM	AH-APM
1	0h	3420 kDa	3420 kDa	
	48h	2734 kDa	3420 kDa	
2	0h	548 kDa	2419 kDa	
	48h	2214 kDa	2419 kDa	
3	0h	3058 kDa		3825 kDa
	48h	3825 kDa		3825 kDa
4	0h	2245 kDa		2129 kDa
	48h	2501 kDa		1911 kDa
5	0h	2139 kDa	2139 kDa	
	48h	2419 kDa	1892 kDa	
6	0h	1950 kDa	2640 kDa	
	48h	1950 kDa	2370 kDa	
7	0h			1717 kDa
	48h			2078 kDa
8	0h	2419 kDa		2736 kDa
	48h	2573 kDa		2736 kDa
9	0h		1716 kDa	2736 kDa
	48h		2372 kDa	1673 kDa
10	0h			
	48h			
11	0h		2501 kDa	2736 kDa
	48h		2370 kDa	1673 kDa
12	0		2370 kDa	1950 kDa
	48h		2640 kDa	1033 kDa

Apêndice L

Porcentagem do AH de alto peso molecular do grupo triancinolona

Animais	0H	48H
2	89%	32
6	88%	36
8	79%	22%
4	40%	13%
1	82%	22%
3	91%	10%
7	80%	19%
5		
Média	78%aA	22%bA
DP	18	9

Porcentagem do AH de alto peso molecular do grupo tratado com AH-BPM

Animais	0H	8H
2	92	77
6	96	70
11	87	52
1	81	41
5	80	58
12	65	44
10	75	44
9		
Média	82%aA	55%bB
DP	11	14

Porcentagem do AH de alto peso molecular do grupo tratado com AH-APM

Animais	0H	8H
4	87%	52%
8	90%	74%
11	87%	89%
3	82%	67%
7	92%	78%
12	63%	46%
10	78%	65%
9		
Média	83%aA	67%bB
DP	10	15

Apêndice M

Média da intensidade de fluorescência do grupo triancinolona

Animais	0T	8T	24T	48T
2	105	374	894	470
6	3206	9895	4723	617
8	104	425	1798	2081
4		918	1916	2375
1	106	1730	1105	1077
3	136	2139	1090	1133
7	61,5	1825	636	695
5	58,5	1551	386	699
Média	540aA	2357aA	1569aA	1143aA
DP	1176,10	3115,18	1377,93	710,09
ERRO	444,52	1101,38	487,17	251,05

Média da intensidade de fluorescência do grupo AH-BPM

Animais	0L	8L	24L	48L
2	1488	9875	4560	787
6	78,6	239	968	349
11	84,4	1265	9823	826
1	60,4	1313	9716	509
5	336	9879	9815	9111
12	110	2956	654	108
10	98,8	1720	665	201
9	108	2120	1242	2008
Média	296aA	3671bA	4680bB	1737aA
DP	489,73	3907,50	4409,76	3038,54
ERRO	173,15	1381,51	1559,09	1074,29

Média da intensidade de fluorescência do grupo AH-APM

Animais	0H	8H	24H	48H
4	122	1312	1358	1631
8	263	686	1082	1067
11	267	1038	1121	1269
3	63,8	1850	1073	689
7	106	1641	1166	1436
12	83,5	1888	529	1470
10	20,7	1104	1233	359
9		9655	9476	9818
Média	132aA	2397aA	2130aA	2217aA
DP	96,22	2962,43	2978,27	3100,57
ERRO	36,37	1047,38	1052,98	1096,22