

JULIANA JUNQUEIRA MOREIRA

Avaliação dos efeitos da utilização de plasma autólogo condicionado
em articulações sinoviais hígidas de equinos

São Paulo
2013

JULIANA JUNQUEIRA MOREIRA

**Avaliação dos efeitos da utilização de plasma autólogo condicionado em articulações
sinoviais hígidas de equinos**

São Paulo

2013

JULIANA JUNQUEIRA MOREIRA

Avaliação dos efeitos da utilização de plasma autólogo condicionado em articulações sinoviais hígidas de 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

2013

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

3/6/13

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2791
FMVZ

Moreira, Juliana Junqueira

Avaliação dos efeitos da utilização de plasma autólogo condicionado em articulações sinoviais hígidas de equinos / Juliana Junqueira Moreira. -- 2013.
134 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin.

1. Equino. 2. Líquido sinovial. 3. Plasma autólogo condicionado. 4. IL-1ra.
5. Inflamação. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos de plasma autólogo em articulações sinoviais de equinos", protocolado sob o nº 2266/2011, utilizando 10 (dez) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Evaluation of the use of the plasma autologous in horse joints", protocol number 2266/2011, utilizing 10 (ten) horses, under the responsibility Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MOREIRA, Juliana Junqueira

Título: Avaliação dos efeitos da utilização de plasma autólogo condicionado em articulações sinoviais hígdas de 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, Toninha e Carlos, por me ensinarem a nunca desistir de um sonho

Ao meu irmão Eduardo, pelo companheirismo e cumplicidade de todas as horas

Às minhas meninas Honey e Margarida, que encheram a minha vida de alegria e me mostraram o verdadeiro amor

AGRADECIMENTOS

À FMVZ-UNESP de Botucatu, onde tudo começou e que me consagrou o título de médica veterinária

Aos meus queridos professores Simone Chiacchio, Roberto Calderon, Rogerio Amorim e Alexandre Borges, pelos ensinamentos durante os anos de residência

À FMVZ-USP, pela acolhida e por ter permitido a realização deste estudo

À minha orientadora Raquel Baccarin, que me proporcionou esta oportunidade de realização profissional com muito carinho, paciência e confiança

Às minhas companheiras Ana Paula (Sybê), Cristina (Xeg's) e Daiane (Dai), pela amizade, pelos conselhos e pelo companheirismo durante as incansáveis coletas

Ao enfermeiro Cicero, por estar sempre de bom humor e disposto a ajudar, mesmo correndo perigo de vida

Aos funcionários Rosendo, Gervásio, Ganga e a toda equipe de residentes 2011 e 2012, pela compreensão e ajuda no manejo dos animais

À Patricinha Brossi, que pacientemente me ensinou as artrocenteses e me ajudou com a discussão e o abstract

À minha co-orientadora Thais Sodrê, pelas caronas e participação ativa em todas as etapas deste projeto

À Dra Yara, que generosamente cedeu seu laboratório para que eu aprendesse e treinasse a eletroforese

À Cris Massoco, pelas palavras doces e ensinamentos sobre citometria de fluxo

À minha amiga Danuta, que sempre me incentivou e me fez acreditar que o melhor sempre acontece

À minha irmãzinha Tamie, que me ensinou a ler as laminas e com quem compartilhei grande parte das emoções da pós-graduação

Às bruxinhas mais lindas, Ludmila, Tatiana, Renata e Rebeca, por tornarem meus almoços mais gostosos e cheios de risada, deixando esse período muito mais prazeroso

Às fadinhas do laboratório Maú, Claudia, Samanta, Maria Helena, Clara e Dinha, que me ajudaram no processamento das amostras sempre com um sorriso no rosto

À Carmem, que faz o melhor café do mundo

Aos animais, que suportaram as intermináveis coletas e tornaram possível a realização deste trabalho (Lady, Britney, Tiffany, Amy, Rudolph, Colorado, 06, Faraó, Alazão e Castanho)

EPÍGRAFE

“Nenhum obstáculo é tão grande se sua vontade de vencer for maior”

Autor Desconhecido

RESUMO

MOREIRA, J. J. **Avaliação dos efeitos da utilização de plasma autólogo condicionado em articulações sinoviais hígdas de equinos.** [Effects evaluation of autologous conditioned plasma in healthy equine synovial joints]. 2013. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O cavalo tem sido há milhares de anos um dos animais de maior utilidade para o homem, tanto no trabalho quanto no esporte. A integridade de sua estrutura física é determinante para a qualidade de seu desempenho, sendo alvo importante das estratégias terapêuticas e preventivas da atualidade. Diversos estudos têm esclarecido parte da cascata de eventos que ocorre em ambiente intra-articular, revelando os principais mediadores nocivos e ampliando as opções para tratamentos mais eficientes. Experimentos utilizando a citometria de fluxo foram capazes de demonstrar que a adição de plasma às células de líquido sinovial (LS) previamente inflamadas diminui a produção de espécies reativas de oxigênio durante o *burst* oxidativo, conferindo capacidade antioxidante a este hemoderivado. Pouco se sabe, no entanto, sobre seu potencial pró ou anti-inflamatório, pois não existem relatos na literatura investigando tal atividade. Assim, desenvolvemos este estudo com o objetivo de acompanhar os efeitos exercidos pelo plasma autólogo condicionado (ACP) sobre os tecidos articulares, reportando as alterações clínicas e no LS das articulações metacarpofalangeanas hígdas que receberam este tratamento. Foram administrados 4 ml de ACP em 10 articulações metacarpofalangeanas de equinos saudáveis, enquanto as articulações contralaterais receberam 4 ml de solução fisiológica, como controle. LS foi coletado antes de cada aplicação e nos momentos 3, 6, 24, 48 e 168 horas após. Foi realizada avaliação física diária, e as amostras coletadas foram submetidas imediatamente a análise física (volume, cor, aspecto e viscosidade), teste da qualidade do precipitado de mucina, contagem total e diferencial das células nucleadas. O sobrenadante foi congelado para dosagem posterior de ureia, proteína total, ácido hialurônico (AH), condroitim sulfato (CS), prostaglandina E₂ (PGE₂) e das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β) e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra). A avaliação física dos animais detectou presença de claudicação nas articulações metacarpofalangeanas tratadas com ACP nos momentos 24 e 48 horas após sua administração. A análise física do LS das mesmas articulações revelou maior contaminação das amostras com sangue às 6 horas e maior contagem de células nucleadas às 3, 6, 24 e 48 horas, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares. Ainda, o ACP induziu maiores

concentrações de proteína total e PGE₂ às 3 e 6 horas, e maior concentração de CS às 24 horas. Houve também tendência ao aumento de TNF- α às 24 horas. Às 168 horas, todavia, nenhuma alteração foi observada em quaisquer dos itens avaliados. Não ocorreram alterações nos demais aspectos físicos do LS nem na qualidade do precipitado de mucina, tampouco nas concentrações de ureia e AH. Estes resultados indicam que em articulações híidas o ACP possui ação pró-inflamatória transitória, com maiores concentrações de PGE₂ induzindo o catabolismo dos PGs da matriz, aumentando particularmente o CS.

.

Palavras-chave: Equino. Líquido sinovial. Plasma autólogo condicionado. IL-1ra. Inflamação.

ABSTRACT

MOREIRA, J. J. **Effects evaluation of autologous conditioned plasma in healthy equine synovial joints.** [Avaliação dos efeitos da utilização de plasma autólogo condicionado em articulações sinoviais hípidas de equinos]. 2013. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

History has connected human and equine species, for work and pleasure purposes and in both scenarios, horses' physical integrity is of paramount importance for adequate performance. Soundness has been the target of many studies in orthopedic therapeutics and preventive equine medicine. Several of these studies have thrown light on the sequence of deleterious intra-articular events that take place after an insult, revealing key mediators of joint destruction and widening treatment options. Experiments evaluating the effects of plasma on reactive oxygen species production by chemically stimulated synovial fluid (SF) cells revealed a potent antioxidant effect. Little is known, however about plasma's anti or pro inflammatory activities, still an unexplored property of plasma. This study was designed to observe the effects of autologous conditioned plasma (ACP) on articular components, reporting findings of serial SF analysis and clinical evaluations, before and after its administration in healthy metacarpophalangeal joints. Four milliliters of ACP were injected in 10 healthy metacarpophalangeal joints, and the contralateral joints were injected with 4 ml of saline, serving as controls. SF was obtained for analysis before, and then 3, 6, 24, 48 and 168 hours after treatment injection. Horses were subjected to daily clinical evaluations and synovial fluid samples were immediately analyzed for color, viscosity, volume, aspect, quality of mucin clot and total and differential nucleated cell counts. The supernatant was frozen and stored for posterior dosages of urea, total protein, hyaluronic acid (HA), chondroitin sulphate (CS), prostaglandin E₂ (PGE₂), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL-1 β), and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra). Physical evaluation of ACP treated subjects detected mild lameness at 24 and 48 hours observation points. SF analysis of ACP treated joints revealed blood contamination and higher total nucleated cell counts at 3, 6, 24 and 48 hours, with predominance of polymorphonuclear cells. ACP treatment has also induced higher protein concentrations and PGE₂ levels at 3 and 6 hours and higher CS levels at 24 hours in synovial fluid analysis. At 24 hours, TNF α concentrations were higher, although not significantly. At 168 hours post ACP treatment, however, no change was observed in any parameter of synovial fluid analysis. No alterations were detected in the

remaining items evaluated, nor in the quality of the mucin clot, urea concentration or HA. These results indicate that, when injected into healthy joints, ACP elicits a transient inflammatory response, characterized by higher PGE2 concentrations, matrix catabolism, with particular increase in CS.

Keywords: Equine. Synovial fluid. Autologous conditioned plasma. IL-1ra. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema cronológico da aplicação de ACP e solução fisiológica (S.F.) e das coletas seriadas de LS – São Paulo – 2013..... 54
- Figura 2 – Imagem fotográfica do exame de claudicação utilizando o aparelho Lameness Locator® (círculos indicam a localização dos sensores) – São Paulo – 2013..... 55
- Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs do LS coletado de articulação metacarpofalangeana durante os momentos 0, 3, 6, 24, 48 e 168 horas do tratamento com solução fisiológica. CS: CS padrão, 5 µg; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo – 2013..... 76
- Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs do LS coletado de articulação metacarpofalangeana durante os momentos 0, 3, 6, 24, 48 e 168 horas do tratamento com ACP. CS: CS padrão, 5 µg; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo – 2013..... 76

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Volume médio de LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos durante os tratamentos com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013.....65
- Gráfico 2 – Cor do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos do tratamento com ACP – São Paulo – 2013.....66
- Gráfico 3 – Cor do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos do tratamento com solução fisiológica – São Paulo – 2013.....66
- Gráfico 4 – Aspecto do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos do tratamento com ACP – São Paulo – 201367
- Gráfico 5 – Aspecto do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos do tratamento com solução fisiológica – São Paulo – 2013.....67
- Gráfico 6 – Viscosidade do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP – São Paulo – 2013.....68
- Gráfico 7 – Viscosidade do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com solução fisiológica – São Paulo – 2013.....68
- Gráfico 8 – Qualidade do precipitado de mucina do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP – São Paulo – 201369
- Gráfico 9 – Qualidade do precipitado de mucina do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com solução fisiológica – São Paulo – 201369
- Gráfico 10 – Média da contagem total de células nucleadas presentes no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica– São Paulo – 2013.....71
- Gráfico 11 – Valor médio relativo de leucócitos mononucleares presentes no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013.....71
- Gráfico 12 – Valor médio relativo de leucócitos polimorfonucleares presentes no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 201371

Gráfico 13 – Concentração média de ureia (mg/ml) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com plasma autólogo condicionado e solução fisiológica – São Paulo – 2013	72
Gráfico 14 – Concentração média da proteína/ureia (mg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013.....	73
Gráfico 15 – Concentração média de PGE ₂ /ureia (pg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013.....	73
Gráfico 16 – Concentração média de TNF- α /ureia (pg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013.....	74
Gráfico 17 – Concentração média de IL-1ra/ureia (pg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013.....	75
Gráfico 18 – Concentração média de AH/ureia (mg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013	77
Gráfico 19 – Concentração média de CS/ureia (mg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013	77

TABELA

Tabela 1 – Sistema de graduação da claudicação – Stashak – 2002	55
-----------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 – Raça, idade (anos) e sexo dos animais utilizados e tratamento administrado em cada articulação metacarpofalangeana – São Paulo – 2013 53
- Quadro 2 – Protocolo de centrifugação do ACP com variação da força centrífuga relativa (G) e variação do tempo em minutos (min.) – São Paulo – 2013 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrometro
AChE	Acetilcolinesterase
ACS	Soro autólogo condicionado
ADAM	Uma desintegrina e metaloproteinase
ADAMT	Uma desintegrina e metaloproteinase com motivo trombospondina (<i>A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs</i>)
AH	Ácido hialurônico
ATP	Adenosina trifosfato
BSAP	Fosfatase alcalina especifica óssea
Cetavlon	Brometo de cetiltrimetilamônio
CO ₂	Dióxido de carbono
COMP	proteína oligomérica da matriz da cartilagem (<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>)
COX-2	Clicoxigenase 2
CrSO ₄	Sulfato de cromo
CS	Condroitim sulfato
DMB	Azul de 1,9-dimetilmetileno
dl	Decilitro
EROs	Espécies reativas do oxigênio
G	Gravidades
g	Gramma
GAG	Glicosaminoglicano
HIF1 α	Fator nuclear hipóxia-induzido
icIL-1ra	Isoforma intracelular de IL-1ra
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-1ra	Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-1r-AcP	Receptor de proteína acessória
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IMC	Índice de massa corporal
IRAP®	Produto comercializado pelo laboratório Orthogen Therapeutics GmbH, Dusseldorf, Alemanha
kDa	Quilodalton
KS	Keratam sulfato
LS	Líquido sinovial

M	Molar
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinase
MPN	Metaloproteinase neutra
mRNA	RNA mensageiro
NFk- β	Fator nuclear kappa beta
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
OA	Osteoartrite
OAE	Osteoartrite equina
PAs	Plasminogênio
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDA	Tampão 1,3-diaminopropano-acetato
PDEGF	Plaquetas derivadas do fator de crescimento endotelial celular
PDGF-AB	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pg	Picograma
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Proteoglicanos
pH	Potencial de hidrogênio
sIL-1ra	Isoforma secretada de IL-1ra
SLPI	Fator inibidor da secreção de protease leucocitária
SOCS-3	Supressor da sinalização leptina induzida
TGF- β	Fator de crescimento beta
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TLRs	Receptor tipo Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
tPA	Plasminogênio tecidual
Tris-HCL	Tampão Tris (hidroximetil)-aminometano – ácido clorídrico
uPA	Uroquinase
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 OSTEOARTRITE (OA)	25
2.1.1 Etiopatogenia	26
2.1.1.1 Osso Subcondral	27
2.1.1.2 Sinovite	28
2.1.1.3 Obesidade	29
2.1.1.4 Resposta Imune Inata	30
2.2 LS	30
2.3 CARTILAGEM ARTICULAR	32
2.3.1 Colágeno	34
2.3.2 PGs	34
2.3.2.1 PGs de Alto Peso Molecular	36
2.3.2.2 PGs de Baixo Peso Molecular	37
2.3.3 Metabolismo E Degradação Da Cartilagem	37
2.4 PATOFISIOLOGIA DA OA	39
2.4.1 MMPs	41
2.4.1.1 Serino Protease	43
2.4.1.2 Cisteíno Protease	43
2.4.1.3 Aspártico Protease	44
2.4.2 PGE₂	44
2.4.3 CITOCINAS	45
2.4.3.1 TNF- α	45
2.4.3.2 IL-1	46
2.4.3.2.1 Inibição da IL-1	47

2.5 SORO AUTÓLOGO CONDICIONADO (ACS).....	48
2.6 PROTEÍNA ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE IL-1 (IRAP®)	50
2.7 PLASMA AUTÓLOGO CONDICIONADO (ACP)	50
3 OBJETIVOS	52
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 ANIMAIS	53
4.1.1 Exame Clínico para Seleção dos Animais	54
4.1.1.1 Avaliação Física Articular	54
4.2 OBTENÇÃO DO ACP	56
4.3 LS	56
4.3.1 Coleta	56
4.3.2 Processamento.....	57
4.3.3 Análise Física	57
4.3.4 Teste do Precipitado de Mucina	57
4.3.5 Contagem Total e Diferencial das Células	58
4.3.6 Determinação da Ureia	58
4.3.7 Determinação da Proteína Total	58
4.3.8 Determinação da PGE₂	59
4.3.9 Determinação do TNF-α	59
4.3.10 Determinação da IL-1β	60
4.3.11 Determinação do IL-1ra.....	61
4.3.12 Determinação dos GAGs.....	62
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5 RESULTADOS	64
5.1 AVALIAÇÃO FÍSICA ARTICULAR.....	64
5.2 LS	65

5.2.1 Coleta	65
5.2.2 Análise Física	65
5.2.2.1 Cor	65
5.2.2.2 Aspecto	67
5.2.2.3 Viscosidade.....	68
5.2.3 Teste do Precipitado de Mucina	69
5.2.4 Contagem Total e Diferencial das Células	70
5.2.5 Determinação da Ureia	72
5.2.6 Determinação da Proteína Total	72
5.2.7 Determinação da PGE₂	73
5.2.8 Determinação do TNF-α	74
5.2.9 Determinação da IL-1β	74
5.2.10 Determinação do IL-1ra	75
5.2.11 Determinação dos GAGs	75
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICES	109

1 INTRODUÇÃO

O sangue é composto por plasma e células, e tem como principais funções transportar os gases da respiração e os hormônios, excretar os produtos provenientes do metabolismo celular, distribuir calor e regular a pressão osmótica, além de atuar na defesa do organismo com o auxílio dos anticorpos, enzimas e leucócitos (GÜRTLER et al., 1984).

O plasma é a parte líquida não celular obtida do sangue não coagulado (REECE, 2008), e corresponde a aproximadamente 55 a 70% do sangue total (SWENSON, 1996). Sua coloração amarelada é devido à presença de corantes biliares e carotinas, e em equinos é provocada principalmente pela bilirrubina (GÜRTLER et al., 1984). O principal constituinte do plasma sanguíneo é a água (92-94%), e seu percentual varia principalmente com a concentração de proteínas (REECE, 2008). Ao contrário do soro, no plasma os fatores de coagulação não são consumidos e encontram-se presentes (GÜRTLER et al., 1984; REECE, 2008).

O plasma atua como meio de trocas entre o sangue e as células (REECE, 2008), e é composto por vitaminas, hormônios e ácidos graxos livres, que são utilizados pelos tecidos como fonte energética (GÜRTLER et al., 1984; REECE, 2008). Outros constituintes são gases (oxigênio, dióxido de carbono e nitrogênio), lipídeos (triglicerídeos, fosfolipídeos e colesterol) e compostos nitrogenados não proteicos (aminoácidos, ureia, ácido úrico, creatinina e sais de amônio). As principais proteínas presentes no plasma sanguíneo são albumina, globulina (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e γ) e fibrinogênio. No homem a albumina está presente em concentrações superiores às da globulina, enquanto na espécie equina esta proporção é equivalente (SWENSON, 1996; REECE, 2008).

As γ -globulinas consistem os anticorpos denominados imunoglobulinas, classificadas em IgE, IgA, IgM, IgD e IgG, a mais abundante no sangue e tecidos de animais saudáveis (SWENSON, 1996; REECE, 2008). Tanto as imunoglobulinas quanto os leucócitos e os nove fatores de complemento presentes no plasma participam ativamente do sistema imune, combatendo antígenos e agentes nocivos, demonstrando a importância desta fração sanguínea para a proteção do organismo. Cientes da participação plasmática nos mecanismos de defesa, novos enfoques surgem para as estratégias terapêuticas hemoderivadas.

Pouco se sabe, no entanto, sobre o mecanismo de ação do plasma e seus efeitos terapêuticos. Alguns estudos realizados em humanos (GAMBHIR; LALI; JAIN, 1997; SARBAN et al., 2005) e equinos (GRÖNDAHL; JOHANNISSON; JENSEN-WAERN, 1997;

MCTAGGART; PENHALE; RAIDAL, 2005) demonstraram que o plasma possui ação antioxidante e capacidade de incremento da opsonização pelos neutrófilos. Por outro lado, é conhecido que o soro sanguíneo condicionado (ACS), obtido através de produtos comerciais, é enriquecido com citocinas anti-inflamatórias e alguns fatores de crescimento, e é capaz de promover a melhora clínica de doenças ortopédicas humanas (MOSER et al., 2009; DARABOS, et al., 2011) e equinas (FRISBIE et al., 2007).

Recentemente, pesquisadores utilizando os *kits* comerciais para obtenção de ACS demonstraram que a adição de heparina ao sangue antes de sua incubação fez aumentar a produção do antagonista natural de IL-1, o IL-1ra, em 1,5 vezes (HRAHA et al., 2011); ainda, que o efeito antioxidante exercido pelo plasma condicionado durante a inflamação induzida foi semelhante ao produto comercial IRAP® (BROSSI; BACCARIN; MASSOCO, 2012). Assim, surgem indícios de que o condicionamento do plasma, semelhante ao do ACS, poderia promover um hemoderivado com atividade terapêutica útil no tratamento das lesões e doenças musculoesqueléticas em equinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OSTEOARTRITE (OA)

A OA é um distúrbio progressivo com caráter inflamatório (CHIARADIA et al., 2012) das articulações diartrodiais (CARON, 2003). A deterioração da cartilagem articular acompanhada de esclerose do osso subcondral, formação de osteófitos e hipertrofia sinovial são as características finais de uma variedade de mecanismos patogênicos que resultam em dor, deformidade, perda de movimentos e disfunção articular (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CANTLEY et al., 1999; POOLE, 1999; SCHLUETER; ORTH, 2004a; MCILWRAITH, 2005; ARDEN; COOPER, 2006; ARAI et al., 2008; VINARDELL et al., 2009; SWIFT, 2012).

Assim como em humanos, a osteoartrite equina (OAE) não é uma doença única, mas o reflexo de uma resposta comum dos tecidos articulares a um número de causas potenciais (CARON, 2003; SCHLUETER; ORTH, 2004a). A natureza da predileção da OAE por determinadas articulações é complexa e inclui não somente as diferenças estruturais (CARMALT et al., 2011; RICKEY et al., 2012), biomecânicas (MURRAY et al., 2001; BROMMER et al., 2005; BOLAM et al., 2006; HARTOG et al., 2009; NICHOLSON et al., 2010), de movimentos (FRISBIE et al., 2008) e composição da matriz extracelular (MEC) (LITTLE et al., 2005; SUTTON et al., 2009; NICHOLSON et al., 2010; CATTERALL et al., 2012), como também depende das diferenças individuais entre as populações dos condrócitos (THOMAS et al., 2011b). O diagnóstico da OA é baseado na sintomatologia clínica e técnicas de imagem, como radiografia, ultrassonografia, ressonância magnética, tomografia computadorizada e cintilografia (MCILWRAITH, 2010).

As dificuldades de detecção dos estágios iniciais da OA fazem com que a doença atinja um caráter de cronicidade diante do longo período em que permanece “silenciosa” (BOLAM et al., 2006). A manifestação clínica da OAE através da claudicação nem sempre está relacionada com a severidade da lesão articular (PANIZZI et al., 2009), e os diagnósticos por imagem são pouco precisos nos estágios iniciais da doença ou muito onerosos, não sendo acessíveis sempre que necessários (MCILWRAITH, 2010; NICHOLSON et al., 2010; CHIARADIA et al., 2012).

Biomarcadores da OA são produtos ou subprodutos criados a partir de alterações no balanço entre processos catabólicos e anabólicos na articulação (MCILWRAITH, 2005; NICHOLSON et al., 2010). Por esta razão, estes marcadores biológicos vêm ganhando cada vez mais a atenção de pesquisadores pelo seu caráter específico e quantitativo, capaz de refletir a dinâmica articular em estágios precoces de enfermidades (FULLER et al., 2001; YAMANOKUCHI et al., 2009; MCILWRAITH, 2010; MOBASHERI; HENROTIN, 2010; ROUSSEAU; GARNERO, 2012; KAMM et al., 2013) ou em função do exercício (FRISBIE et al., 2008).

Os biomarcadores podem auxiliar no desenvolvimento de terapias mais eficientes, uma vez que podemos rastrear a resposta do organismo frente a um agente terapêutico sistêmico (MCILWRAITH, 2005). Seu comportamento em resposta às terapias ou doenças traz informações relevantes mais precoces que as técnicas de imagem, e a combinação de vários biomarcadores fornece uma informação mais precisa do que seu uso isoladamente (MCILWRAITH, 2005; TAYLOR et al., 2006; NICHOLSON et al., 2010).

2.1.1 Etiopatogenia

A OA humana é uma enfermidade principalmente do idoso, enquanto nos equinos o paciente típico é jovem. Comum entre as espécies é o papel decisivo desempenhado pelo engajamento destes indivíduos em modalidades atléticas (MCILWRAITH; TROTTER, 1996). O desenvolvimento da OAE é associado a uma somatória de fatores (SCHLUETER; ORTH, 2004a; GOLDRING; GOLDRING, 2006; SWIFT, 2012;) como sobrecarga do osso subcondral (CANTLEY et al., 1999; CARON, 2003; LACOURT et al., 2012), processos inflamatórios como sinovite e capsulite (SCANZELLO; GOLDRING, 2012), obesidade (VUOLTEENAHO et al., 2012; ISSA; GRIFFIN, 2012) e ativação do sistema imune (SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008).

A primeira teoria envolve uma cartilagem deficiente com propriedades biomecânicas anormais. A segunda hipótese baseia-se em uma alteração física no osso subcondral decorrente do adelgaçamento da cartilagem articular, sendo a carga de impacto atenuada somente pelos tecidos moles periarticulares, músculos, osso subcondral e osso trabecular fiseal (CARON, 2003).

A terceira e mais aceita teoria baseia-se na atuação de forças mecânicas causando danos na cartilagem saudável (SCHLUETER; ORTH, 2004a; HUSER; DAVIES, 2006; HARTOG et al., 2009; LACOURT et al., 2012; RICKEY et al., 2012). A agressão articular decorrente do exercício físico demonstra que um nível basal de anormalidade é comum no cavalo atleta (CANTLEY et al., 1999; SCHLUETER; ORTH, 2004a; BOLAM et al., 2006; KAWCAK et al., 2008), e uma vez ultrapassado, começam a ocorrer alterações metabólicas nos condrócitos, liberando enzimas proteolíticas que provocam fibrilação da cartilagem articular e degradação dos proteoglicanos (PGs) (CARON, 2003; RICKEY et al., 2012).

Independente da causa inicial, a degeneração da cartilagem articular esta associada a uma cascata de eventos bioquímicos mediados por citocinas, enzimas proteolíticas e outras substâncias pró-inflamatórias como prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico (NO) (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CARON, 2003; SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008; CARMALT et al., 2011; SCANZELLO; GOLDRING, 2012).

2.1.1.1 Osso Subcondral

A OA não afeta somente a cartilagem articular como também estruturas ósseas subjacentes (MORTELLARO, 2003; LACOURT et al., 2012). O osso subcondral sofre constantes modificações por modelagem e reabsorção, conferindo ao mesmo a capacidade de reparação e adaptação aos diversos requisitos mecânicos (POOLE, 1999; KAWCAK et al., 2008; CARON, 2003; SWIFT, 2012).

A remodelação óssea adaptativa provoca microfraturas trabeculares que são reparadas fisiologicamente, conferindo ao osso subcondral maior resistência e capacidade de absorção de choque. O aumento na ocorrência destas microfraturas, porém, aumenta a densidade da placa subcondral e das trabéculas adjacentes, reduzindo a capacidade de absorção de cargas fisiológicas repetidas (CANTLEY et al., 1999; CARON, 2003; LACOURT et al., 2012). Ainda, a presença dos fragmentos estimula a liberação de mediadores inflamatórios pelos condrócitos (LEY et al., 2007; LEY et al., 2009). A identificação da fosfatase alcalina específica óssea (BSAP) no líquido sinovial (LS) confirma o envolvimento ósseo nos processos iniciais de OA (FULLER et al., 2001).

Alterações macroscópicas do osso subcondral incluem reações osteogênicas como formação de osteófitos, aumento da rigidez e densidade cartilagínea principalmente em áreas

sujeitas a alto impacto, erosões, microfraturas e desenvolvimento de cistos subcondrais (MCILWRAITH et al., 1979; CANTLEY et al., 1999; POOLE, 1999; ARAI et al., 2008, PANIZZI et al., 2009; LACOURT et al., 2012). O mecanismo molecular responsável por tais mudanças consiste no desequilíbrio entre deposição e remodelamento fisiológico pelos osteoblastos frente ao potencial de reabsorção pelos osteoclastos (MORTELLARO, 2003).

O resultado final de todas as alterações subcondrais é a redução da elasticidade e da capacidade de dissipação de energia da cartilagem articular durante a locomoção, além da incapacidade dos tecidos lesionados em manterem sua homeostase (ARAI et al., 2008; ROUSSEAU; GARNERO, 2012). Consequentemente ocorrem as lesões mecânicas afetando os tecidos articulares e sua MEC, o que pode explicar a frequência de OA em determinadas articulações (CANTLEY et al., 1999).

2.1.1.2 Sinovite

Apesar da ênfase no envolvimento direto e papel preponderante da destruição da cartilagem articular no desenvolvimento da OAE, a concomitante inflamação da membrana sinovial contribui de maneira vital para o evento fisiopatológico central, que é a depleção da MEC (TEW; HOTCHKISS, 1981; SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008; SUTTON et al., 2009; VINARDELL et al., 2009; CHIARADIA et al., 2012). Existe uma interação inegável entre a membrana sinovial e a cartilagem articular nesta fase inflamatória, que potencializa a degradação da mesma; sinovite, capsulite e destruição de cartilagem articular são eventos intimamente relacionados e qualquer uma destas condições pode iniciar ou exacerbar as outras (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; SCANZELLO; GOLDRING, 2012).

Sob condições fisiológicas normais a membrana sinovial consiste em uma fina camada de macrófagos e fibroblastos que, juntamente com o tecido vascularizado subjacente são a maior fonte dos componentes essenciais do LS. A membrana sinovial também remove os produtos provenientes do metabolismo dos condrocito e do *turnover* da matriz articular, além de atuar como uma membrana semipermeável controlando o tráfego de moléculas para dentro e para fora do espaço articular, mantendo a composição do LS (SUTTON et al., 2009; SCANZELLO; GOLDRING, 2012).

A sinovite que ocorre na OAE pode ser um fenômeno primário, uma consequência de trauma ou sobrecarga articular, ou, ainda, pode ocorrer após infecção ou injeção intra-

articular. A agressão da membrana sinovial é importante, pois ela é uma potencial fonte de liberação direta de prostaglandina E₂ (PGE₂), NO, espécies reativas do oxigênio (EROs), enzimas lisossomais, particularmente metaloproteinases neutras (MPN) e agrecanases, e citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; SUTTON et al., 2009; CATTERALL et al., 2012; SCANZELLO; GOLDRING, 2012). Assim, as alterações da membrana sinovial podem resultar em menores concentrações dos fatores de proteção e aumento dos fatores nocivos à cartilagem, contribuindo para a degradação da matriz cartilágnea articular (SCANZELLO; GOLDRING, 2012).

A sinovite esta diretamente relacionada com a gravidade dos sintomas, principalmente a dor, além da área de degeneração da cartilagem articular e a formação de osteófitos (SUTTON et al., 2009; SCANZELLO; GOLDRING, 2012). A sinovite é caracterizada pelo padrão inflamatório típico dos tecidos: alteração no suprimento sanguíneo, hipertrofia e hiperplasia das vilosidades sinoviais, áreas focais de infiltrados inflamatórios e formação de uma camada flogística (“pannus sinovial”) recobrando a cartilagem articular subjacente (MORTELLARO, 2003; BOLAM et al., 2006; SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008; SCANZELLO; GOLDRING, 2012).

2.1.1.3 Obesidade

A obesidade é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de OA, independente da carga suportada pela articulação. O tecido adiposo consiste em uma fonte local de mediadores pró-inflamatórios que tendem a aumentar com a obesidade, além de aumentarem a degradação da cartilagem em modelos de cultura celular e tecidual. Uma adipocina em particular, a leptina, pode ser o mediador crítico da obesidade associada à OA, via ações sinérgicas com outras citocinas inflamatórias (ISSA; GRIFFIN, 2012).

A leptina é um hormônio polipeptídico de 16kDa encontrado em obesos. Originalmente descoberto em adipócitos da gordura branca, é responsável pela regulação do metabolismo de energia e o apetite (ISSA; GRIFFIN, 2012).

Um estudo recente em pacientes humanos correlacionou a concentração de leptina no LS com o índice de massa corporal (IMC), confirmando a hipótese de que pacientes portadores de OA possuem maiores concentrações de leptina no LS do que no soro. Ainda,

pacientes obesos e com OA apresentaram alta quantidade de leptina bioativas no LS, enquanto a expressão do supressor da sinalização leptina-induzida (SOCS-3) na cartilagem ficou diminuída, fortalecendo a idéia de que a leptina exerce um papel chave na relação entre obesidade e OA (VUOLTEENAHO et al., 2012).

2.1.1.4 Resposta Imune Inata

A ativação do sistema imune que ocorre em resposta a patógenos demonstrou desempenhar um papel importante na indução de mediadores inflamatórios e infiltrados celulares específicos na OA (SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008; HASEEB; HAQQI, 2013).

Na resposta imune inata, os receptores do tipo Toll (TLRs) atuam como receptores para lipopeptídeos e lipopolissacarídeos bacterianos, mas na OA podem ser ativados por componentes da cartilagem articular, como fragmentos de ácido hialurônico (AH) e fibronectina. Uma vez estimulado, o TLR pode estimular o recrutamento de infiltrados celulares e a produção local de citocinas, fatores de crescimento e produção de proteases, induzindo uma resposta catabólica pela degradação dos PGs e colágeno da matriz. Além disso, a produção de fatores de crescimento anabólicos, como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) pode levar à multiplicação dos condrócitos e hipertrofia, bem como a formação de osteófitos. (SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008; SCANZELLO; GOLDRING, 2012; HASEEB; HAQQI, 2013).

2.2 LS

O LS é um ultrafiltrado do plasma ao qual o AH e outros metabólitos são adicionados na medida em que são sintetizados e secretados pelos sinoviócitos (TEW; HOTCHKISS, 1981; WASSERMAN; KALLFELZ; LUST, 1993; MCILWRAITH; TROTTER, 1996; STEEL, 2008). Sua principal função é fornecer nutrientes à cartilagem articular e lubrificar os tecidos peri-articulares (HUI et al., 2012). A celularidade normal do LS equino não ultrapassa

500 células/ μL , sendo 90% células mononucleares (sinoviócitos, monócitos e linfócitos) e 10% leucócitos polimorfonucleares (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O LS é produzido pela porção mais interna da cápsula articular, a membrana sinovial. Também conhecida como sinóvia, consiste em um fino tecido conjuntivo vascularizado revestido superficialmente por dois tipos de sinoviócitos, distintos morfologicamente. As células do tipo A, de linhagem macrofágica, possuem funções absorptivas, enquanto células do tipo B, de linhagem fibroblástica, secretam colágeno, fibronectina, AH e PGs. A membrana sinovial consiste na principal barreira para as trocas entre moléculas do LS e plasma (STEEL, 2008; HUI et al., 2012).

A viscosidade do LS é uma característica decorrente da presença de AH, em média 0,5 mg/ml em equinos saudáveis. O AH também funciona como uma barreira para a troca de pequenas moléculas. Sintetizado na membrana plasmática das células, é liberado para o espaço extracelular durante o alongamento de sua molécula. Em solução, o AH adota uma configuração com alta afinidade por água; na matriz, ele age como uma peneira: quanto mais concentrado estiver, mais inibida estará a difusão (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Outro produto importante das células de revestimento sinovial é a glicoproteína denominada lubricina. Ela é a principal responsável pelas propriedades de lubrificação do LS uma vez que adere à superfície da cartilagem articular e à membrana sinovial, reduzindo a tensão superficial, tracionando as superfícies articulares contíguas em direções opostas e prevenindo a fusão. Esta função é conhecida como “lubrificação de fronteiras” e é dependente das características bioquímicas desta molécula (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

A troca de líquidos entre o plasma e o LS ocorre pela diferença de pressão hidrostática e coloidosmótica entre eles, conhecida como forças de Starling. A troca de solutos é facilitada pela ausência de uma membrana basal e pela proximidade dos capilares em relação à superfície interna da membrana sinovial. A pequena distância entre os sinoviócitos e os componentes da MEC confere discreta permeabilidade à membrana sinovial, e o equilíbrio das moléculas de baixo peso molecular ocorre por difusão simples (LIBERG; MAGNUSSON; SCHOUGAARD, 1977; TEW; HOTCHKISS, 1981; MCILWRAITH; TROTTER, 1996; HUI et al., 2012) com exceção da glicose, que é transportada por difusão facilitada e transporte ativo (WASSERMAN; KALLFELZ; LUST, 1993). Moléculas lipofílicas como oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) também se difundem livremente, uma vez que podem se infiltrar através dos sinoviócitos, bem como por entre eles.

As proteínas presentes no LS equino estão, em sua maioria, na faixa de pH entre 4 e 7, e participam tanto da homeostase quanto das artropatias (CHIARADIA et al., 2012). Doenças

e agressões articulares afetam a composição e função do LS devido a mudanças diretas e nos tecidos ao redor (HUI et al., 2012). Durante a inflamação, a permeabilidade do endotélio aumenta enquanto o número de capilares funcionais diminui, prejudicando o *clearance* pelas vênulas e vasos linfáticos e permitindo o extravasamento de LS para dentro da cavidade articular. O resultado final é o edema da membrana sinovial, enrijecimento da articulação com prejuízo da mobilidade e efusão de LS com escape de proteínas para dentro da articulação (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; HUI et al., 2012).

A efusão sinovial aumenta a pressão intra-articular e sobre o osso subcondral, além de prejudicar os processos de nutrição e drenagem, criando uma isquemia local na membrana sinovial e na cartilagem articular. Somado a isso, a privação de nutrientes para os condrócitos, metabolicamente sensíveis, e a ativação de enzimas catabólicas resultante da queda de pH podem alterar a homeostase da matriz da cartilagem articular (HUI et al., 2012).

Uma vez que os componentes do LS são importantes para a manutenção de suas propriedades de lubrificação, a presença de efusão e a destruição do AH e da lubricina afetam o desempenho desta função, podendo-se constatar clinicamente pela perda da viscosidade do LS.

2.3 CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem hialina que recobre as superfícies das articulações diartrodiais é um tecido conjuntivo altamente especializado que tem como principal função biomecânica suportar cargas compressivas. Suas propriedades físicas dependem da estrutura e organização de seus dois principais componentes na MEC, o colágeno tipo II e os PGs, principalmente o agregam (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; SCHLUETER; ORTH, 2004a; NICHOLSON et al., 2010). Nos adultos, a cartilagem é um tecido avascular, alinfático e aneural, nutrido pelo LS. A ausência de nervos faz com que lesões restritas à cartilagem não sejam dolorosas, sendo a inervação do osso subjacente e dos tecidos moles periarticulares adjacentes responsável pelo fornecimento de informação do posicionamento articular (CARON, 2003).

A cartilagem é composta principalmente por colágeno (65 a 80%), água (10 a 30%), PGs (5 a 10%) e uma pequena população de condrócitos, que representam menos de 2% de seu volume na maioria das espécies (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; SCHLUETER; ORTH, 2004a). Os condrócitos sintetizam, organizam e regulam a deposição

da MEC de uma maneira altamente ordenada e eficiente. Em cada estágio de crescimento e desenvolvimento, o equilíbrio entre síntese e degradação da matriz é rigidamente controlado para atingir o crescimento, remodelação ou o equilíbrio balanceado (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CARON, 2003).

A resistência da cartilagem articular frente às cargas compressivas é proveniente das características polianiónicas dos glicosaminoglicanos (GAGs) da matriz, ligados covalentemente ao core protéico dos PGs. Os GAGs absorvem água dos tecidos expandindo a matriz da cartilagem e a rede colágena na qual estão inseridos, através do equilíbrio iônico conhecido como Gibbs-Donnan. As fibrilas de colágeno resistem à expansão, e este balanço entre a tensão exercida pela rede de colágeno e a pressão osmótica de intumescimento gerada pelos PGs promove as características biomecânicas da cartilagem articular e a estabilidade da articulação (SAARI et al., 1992; PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; MCILWRAITH; TROTTER, 1996; MCILWRAITH, 2005; HUSER; DAVIES, 2006). Alterações na estrutura, concentração ou composição dos PGs e GAGs devido a inflamação ou alterações mecânicas resultam em mudança na resistência a compressão e contribuem para danos da cartilagem (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995).

Pequenas proteínas interagindo tanto com os condrócitos quanto com moléculas da matriz também fazem parte da estrutura da cartilagem articular. A ancorina, presente na superfície dos condrócitos e no interior da membrana celular, possui alta afinidade com as fibrilas de colágeno tipo II, atuando como mecanoreceptor e informando ao condrócito sobre as mudanças de tensão sofridas pela matriz. A fibronectina está relacionada com a estrutura da matriz através da interação com condrócitos e elementos da MEC. Na OAE, fragmentos de fibronectina estão presentes em alta quantidade, e podem contribuir para os eventos catabólicos (CARON, 2003).

A proteína oligomérica da matriz da cartilagem (COMP), conhecida também como trombospondina-5, é abundante na cartilagem articular e é formada pela associação de cinco subunidades idênticas. A COMP encontra-se na camada de proliferação da cartilagem, regulando o crescimento celular (CARON, 2003). A síntese e degradação da COMP podem ser mensuradas através do uso de anticorpos a partir de amostras de sangue, urina ou LS, sendo uma ferramenta útil na monitoração das enfermidades articulares (MURRAY et al., 2001; MISUMI et al., 2002; ARAI et al., 2005; TAYLOR et al., 2006; ARAI et al., 2008; YAMANOKUCHI et al., 2009; RICKEY et al., 2012). Recentemente, foi descoberta uma forma desaminada de COMP, a D-COMP, que pode ser o primeiro biomarcador local específico de uma determinada articulação (CATTERALL et al., 2012).

2.3.1 Colágeno

Uma grande variedade de colágeno fibrilar e não fibrilar está presente na cartilagem e promove suporte estrutural. Estas proteínas também interagem com outros componentes da MEC e contribuem para arquitetura e função cartilagíneas. As fibrilas de colágeno estão orientadas paralelamente à superfície articular na zona mais superficial, agindo como uma camada protetora, enquanto as maiores fibras estão orientadas radialmente nas camadas mais profundas, ancorando a cartilagem à placa subjacente final (CARON, 2003).

A tripla hélice que estruturalmente compõe o colágeno oferece uma rigidez característica e também resistência ao ataque proteolítico. Sua degradação se torna mais complicada quando ele já está integrado à MEC, pois as ligações intermoleculares entre as fibrilas poliméricas de colágeno o torna muito mais resistente à degradação do que os colágenos solúveis. Apesar disso, existe um *turnover* de colágeno que, mesmo lento, permite o remodelamento e reparação do tecido cartilágneo durante a vida (KUMAR et al., 2005).

O colágeno tipo II é o mais abundante na cartilagem articular, constituindo cerca de 90% da rede fibrilar. É sintetizado e secretado pelos condrócitos como uma molécula de pró-colágeno que necessita sofrer clivagem extracelular para se converter em colágeno. O colágeno tipo II é formado por três cadeias de aminoácidos idênticos pouco solúveis, com maior proporção de resíduos de hidroxila e mais glicosilado que o colágeno tipo I. Está disposto em forma de fibrilas formando uma rede tridimensional ou o esqueleto da matriz. A degradação e ressíntese das fibrilas ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento do indivíduo, mas em adultos o *turnover* é limitado (CARON, 2003; MCILWRAITH, 2005).

O colágeno do tipo IX representa 10% das proteínas colágenas da cartilagem e sua participação na composição da MEC diminui em 1% nos adultos. Ele, juntamente com o colágeno do tipo XI, contribui significativamente na organização e estabilidade mecânica da rede de fibras de colágeno tipo II (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

2.3.2 PGs

PG é definido como uma molécula que tem um core protéico ligado covalentemente a uma cadeia de GAGs (SAARI et al., 1992). Os PGs da MEC da cartilagem articular se

encaixam em duas principais categorias: os PGs de alto peso molecular, e os PGs de baixo peso molecular, como o decorim, o biglicam e a fibromodulim (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Os principais GAGs responsáveis pela função e estrutura da cartilagem são o condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato, o queratam sulfato (KS) e o AH. Com exceção deste último, todos os GAGs acima citados consistem de longas cadeias lineares de unidades dissacarídicas repetidas de hexosamina (glucosamina ou galactosamina) que se alternam com outro resíduo de açúcar (ácido glucorônico, ácido idurônico ou galactose) (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O condroitim sulfato (CS) é o maior contribuinte para o aumento global na concentração de GAG sulfatado no LS (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995), e um importante biomarcador na monitorização da síntese de agregam (MCILWRAITH, 2005).

O KS tem distribuição limitada e é encontrado na matriz da cartilagem articular, particularmente na zona profunda. A rede de CS protege o KS da ação enzimática, e o aumento de sua concentração no LS apenas é observado em casos crônicos, ou com erosão e exposição da camada profunda (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995). Uma vez exposto, o KS migra com maior facilidade da matriz para o meio articular por ser menor, aumentando sua concentração no LS e atuando como um biomarcador de doenças crônicas (MISUMI et al., 2002).

O AH é o único GAG não sulfatado, consistindo em uma molécula longa e sem cadeias, de 200 a 10000 unidades dissacarídeas repetidas de ácido glucorônico ligado a N-acetilglucosamina. Representa apenas uma pequena porcentagem dos GAGs da cartilagem, mas desempenha um papel especial como sustentáculo do eixo agregado de PGs (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995 ; MCILWRAITH; TROTTER, 1996; SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008; HUI et al., 2012). Sua diminuição no LS pode significar a presença de hialuronidase, de radicais livres derivados do O₂ e liberados pela invasão de neutrófilos, ou uma diminuição da produção pelos sinoviócitos. O AH é o único biomarcador capaz de refletir o envolvimento sinovial e não apenas a inflamação da doença articular (MCILWRAITH, 2005).

Os PGs são os componentes mais dinâmicos da cartilagem articular e sua biossíntese envolve a translação do gene transcrito para a proteína do core de agregam no retículo endoplasmático rugoso e sua subsequente transferência para o Complexo de Golgi, onde extensiva modificação pós-translacional resulta na produção da molécula completa de PG (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O *turnover* dos PGs na cartilagem articular saudável é um processo conservativo que permite uma renovação estável dos componentes teciduais sem perturbar as características funcionais da MEC (MCILWRAITH, 2005). Ele é, comparativamente, muito mais rápido que do colágeno. A liberação de PGs e sua mobilização para fora da matriz é considerada a via mais importante de catabolismo (MCILWRAITH; TROTTER, 1996). A perda de PGs em afecções que desestabilizam a integridade da cartilagem articular pela digestão de seus componentes, como a OA, provocam um grande aumento de GAGs do LS, e no soro e urina, em menor quantidade (ALWAN et al., 1991a; HUSER; DAVIES, 2006; ROSS et al., 2012).

Várias proteases capazes de degradar os componentes da MEC da cartilagem articular foram identificadas *in vitro*; elas são sintetizadas como moléculas precursoras inativas que são, posteriormente, convertidas em proteases ativas. As proteases são reguladas no estágio de síntese também pela presença e produção de inibidores potentes das enzimas ativas, como os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e as alfa-macroglobulinas. A síntese de inibidores de proteases é cuidadosamente controlada pelos mesmos mecanismos que regulam a produção das próprias proteases sob condições fisiológicas normais. A disponibilidade de protease ativada no estado fisiológico é, portanto, rigidamente regulada pelo condrócito (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

2.3.2.1 PGs de Alto Peso Molecular

Os PGs de alto peso molecular, especialmente o agregam, consiste a espécie mais abundante na cartilagem articular. São compostos de um centro protéico linear ao qual um grande número de cadeias de GAGs, principalmente o KS e o CS, está covalentemente ligado (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O agregam é o principal PG da cartilagem articular que interage com o AH para formar agregados. Ao contrário dos demais GAGs, os agregados de agregam e AH são formados através de uma interação não-covalente, estabilizada por uma proteína de igual afinidade (CARON, 2003).

2.3.2.2 PGs de Baixo Peso Molecular

Os PGs de baixo peso molecular constituem de 1 a 4% da massa total de PGs presentes na cartilagem articular; são macromoléculas multifuncionais que se ligam a colágenos, fatores de crescimento, heparina e uma variedade de outras macromoléculas. Três pequenos PGs pertencentes a uma família de glicoproteínas ricas em leucina são encontrados na cartilagem articular. São eles o decorim, o biglicam e o fibromodulim (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O decorim pode interagir com o colágeno e desempenhar um papel importante na regulação do espaçamento interfibrilar e no *cross linking*. Ele também se liga ao fator de crescimento TGF- β , que é encontrado na cartilagem e pode inibir sua atividade mitogênica (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O papel do biglicam não é bem conhecido, mas pode envolver interação com outras moléculas da matriz ou a interação entre as membranas celulares e a matriz. Sua estrutura é semelhante a do decorim, mas ela não é capaz de se ligar ao colágeno, apesar de estar bem ligada à MEC (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

O fibromodulim pode se ligar a fibrilas de colágeno e inibir a formação de fibras. Provavelmente desempenha papel na estabilização do espaço interfibrilar por recobrir as fibrilas de colágeno e alterar suas propriedades de superfície, prevenindo, desta forma, o crescimento por inclusão de mais moléculas de colágeno ou por fusão de fibrilas adjacentes (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

2.3.3 Metabolismo E Degradação Da Cartilagem

A manutenção da homeostase cartilágnea e a organização dos eventos moleculares envolvidos na síntese, assentamento e *turnover* da MEC da cartilagem articular são controlados por citocinas, que promovem a comunicação intercelular. Chamadas também de fatores regulatórios peptídicos, possuem efeitos sobre os condrócitos e representam um grande grupo de moléculas que têm algumas características em comum: 1) baixa massa molecular; 2) ação curta ou intermediária e 3) interação com receptores de alta afinidade na superfície da célula (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

Muitos destes peptídeos têm efeitos em vários tipos de células e induzem uma variedade de efeitos biológicos, podendo influenciar células à distância de onde foram originalmente produzidas (efeito exócrino), tendendo, porém, a agir localmente sobre as células adjacentes (efeito parácrino) ou até na mesma célula que os secretou (efeito autócrino). Podem ainda ser sequestrados sob a forma biologicamente inativa pelos GAGs da matriz (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

A cartilagem articular hialina é o primeiro tecido a ser danificado na OA. De fato, este tecido é afetado por uma sequência cada vez mais grave de alterações morfológicas e estruturais, levando à degeneração tecidual (SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008; SCANZELLO; GOLDRING, 2012). Macroscopicamente as alterações constituem fibrilações, erosões, desgaste e fragmentação. Histologicamente, são caracterizadas por fibrilações superficiais, necrose de condrócitos e perda completa da espessura cartilagínea. Pode, ainda, haver lesões císticas e de esclerose do osso subcondral, necrose óssea focal e formação peri-articular de osteófitos. Bioquimicamente há redução e mudanças estruturais dos PGs, como tamanho e estabilidade, grau de agregação e aumento na quantidade de água (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; BOLAM et al., 2006; SUTTON et al., 2009; VINARDELL et al., 2009). A consistência da cartilagem também pode ser alterada, mostrando-se mais fraca e amolecida (BROMMER et al., 2005).

A patogênese da condrodegeneração é explicada pela atividade metabólica dos condrócitos, única população celular presente na cartilagem articular. Fisiologicamente, sua função é modular o *turnover* da MEC mantendo o equilíbrio entre sua síntese e degradação. Na OA, entretanto, observa-se um aumento no número de condrócitos em apoptose acompanhado de maior expressão de uma cisteína protease, a caspase 3 (KIM et al., 2003; THOMAS et al., 2007; THOMAS et al., 2011a). Concomitantemente a esses aumentos, a expressão de fibronectina também se eleva, principalmente pelos condrócitos de maior atividade, situados na zona profunda (THOMAS; MURRAY; SHARIF, 2011).

Em cartilagens de maior uso ou movimento, os condrócitos localizados na zona superficial da cartilagem são os que mais sofrem apoptose, seguidos pelos condrócitos da zona média e profunda, respectivamente. As fibrilas de colágeno superficial, dispostas paralelamente, parecem não conferir tanta proteção quanto as fibrilas de colágeno da zona profunda, dispostas de forma perpendicular. Além disso, os condrócitos da zona superficial sofrem maior deformação, alterando os sinais de sobrevivência para outras células e MEC (BOLAM et al., 2006; HUSER; DAVIES, 2006; THOMAS et al., 2007; THOMAS et al., 2011a; THOMAS et al., 2011b). Sendo assim, dentro de uma mesma articulação podem

existir diferentes locais acometidos em diferentes intensidades (CANTLEY et al., 1999; MURRAY et al., 2001; BROMMER et al., 2005; HARTOG et al., 2009).

A morte dos condrócitos provoca uma superprodução de mediadores destrutivos e pró-inflamatórios, como o NO e metaloproteinases (MMPs), resultando em resposta catabólica superior ao potencial anabólico e, finalmente, em lise progressiva da cartilagem articular (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; KIM et al., 2003; MORTELLARO, 2003; SCANZELLO; PLAAS; CROW, 2008). O adelgaçamento da cartilagem leva à instabilidade e alteração biomecânica articular, diminuindo a capacidade de absorção de impacto e sobrecarregando o osso subcondral (BROMMER et al., 2005; ARDEN; COOPER, 2006).

Uma vez que o ambiente inflamatório tenha sido estabelecido, haverá estímulo da angiogênese, que contribui ainda mais para a diminuição da espessura cartilágnea. A neovascularização é responsável pela alteração da coloração cartilágnea e também é capaz de introduzir nervos sensoriais na cartilagem aneural, os quais serão sensibilizados pela presença da inflamação, provocando o quadro clínico de claudicação (BONNET; WALSH, 2005; GOLDRING; GOLDRING, 2006).

2.4 PATOFISIOLOGIA DA OA

A cartilagem é o tecido que mais sofre alterações durante o desenvolvimento da OA (BOLAM et al., 2006), e as alterações metabólicas que ocorrem nos condrócitos são determinantes na patofisiologia da condrodegeneração (CARON, 2003; KIM et al., 2003; THOMAS et al., 2007; THOMAS et al., 2011a; THOMAS et al., 2011b).

Na fisiologia articular, o equilíbrio entre síntese e degradação da matriz é garantido por uma complexa interação entre condrócitos, citocinas e estímulos mecânicos. Na OA, esta homeostasia é quebrada, prevalecendo os processos catabólicos (CARON, 2003). As alterações sofridas pela cartilagem articular podem alterar o gradiente de O₂, provocando um quadro de hipóxia. Ainda, a alta pressão intra-articular, decorrente da efusão do processo inflamatório inicial, pode ser suficiente para prejudicar o fluxo sanguíneo através dos capilares sinoviais, reduzindo potencialmente a tensão de O₂ e podendo conduzir a uma reperfusão da lesão (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

A menor tensão de O₂ provoca um período de isquemia no qual a molécula de adenosina trifostato (ATP) é reduzida em hipoxantina, convertida em xantina oxidase pela

enzima xantina redutase. Quando ocorre a reperfusão tecidual, a xantina oxidase converte a hipoxantina em ácido úrico e produz radicais livres derivados do O₂, que danificam tanto as células quanto as macromoléculas da MEC (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

A isquemia aumenta a expressão de dois fatores nucleares hipóxia-induzidos (HIF1 α e HIF2 α), os quais induzem maiores concentrações dos fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de plaquetas derivadas do fator de crescimento endotelial celular (PDEGF). Ambos os peptídeos aumentam a neovascularização e promovem o aumento da permeabilidade vascular, resultando em edema, perda de proteína vascular e inflamação. A angiogênese envolve, inicialmente, a membrana sinovial e, subsequentemente, o osso subcondral e a cartilagem articular. Embora o crescimento de novos vasos aumente o transporte de nutrientes para a cartilagem lesionada e para o osso subcondral, pode também contribuir para danificá-los, uma vez que o aumento do fluxo sanguíneo permite o extravasamento das proteínas plasmáticas para o interstício, aumentando a produção de LS e, conseqüentemente, a pressão intra-articular (BONNET; WALSH, 2005).

A inflamação e neovascularização articulares permitem, ainda, a migração de neutrófilos que liberam citocinas, enzimas proteolíticas e eicosanóides, contribuindo para alterações de membrana sinovial e matriz cartilágnea. A esta altura, sinoviócitos e condrócitos são ativados e estimulados a aumentarem sua atividade, tanto de síntese quanto de degradação. Os mediadores destrutivos primários da cartilagem articular e membrana sinovial são as MMPs, que degradam o core protéico dos PGs liberando fragmentos no espaço articular (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995).

O aumento na síntese de PGs que ocorre em resposta às MMPs é insuficiente para concorrer com a velocidade de degradação da matriz, e sua concentração é reduzida progressivamente. A perda dos PGs é acompanhada pelo aumento de GAGs no LS, soro e urina (ALWAN et al., 1991a; PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; BOLAM et al., 2006) e pela degradação do colágeno (CARON, 2003). A cartilagem, portanto, vai sendo perdida e as propriedades viscoelásticas do tecido remanescente não são suficientes para suportar cargas normais, ocorrendo fissuras e quebras do tecido cartilaginoso (BOLAM et al., 2006; LACOURT et al., 2012). O resultado final é a perda generalizada de cartilagem articular e um remodelamento secundário de ossos e tecidos moles articulares (CARON, 2003; LACOURT et al., 2012).

Enquanto a degradação da cartilagem articular ocorre pela ação de alguns mediadores, as enzimas proteolíticas sintetizadas pelos condrócitos são as principais responsáveis pela

depleção da MEC. De acordo com o mecanismo catalítico, as proteases são classificadas em aspártico protease e cisteína protease, atuantes em pH ácido, e serina protease e MMPs, que atuam em pH neutro. Os membros de cada grupo são sintetizados por condrócitos ou sinoviócitos e podem contribuir para a degradação da cartilagem, porém as MMPs da matriz são consideradas as enzimas mais ativas na OA (CARON, 2003).

2.4.1 MMPs

As MMPs pertencem a um grupo de endopeptidases zinco dependente e podem ser secretadas por sinoviócitos, condrócitos, macrófagos e neutrófilos. As MMPs são sintetizadas por sinoviócitos e condrócitos e constituem o grupo de proteases capazes de digerir todos os maiores componentes da MEC. Basicamente, as MMPs são compostas de um pró-peptídeo unido a um sítio catalítico através de uma ligação sulfidrila. Por serem potencialmente destrutivas, as MMPs são sintetizadas como pró-formas enzimaticamente inativas, denominadas zimogênios. A sua ativação requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio de sua degradação, realizada por diversas enzimas incluindo tripsina, quimiotripsina, plasmina e catepsina B, além das próprias MMPs (CARON, 2003; HUI et al., 2012).

Fisiologicamente as MMPs têm alta atividade em organismos jovens, refletindo o crescimento e remodelamento articular durante a fase do desenvolvimento. Altas concentrações de MMPs em organismos adultos não são esperadas, e refletem o desequilíbrio entre síntese e degradação dos componentes articulares, comuns em artropatias (BRAMA et al., 1998). Vários tipos de MMPs são expressados pelo tecido articular e estão envolvidos na patofisiologia da OA, incluindo collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CARON, 2003; SCHLUETER; ORTH, 2004a; CLUTTERBUCK et al., 2010; ROUSSEAU; GARNERO, 2012). Justamente pelo fato de participarem diretamente na homeostase da cartilagem articular, as MMPs são consideradas biomarcadores do remodelamento tecidual, tanto fisiológico quanto patológico (BRAMA et al., 2004; ROSS et al., 2012).

As collagenases são capazes de degradar as três cadeias da tripla hélice do colágeno tipo II, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento da OAE (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CARON, 2003; MCILWRAITH, 2005). A MMP-1 é

produzida por uma ampla variedade de células e está presente em grandes quantidades nas articulações jovens ou acometidas pela OA (BRAMA et al., 2004). A MMP-13 tem sua atividade potencializada na presença de interleucina 1 alfa (IL-1 α) (FORTIER et al., 2007). A estromelina (MMP-3) é ativada pela plasmina, da família serino protease, e possui uma variedade de substratos que incluem PGs (agrecam, decorim, fibromodulim), proteína de ligação e vários tipos de colágeno, inclusive do tipo II parcialmente degradado. A estromelina também desempenha um importante papel na ativação da pró-colagenase em colagenase (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; MCILWRAITH, 2005).

A gelatinase tem uma gama diversificada de substratos, incluindo colágeno tipo II parcialmente degradado, colágeno tipo X e XI e elastina (CARON, 2003). A gelatinase MMP-9 participa dos processos anabólicos e catabólicos da matriz da cartilagem, estimulando a expressão do colágeno tipo II ao mesmo tempo em que participa da digestão de componentes da matriz (THOMPSON; CLEGG; CARTER, 2001).

Algumas proteases da família ADAM (uma desintegrina e MMP) estão estrutural e funcionalmente relacionadas às MMPs. Um grupo em especial, denominado agrecanase, é capaz de clivar o agrecam especificamente entre os seus domínios G₁ ou G₂ (LITTLE et al., 2005). As agrecanases são muito semelhantes às MMPs típicas, incluindo a inativação com inibidores convencionais de MMP e pelo TIMP-1 da matriz. Existem pelo menos duas formas de agrecanase e ambas são enzimas ADAMTS (uma desintegrina e MMP com motivo trombospondina). As subunidades trombospondina da proteína parecem estar intimamente relacionadas à digestão do agrecam, conferindo o papel de mediador da depleção de PGs à agrecanase (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CARON, 2003).

Em uma cartilagem saudável, a atividade das MMPs é controlada pelos TIMPs, através da formação de um complexo enzima-inibidor de 1:1 (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CARON, 2003; SCHLUETER; ORTH, 2004a; CLUTTERBUCK et al., 2010). Existem pelo menos quatro formas de TIMPs, das quais as três primeiras (TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3) são expressadas pelos condrócitos, embora tenham diferentes mecanismos de regulação. O desequilíbrio na proporção de síntese entre MMP e TIMP é um fator determinante na taxa de degradação da matriz (CARON, 2003; CLUTTERBUCK et al., 2010).

2.4.1.1 Serino Protease

A conversão e conseqüente ativação de algumas proteases que degradam a cartilagem articular estão intimamente relacionadas com a plasmina, que é convertida pelo plasminogênio e participa da ativação das MMPs.

Quantidades significantes de plasminogênio encontram-se presentes na matriz da cartilagem, apesar de não serem sintetizados ativamente pelos condrócitos. Dois tipos de ativadores de plasminogênio (PAs), o tecidual (tPA) e a uroquinase (uPA), podem clivar o plasminogênio transformando-o em sua forma ativa, a plasmina, que por sua vez ativa a estromelisina e, conseqüentemente, a collagenase. Tanto o tPA quanto o plasminogênio estão presentes na cartilagem, e, juntamente com seus inibidores, desempenham um importante papel na OA.

Outras serino proteases, como a elastase e a catepsina G, apresentam uma potente atividade de degradação sobre os PGs (MCILWRAITH; TROTTER, 1996).

2.4.1.2 Cisteíno Protease

Participam deste grupo algumas proteases lisossomais que apresentam atividade somente em pH ácido. As catepsina B e L clivam as terminações de colágeno tipo II que contêm as ligações covalentes com e entre as moléculas. A catepsina B também cliva a região de ligação do AH com os PGs da cartilagem, e degrada os GAGs dos pequenos fragmentos de PGs, além de atuar como ativador das MMPs. Recentemente foi demonstrada a degradação do colágeno tipo II pela catepsina K, ativada juntamente com as MMPs, contribuindo para a degeneração da cartilagem articular (VINARDELL et al., 2009).

A caspase é responsável pela morte celular. Em mamíferos, 14 tipos de caspase foram identificados e divididos em três grupos: os iniciadores da apoptose (caspase 2, 8, 9 e 10), os executores da apoptose (caspase 3, 6 e 7) e os processadores de citocinas (caspase 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14). A caspase 3, entretanto, recebe atenção especial por participar das três vias que sinalizam uma célula a morrer, sendo sua forma ativa um dos principais mediadores da apoptose na sua fase de execução (ROACH; AIGNER; KOURI, 2004)

2.4.1.3 Aspártico Protease

A catepsina D é a protease lisossomal de atividade mais proeminente em pH ácido (5,0). Seu mecanismo catalítico requer resíduos de ácido aspártico e, em condições inflamatórias e durante a rápida destruição da MEC, é secretada extracelularmente pelos macrófagos e tecido conjuntivo, principalmente como pró-enzima.

2.4.2 PGE₂

As prostaglandinas estão amplamente distribuídas pelo organismo participando ou modulando uma variedade de processos fisiológicos e patofisiológicos em alguns sistemas e tecidos como hematopoiético, cardiovascular e reprodutivo (SCHLUETER; ORTH, 2004a).

As prostaglandinas modulam tanto a expressão quanto a liberação de citocinas e MMPs em células articulares, além de promover a síntese de proteínas que influenciam o metabolismo da cartilagem.

As prostaglandinas são produzidas por condrócitos e sinoviócitos em altas concentrações nas articulações inflamadas (KIRKER-HEAD et al., 2000; SCHLUETER; ORTH, 2004a; ROSS et al., 2012) e atuam diminuindo a síntese dos PGs componentes da MEC, contribuindo para as lesões da OAE (FRISBIE et al., 2008). A ação inflamatória da PGE₂ na articulação inclui vasodilatação, aumento da percepção neurogênica, aumento da degradação cartilagem, desmineralização óssea e promoção da secreção dos ativadores de PA (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CARON, 2003; SCHLUETER; ORTH, 2004a).

A cicloxigenase 2 (COX-2) limita a velocidade das enzimas responsáveis pela produção de PGE₂ pelos fosfolipídeos da membrana, e seu uso pode ser útil no tratamento sintomático de artropatias (SCHLUETER; OTRH, 2004a; SCHLUETER; OTRH, 2004b).

2.4.3 CITOCINAS

Citocina é um termo geral que descreve uma ampla gama de pequenas proteínas regulatórias produzidas por uma variedade de células. Nas articulações, esses mediadores existem em um complexo balanço de atividades que regulam o metabolismo da membrana sinovial, osso e cartilagem articular, tanto fisiológica quanto patologicamente (CARON, 2003).

Numerosas citocinas estão envolvidas no metabolismo articular e possuem uma ou mais funções pró-inflamatórias (catabólicas), anti-inflamatórias (regulatórias) ou anabólicas. Na OA, as citocinas pró-inflamatórias importantes são a IL-1 e o TNF- α (ROUSSEAU; GARNERO, 2012). O aumento e ativação dos receptores de condrócitos para IL-1 e TNF- α tem vários efeitos deletérios no metabolismo dos condrócitos (CARON, 2003).

2.4.3.1 TNF- α

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória encontrada em alta concentração nas articulações inflamadas. Assim como a IL-1, o TNF- α estimula a síntese de enzimas degradantes da MEC e inibe a produção de PGs e colágeno (CARON, 2003). Ainda, é capaz de induzir a produção de IL-1 e potencializar seus efeitos atuando sinergicamente com a interleucina 1 beta (IL-1 β)(CARON, 2003; HASEEB; HAQI, 2013).

O TNF- α é secretado em sua forma latente por macrófagos, condrócitos, sinoviócitos e osteoclastos. A indução de seus efeitos biológicos ocorre pela sua interação com duas famílias de receptores de membrana, chamadas receptor TNF tipo 1 e 2 (BRESNIHAN; CUNNANE, 1998; SUTTON et al., 2009).

Níveis aumentados de TNF- α são encontrados em LS de cavalos com OA (SUTTON et al., 2009; KAMM; NIXON; WITTE, 2010). O aumento de sua expressão pela cartilagem articular concomitantemente indica que o TNF- α não danifica somente a cartilagem como também induz o aumento da secreção de citocinas pela membrana sinovial (KAMM; NIXON; WITTE, 2010).

2.4.3.2 IL-1

A família da IL-1 é composta por três peptídeos estruturalmente relacionados, mas expressados por genes distintos, que apresentam um amplo espectro de propriedades inflamatórias, metabólicas, fisiológicas, hematopoiéticas e imunológicas. Os primeiros dois são os agonistas IL-1 α e IL-1 β , e o terceiro é o antagonista de receptor de IL-1, o IL-1ra (DINARELLO; WOLFF, 1993; DINARELLO, 1996).

Diferenças notáveis entre IL-1 α e IL-1 β são observadas na regulação da expressão gênica, estabilidade do RNA mensageiro (mRNA), translação, processamento, secreção e afinidade com os receptores. A IL-1 α regula eventos intracelulares e atua como mediador local da inflamação, mas por ser uma citocina citoplasmática, geralmente não é encontrada na circulação ou em fluidos corporais, exceto em situações onde é liberada pela morte celular ou proteólise. Ao contrário, a IL-1 β tem sua secreção estimulada na presença de agentes microbianos, e atua como um hormônio mediador sistêmico a ser liberado pelas células (DINARELLO, 1996).

A síntese de IL-1 α e IL-1 β é realizada por células mononucleares, principalmente monócitos e macrófagos, estimuladas pela inflamação, por produtos microbianos ou por outras citocinas, incluindo o TNF- α (DINARELLO, 1996). Cada IL-1 agonista é sintetizada como uma grande molécula precursora de 31kDa que precisa ser clivada por uma protease extracelular para se transformar em sua forma madura, de 17kDa (DINARELLO; WOLFF, 1993; BRESNIHAN; CUNNANE, 1998).

A IL-1 é o modelo de uma citocina multifuncional que afeta quase todos os tipos celulares pela sua interação com o receptor de superfície das células alvo (DINARELLO, 1996; BRESNIHAN; CUNNANE, 1998). A IL-1 contribui para a defesa do organismo, induzindo os genes das proteínas de fase aguda, antioxidantes e fatores de crescimento hematopoiéticos (DINARELLO, 1994). Por outro lado, as células ativadas pela IL-1 liberam substâncias secundárias para mediar a inflamação e o remodelamento tecidual (SCHLUETER; ORTH, 2004a). Os condrócitos, de maneira geral, respondem à IL-1 produzindo colagenase, mas quando estimulados pela IL-1 β , produzem citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (DAVID et al., 2007). Os macrófagos estimulados pela IL-1 ativam os osteoclastos, resultando em reabsorção óssea e formação de osteófitos (CARON, 2003).

A IL-1 está envolvida na destruição da MEC e na formação de um tecido de reparação inadequado para a cartilagem articular. Além de diminuir a síntese de PGs e colágeno tipo II, ainda estimula a produção de PGE₂ e NO (DINARELLO, 2000), colagenase (BALAVOINE et al., 1986; DINARELLO; WOLFF, 1993), quimiocinas e enzimas proteolíticas que degradam as macromoléculas da MEC (MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CARON, 2003; MCILWRAITH, 2005).

Especificamente a ligação da IL-1 β aos receptores de células endoteliais estimula a expressão de moléculas de adesão, facilitando a infiltração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos nos tecidos inflamados (BRESNIHAN; CUNNANE, 1998). Acredita-se que a IL-1 β seja a citocina catabólica mais envolvida na OAE. Sua pró-forma é ativada pela enzima caspase-1 e promove a expressão do fator nuclear kappa beta (NF κ - β), que participa da regulação dos genes produtores de peptídeos pró-inflamatórios, quimiocinas, PGE₂, MMPs e NO (DAVID et al., 2007).

2.4.3.2.1 Inibição da IL-1

Diversas moléculas são capazes de inibir a atividade da IL-1, ligando-se diretamente a ela ou ao seu receptor, limitando sua transcrição ou atuando em locais que regulam sua atividade (LARRICK, 1989). Os bloqueadores de IL-1 podem atuar degradando a IL-1, ligando-se a IL-1 em solução, bloqueando os receptores de IL-1 ou prevenindo seus efeitos em nível pós-receptor (AREND, 1990; MCILWRAITH, 2010).

O IL-1ra é uma citocina inibitória natural (AREND, 1990) descrita pela primeira vez na urina de pacientes febris com leucemia monocítica (BALAVOINE et al., 1986). O antagonismo específico das atividades da IL-1 ocorre pela ocupação competitiva e de forma dose-dependente dos receptores de superfície pelo IL-1ra (SECKINGER et al., 1987; CARTER et al., 1990; HANNUM et al., 1990). Uma vez que IL-1 e IL-1ra têm afinidade equivalente pelos mesmos receptores, o antagonismo efetivo requer uma quantidade superior de receptores ocupados pelo IL-1ra, sendo necessárias concentrações de 5 a 100 vezes maiores deste antagonista para bloquear 50% das atividades de IL-1 α e IL-1 β (KATO et al., 1996; BRESNIHAN; AREND et al., 1998; CUNNANE, 1998). Estes dados, porem, resultam de diferentes experiências de ligação de formas recombinantes de IL-1ra com o receptor, não

refletindo a função biológica natural *in vivo* desta proteína antagonista (WEHLING et al., 2007).

O IL-1ra apresenta 30% de homologia com a sequência de aminoácidos da IL-1 β , podendo se ligar aos receptores de IL-1 tipos I e II sem ativação celular (AREND, 1990). Assim como a IL-1 β , o IL-1ra apresenta dois sítios para ligação com o receptor de IL-1; enquanto um sítio intensamente homólogo com a IL-1 β permite a ocupação do receptor, o outro não consegue se ligar ao receptor de proteína acessória (IL-1r-AcP) para formar o heterodímero, não havendo transdução de sinal, fosforilação e desencadeamento de uma resposta (DINARELLO, 1996). A produção de IL-1 juntamente com a produção de seu antagonista demonstra um equilíbrio fisiológico entre catabolismo e anabolismo, constituindo parte do processo de defesa do organismo (DINARELLO; THOMPSON, 1991; MAY; HOOKE; LEES, 1992; AREND et al., 1998; AREND; GUTHRIDGE, 2000; HORAI et al., 2000).

A descoberta e identificação de isoformas distintas de IL-1ra (CARTER et al., 1990) derivadas do mesmo gene (PALMER et al., 2002) comprova a existência de diferentes inibidores para diferentes atividades biológicas da IL-1 (BALAVOINE et al., 1986). A isoforma secretada (sIL-1ra) inibe competitivamente a ligação da IL-1 com seus receptores de superfície celular, enquanto as isoformas intracelulares (icIL-1ra 1, 2 e 3) desempenham suas atividades dentro das células (AREND et al., 1998; AREND; GUTHRIDGE, 2000; PALMER et al., 2002).

O IL-1ra é produzido por diversos tipos celulares (AREND, 1990; AREND, 1991; HASKILL et al., 1991; BRESNIHAN; CUNNANE, 1998; LAMACCHIA et al., 2012), principalmente macrófagos e monócitos (AREND et al., 1989; LARRICK, 1989), mediante processos inflamatórios ou infecciosos (AREND, 1990; MEIJER et al., 2003; WEHLING; MOSER; REINECKE, 2009). De acordo com Cassatella et al. (1994), a presença de interleucina 10 (IL-10) pode incrementar em duas a três vezes a produção de IL-1ra em um intervalo de tempo de 18 horas.

2.5 SORO AUTÓLOGO CONDICIONADO (ACS)

No ano de 2003, Meijer et al. demonstraram a possibilidade da produção de citocinas autólogas anti-inflamatórias através do tratamento físico-químico do sangue total. O sangue

de pacientes humanos foi coletado em seringas estéreis contendo 200 esferas de vidro (2,5 mm de diâmetro e 21 mm² de área) tratadas com sulfato de cromo (CrSO₄), incubado a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas, centrifugado e filtrado. O ACS resultante apresentou concentrações de IL-1ra 140 vezes maiores, e em menor proporção, maiores concentrações de interleucina 4 (IL-4) e IL-10.

O ACS é amplamente utilizado na terapia de doenças ortopédicas humanas (BRESNIHAN; CUNNANE, 1998; WEHLING; MOSER; REINECKE, 2009; DARABOS et al., 2011; KRAUS et al., 2012) e equinas (TEXTOR, 2011; CHIARADIA et al., 2012). Além das diversas citocinas anti-inflamatórias e do antagonista natural IL-1ra (FRISBIE et al., 2007; WEHLING et al., 2007), o ACS contém, ainda, diversos fatores de crescimento atuando sinergicamente, incluindo o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-AB), TGF-β entre outros (WEHLING; MOSER; REINECKE, 2009; RUTGERS et al., 2010). Tanto o IGF-1 quanto o TGF-β atuam como condroprotetores, além de diminuir a produção de IL-1 (SMITH; ROSS; SMITH, 2006; HRARA et al., 2011; TEXTOR, 2011).

Segundo Meijer et al. (2003), o tratamento físico-químico do sangue durante 24 horas não promove aumento das concentrações de citocinas pró-inflamatórias. No entanto, um estudo mais recente realizado por Wehling et al. (2007) observou que a incubação da seringa de ACS por seis horas leva a aumento tanto das citocinas anti-inflamatórias IL-1ra e IL-10 e fatores de crescimento, quanto das citocinas pró-inflamatórias IL-1β, interleucina 6 (IL-6) e TNF-α, mas que este aumento não é capaz de interferir no metabolismo dos PGs da cartilagem articular (RUTGERS et al., 2010).

Em humanos, a analgesia promovida pelo ACS tem demonstrado ser capaz de melhorar os parâmetros clínicos de diversas enfermidades articulares (SCHIFF, 2000; YANG et al., 2008; BALTZER et al., 2009; MOSER et al., 2009; DARABOS, et al., 2011; KRAUS et al., 2012). Ainda, em pacientes com OA, o ACS demonstrou habilidade em minimizar os efeitos da sinovite pela redução da hiperplasia das vilosidades e da infiltração celular da membrana sinovial (BRESNIHAN; CUNNANE, 1998) e, mais recentemente, em promover a resposta cicatricial (WEHLING; MOSER; REINECKE, 2009).

Na espécie equina, resultados semelhantes foram relatados por Frisbie et al. (2007). Em um modelo de OAE induzida experimentalmente, a aplicação de ACS diminuiu a concentração de proteínas, PGE₂ e GAGs no LS, e também minimizou a erosão e hemorragia da membrana sinovial e a hiperplasia das vilosidades, demonstrando efeito anti-inflamatório. Neste estudo, ainda, as articulações tratadas com ACS tiveram aumento na concentração de

IL-1ra detectado após 35 dias, sugerindo que a aplicação exógena do antagonista estimula sua produção endógena por efeito sistêmico.

2.6 PROTEÍNA ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE IL-1 (IRAP®)

Originalmente, a produção de ACS por produtos comerciais foi desenvolvida pela empresa alemã Orthogen, com o nome comercial Orthokine®, que desde 1998 é utilizado clinicamente em pacientes humanos com doenças ortopédicas como OA, artrite reumatóide e enfermidades da coluna vertebral (WEHLING; REINECKE; MEIJER, 1998). Visando atender o mercado equino, a mesma empresa disponibilizou o produto nos Estados Unidos, com o nome comercial IRAP®, e mais recentemente a empresa Arthrex produziu o IRAP II®. Ao contrário do que sugere a terminologia, o IRAP não é composto apenas pela proteína antagonista purificada IL-1ra, mas sim por diversas substâncias derivadas do sangue (TEXTOR, 2011).

Um estudo comparativo entre os dois produtos foi realizado por Hraha et al. (2011), e demonstrou que quantidades significativamente maiores de IL-1ra foram produzidas pelo IRAP II. Não foram observadas diferenças na proporção de IL-1 e IL-1ra entre os produtos, mas o IRAP II apresentou maiores resultados em relação aos valores basais do soro. Não houve diferença nas concentrações de IL-10, IL-1 β , TNF- α , IGF e TGF.

2.7 PLASMA AUTÓLOGO CONDICIONADO (ACP)

Um dos primeiros relatos sobre o potencial terapêutico do plasma autólogo foi descrito por Asbury (1984). Em seu experimento, o autor observou a melhora clínica e maior taxa de prenhez de éguas com endometrite que foram submetidas à infusão intrauterina de plasma autólogo. Pouco tempo depois, em 1987, pesquisadores relataram a cicatrização mais eficiente e o aumento de tecido conjuntivo nas feridas periodontais tratadas com plasma autólogo liofilizado (NASJLETI et al., 1987). Estudos mais recentes demonstraram o potencial benéfico do plasma em potros sépticos ou com hipoproteinemia (MCTAGGART; PENHALE; RAIDAL, 2005).

A caracterização e explicação dos efeitos observados após aplicação de plasma foram realizadas utilizando a citometria de fluxo. Em potros com septicemia, a transfusão de plasma incrementou a atividade fagocitária dos neutrófilos nas primeiras 24 horas e aumentou o *burst* oxidativo até cinco dias depois em relação aos resultados obtidos antes do tratamento (MCTAGGART; PENHALE; RAIDAL, 2005). O plasma congelado de diferentes doadores demonstrou que o aumento da capacidade de opsonização dos neutrófilos de potros jovens e adultos varia individualmente, e que tal habilidade é perdida em altas temperaturas (GRÖNDAHL; JOHANNISSON; JENSEN-WAERN, 1997).

O fator inibidor da secreção de protease leucocitária (SLPI) é um inibidor serino protease encontrado no plasma sanguíneo. O SLPI é capaz de limitar os danos teciduais causados pelos neutrófilos através da inibição da secreção de EROs pelas células, redução da produção de peróxido de hidrogênio pelo TNF- α e neutralização de proteases (GROBMYER et al., 2000). A produção de IL-10 e TGF- β por macrófagos estimulados com LPS aumenta na presença de SLPI (SANO, 2000), demonstrando sua capacidade em controlar a inflamação sistêmica e as alterações articulares observadas em doenças ortopédicas (SONG et al., 1999).

Estudos em pacientes humanos comprovaram o efeito antioxidante do plasma através da mensuração de sua capacidade antioxidante total (TAC) e de malondialdeído (MDA), um importante marcador do estresse oxidativo (GAMBHIR; LALI; JAIN, 1997; SARBAN et al., 2005). Na espécie equina, a ação antioxidante do plasma condicionado foi demonstrada recentemente por Brossi et al. (2012), através da citometria de fluxo. Seguindo o modelo comercial de preparação do ACS, o plasma coletado por estes autores foi incubado a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas, centrifugado e filtrado. In vitro, os efeitos antioxidantes exercidos pelo produto IRAP® foram semelhantes estatisticamente ($P > 0,05$) com aqueles exercidos pelo plasma condicionado. Além da possível aplicação terapêutica primária, os efeitos antioxidantes do plasma poderiam modular as condições adversas nas articulações com OA, potencializando a eficácia dos medicamentos.

A resposta sinovial à aplicação intra-articular de plasma ainda não foi reportada em nenhuma espécie. Sua administração em articulações hípidas forneceria informações básicas para o entendimento de seus efeitos na fisiologia articular, ampliando as perspectivas terapêuticas e justificando sua utilização nas diversas artropatias.

3 OBJETIVOS

Caracterizar e avaliar os efeitos inflamatórios *in vivo* da utilização de ACP em articulações metacarpofalangeanas híginas de equinos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar clinicamente os efeitos da aplicação intra-articular de ACP sobre as articulações metacarpofalangeanas por meio do exame físico.

Após a administração, realizar a análise física e química do LS das articulações metacarpofalangeanas por meio da avaliação da cor, aspecto, viscosidade, qualidade do precipitado de mucina e dosagem da proteína total; registrar o volume obtido no momento da coleta, bem como realizar a contagem total e diferencial das células nucleadas.

Quantificar as concentrações de PGE₂, TNF- α , IL-1 e IL-1ra presentes no LS.

Identificar e quantificar as concentrações de AH e CS presentes no LS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 20 articulações metacarpofalangeanas de 10 equinos não atletas, machos ou fêmeas, com idade entre 4 e 10 anos ($7,7 \pm 2,0$) alojados e cedidos gentilmente pelo Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Os animais foram mantidos em cocheiras sob condições naturais de luz, umidade e temperatura. Receberam como alimento ração balanceada e feno de gramínea *coast cross* (*Cynodum dactylum*). Água foi fornecida *ad libitum*.

Cada animal foi submetido a uma única aplicação intra-articular de ACP (4 ml) e uma outra de solução fisiológica a 0,9% (4 ml) no membro contralateral, como controle (Quadro 1). Aleatoriamente, cinco equinos receberam primeiro o ACP, enquanto os demais iniciaram o experimento com a solução fisiológica a 0,9%. Após intervalo de sete dias da primeira aplicação, a articulação contralateral de cada animal recebeu o segundo tratamento.

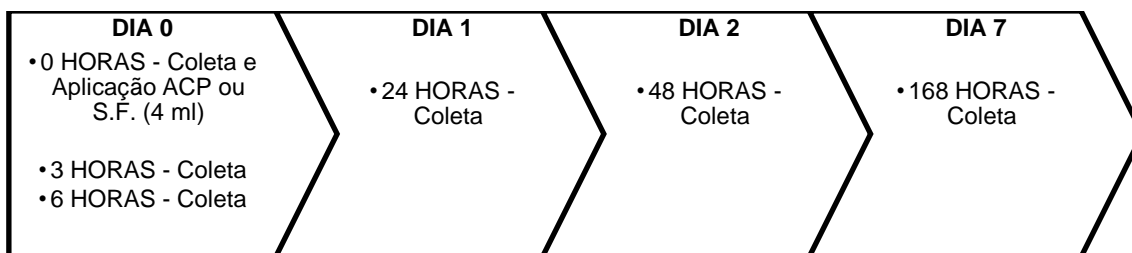
Amostras de LS foram coletadas das articulações metacarpofalangeanas imediatamente antes de cada aplicação intra-articular e nos momentos 3, 6, 24, 48 e 168 horas (Figura 1). O volume de LS foi registrado no momento de cada coleta.

Quadro 1 – Raça, idade (anos) e sexo dos animais utilizados e tratamento administrado em cada articulação metacarpofalangeana – São Paulo – 2013

Animal	Raça	Idade	Sexo	ACP	Solução Fisiológica
01	SRD	10	F	MTD	MTE
02	SRD	6	F	MTE	MTD
03	SRD	6	F	MTD	MTE
04	SRD	4	M	MTE	MTD
05	SRD	7	F	MTE	MTD
06	SRD	10	M	MTD	MTE
07	SRD	8	M	MTE	MTD
08	PSA	8	M	MTD	MTE
09	SRD	10	M	MTD	MTE
10	SRD	8	M	MTE	MTD

MTD: metacarpofalangeana direita; MTE: metacarpofalangeana esquerda; SRD: sem raça definida; PSA: puro sangue árabe; M: macho; F: fêmea.

Figura 1 – Esquema cronológico da aplicação de ACP e solução fisiológica (S.F.) e das coletas seriadas de LS – São Paulo – 2013



4.1.1 Exame Clínico para Seleção dos Animais

Foram selecionados os animais sem histórico de lesão articular, que não apresentaram claudicação durante o exame físico e que não foram responsivos ao teste de flexão dos membros torácicos.

4.1.1.1 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, 24, 48 e 168 horas, e constou de:

- a. Inspeção (aumento de volume; postura antálgica em estação)
- b. Palpação (calor; dor na flexão passiva; consistência)
- c. Claudicação (presente ou ausente; graduação)
- d. Teste de flexão (positivo ou negativo)

A presença de claudicação nos animais foi avaliada de forma subjetiva e graduada conforme citado por Stashak (2002) (Tabela 1); também foi avaliada objetivamente, utilizando equipamento¹ capaz de indicar o membro de origem. Nesta técnica, três sensores são dispostos em pontos estratégicos no cavalo (Figura 2). Os movimentos captados pelos

¹ Lameness Locator®

sensores são convertidos em vetores e interpretados pelo programa, que atribui um número ao vetor resultante. Para os membros torácicos, a constante limiar é 0,50, ou seja, qualquer resultante abaixo deste valor é considerada como não claudicante.

Tabela 1 – Sistema de graduação da claudicação – Stashak – 2002

Grau	Descrição
0	Claudicação imperceptível sob qualquer circunstância
1	Claudicação de difícil observação; não evidente de forma consistente independentemente das circunstâncias
2	Claudicação de difícil observação ao passo ou ao trote em linha reta; evidente de forma consistente em algumas situações
3	Claudicação consistentemente observada ao trote em todas as situações
4	Claudicação óbvia; acentuada inclinação de cabeça, passada presa e/ou encurtada
5	Claudicação óbvia; mínima sustentação de peso na movimentação ou repouso; inabilidade de locomoção

Figura 2 – Imagem fotográfica do exame de claudicação utilizando o aparelho Lameness Locator® (círculos indicam a localização dos sensores) – São Paulo – 2013



Fonte: Moreira (2013)

4.2 OBTENÇÃO DO ACP

Para obtenção do ACP aproximadamente 20 ml de sangue da veia jugular esquerda de cada equino foram retirados assepticamente em tubos com heparina de sódio². As amostras foram devidamente acondicionadas e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas. No fluxo laminar, utilizando uma pipeta pasteur estéril, o plasma foi transferido para um tubo falcon de 15 ml, também estéril, e centrifugado³ a 24°C e 300 G durante 10 minutos (Gráfico 2). As amostras foram novamente levadas para dentro do fluxo laminar, e transferidas para outro tubo falcon de 15 ml estéril, evitando aspirar o botão celular no fundo do tubo. O plasma foi centrifugado pela segunda vez a 24°C e 900 G durante 10 minutos. Com agulha hipodérmica 40x16⁴ e seringa de 10 ml⁵, o plasma foi aspirado do tubo falcon e esterilizado por meio da filtração em microfiltro millipore⁶ 0.22 µm. As amostras foram aliquotadas em tubo falcon estéril para aplicação intra-articular imediata.

Quadro 2 – Protocolo de centrifugação do ACP com variação da força centrífuga relativa (G) e variação do tempo em minutos (min.) – São Paulo – 2013

Protocolo	Força	Tempo	Temperatura (°C)
1ª centrifugação	300	10	24
2ª centrifugação	900	10	24

4.3 LS

4.3.1 Coleta

Foram coletadas amostras de LS de ambas as articulações metacarpofalangeanas, e o volume registrado no momento da colheita. O acesso escolhido para a artrocentese foi através do ligamento sesamoideano colateral lateral, segundo técnica descrita por Misheff e Stover

² Tubo Heparina de Sódio BD – ref. 367874

³ Centrífuga 5810 - Eppendorf

⁴ Agulha descartável BD – PrecisionGlide

⁵ Seringa descartável BD – PrecisionGlide

⁶ Jet Biofil – FPE-204-030

(1991), utilizando agulhas hipodérmicas 30 x 8⁷. O local de punção foi preparado assepticamente antes de cada colheita com o uso de iodopovidona degermante e álcool 70%. O LS foi imediatamente processado no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP.

4.3.2 Processamento

Após cada coleta, as amostras de LS foram imediatamente centrifugadas⁸ 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.

4.3.3 Análise Física

O LS foi analisado *in natura* quanto à coloração, sendo classificado como amarelo palha, amarelo ouro ou vermelho; quanto ao aspecto, como límpido, semi turvo ou turvo; e quanto à viscosidade, como boa (>5 cm), regular (2 a 5 cm) ou ruim (<2 cm) (VAN PELT, 1974).

4.3.4 Teste do Precipitado de Mucina

Para análise da qualidade do precipitado de mucina o LS foi centrifugado a 4°C e 2000 g durante 15 minutos, e 50 µl do sobrenadante foram adicionados a 1,5 ml de ácido acético a 2%. O grumo formado foi classificado como bom, regular, ruim e muito ruim, recebendo, respectivamente, os seguintes escores: 1, 2, 3, e 4 (VAN PELT, 1962).

⁷ Agulha descartável BD – PrecisionGlide

⁸ Centrífuga 5417 R - Eppendorf

4.3.5 Contagem Total e Diferencial das Células

A contagem total de células nucleadas foi realizada em câmara de Neubauer⁹, 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.

Para o diferencial celular, 50 µl de líquido sinovial *in natura* foram diluídos em 50 µl de solução fisiológica 0,9%, homogeneizados e centrifugados a 4°C e 150 G durante 10 minutos. Foram descartados 50 µl de sobrenadante e o botão celular foi ressuspensionado nos 50 µl restantes. Em seguida foram confeccionados os esfregaços, corados com Rosenfeld.

4.3.6 Determinação da Ureia

Para correção da diluição das amostras foi realizada a dosagem de ureia do LS. O sobrenadante armazenado à temperatura de -80°C em tubo tipo eppendorf sem anticoagulante foi descongelado e analisado pelo método do biureto, com a utilização do analisador bioquímico automático¹⁰.

4.3.7 Determinação da Proteína Total

Para a dosagem da proteína total do LS foi utilizado o sobrenadante armazenado à temperatura de -80°C em tubo tipo eppendorf sem anticoagulante. As alíquotas foram descongeladas e analisadas pelo método do biureto, com a utilização do analisador bioquímico automático.

⁹ Neubauer – Hirschmann – EM – Techcolor

¹⁰ Randox RX Daytona

4.3.8 Determinação da PGE₂

A quantificação de PGE₂ do LS foi realizada por ELISA, com o *kit* Prostaglandin E₂ EIA Kit – Monoclonal (Ref.: 514010), adquirido 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 (100 µl) e aos poços de máxima ligação (50 µl). A curva padrão foi feita em duplicata, adicionando 50 µl em cada poço das fileiras 2 e 3 da placa. Em seguida, 50 µl das amostras de LS foram adicionadas em cada poço, em duplicata. Com exceção dos poços de atividade total e branco, todos os demais receberam 50 µl de *PGE₂ tracer*, contendo acetilcolinesterase (AChE). O anticorpo monoclonal anti-PGE₂ foi adicionado na quantidade de 50 µl aos poços, com exceção dos poços de atividade total, ligação inespecífica e branco. A placa foi incubada por 18 horas a 4°C e em seguida lavada¹¹ 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 agitador¹² por 60 a 90 minutos. A absorbância da amostra foi lida à 412 nm em leitor¹³ de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 7.8 a 1000 pg/ml pelo programa Gen 5. 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.

4.3.9 Determinação do TNF-α

A quantificação de TNF-α do LS foi realizada por ELISA, utilizando o *kit* Equine TNF-α – Duo Set (Ref.: DY 1814), adquirido da empresa R&D Systems. O LS utilizado

¹¹ 405 LS - Biotek

¹² Mini Shaker PSU-2T - Biosan

¹³ ELx808 - Biotek

estava acondicionado em tubos tipo eppendorf sem anticoagulante, mantidos à temperatura de -80°C.

A placa foi previamente sensibilizada pela adição de 100 µl de anticorpo de captura (anti-TNF) em todos os poços. Após incubação *overnight* em temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes com 300 µl de *Wash Buffer*/poço em cada lavagem. A placa foi bloqueada pela adição de 100 µl de *Reagent Diluent* em cada poço, incubada em temperatura ambiente por pelo menos 60 minutos, e lavada três vezes com 300 µl de *Wash Buffer*/poço em cada lavagem. Foram adicionados 100 µl de cada amostra, em duplicata, em cada poço, e também 100 µl do padrão. Após incubação por 160 minutos em temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes com 300 µl de *Wash Buffer*/poço em cada lavagem, e foram adicionados 100 µl de *Detection Antibody* em cada poço. A placa foi incubada durante 160 minutos em temperatura ambiente, lavada três vezes com 300 µl de *Wash Buffer*/poço e 100 µl de estreptavidina peroxidase foram adicionados em todos os poços. Após incubação por 20 minutos protegida da luz e em temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes com 300 µl de *Wash Buffer*/poço. Foram adicionados 100 µl de *Substrate Solution* em cada poço e, após incubação em temperatura ambiente e protegida da luz, a placa recebeu 50 µl de *Stop Solution* em cada poço. A placa foi lida a 450 nm em leitor de ELISA e correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 15.6 a 1000 pg/ml pelo programa Gen 5. 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.

4.3.10 Determinação da IL-1β

A quantificação de IL-1β do LS foi realizada por ELISA, com o *kit* para IL-1β de equinos (Ref.: E90563Eq), adquirido da empresa USCN Life Science. O LS utilizado estava acondicionado em tubos tipo eppendorf sem anticoagulante, mantidos à temperatura de -80°C.

À placa previamente sensibilizada com anticorpo específico para IL-1β foram adicionados 100 µl da curva padrão e do branco, em duplicata. As amostras de LS foram adicionadas em seguida, também em duplicata, na quantidade de 100 µl por poço. A placa foi incubada por 60 minutos a 37°C. O conteúdo foi descartado sem que a placa fosse lavada, e

foram adicionados 100 µl de *Detection Reagent A* em cada poço. Após incubação por 60 minutos a 37°C, a placa foi lavada três vezes com 350 µl de *Wash Solution*/poço. Foram adicionados 100 µl de *Detection Reagent B* em cada poço, e a placa foi incubada por 30 minutos a 37°C. A placa foi lavada cinco vezes com 350 µl de *Wash Buffer*/poço, e 90 µl de *Substrate Solution* foram adicionados em cada poço. Após incubação protegida da luz por 15 a 20 minutos a 37°C, foram adicionados 50 µl de *Stop Solution* em cada poço. A absorbância da amostra foi lida em 450 nm em leitor de ELISA correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 15.6 a 1.000 pg/ml pelo programa Gen 5. 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.

4.3.11 Determinação do IL-1ra

A quantificação de IL-1ra do LS foi realizada por ELISA, com o *kit* Quantikine para mouse (Ref.: MRA00), adquirido da empresa R&D Systems (EUA). O LS utilizado estava acondicionado em tubos tipo eppendorf sem anticoagulante, mantidos à temperatura de -80°C.

Foram adicionados 50 µl de *Assay Diluent RDIW* (solução conservada de proteína) em cada poço. Em seguida, foram adicionados 50 µl da curva padrão, em duplicata, e 50 µl do controle. Os demais poços foram preenchidos com 50 µl das amostras de LS, em duplicatas. A placa foi mantida no agitador por 60 minutos em temperatura ambiente, e em seguida foi lavada cinco vezes com 400 µl de *Wash Buffer*/poço. Foram adicionados 100 µl de IL-1ra conjugada de mouse em cada poço, e a placa foi incubada no agitador por mais 60 minutos em temperatura ambiente. A placa foi lavada cinco vezes com 400 µl de *Wash Buffer*/poço, e 100 µl de *Substrate Solution* foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada protegida da luz por 30 minutos em temperatura ambiente, e então 100 µl de *Stop Solution* foram adicionados em cada poço. A placa foi lida em 450 nm em leitor de ELISA correlacionada à concentração pelo uso de uma curva padrão com variação de 31.2 a 2.000 pg/ml pelo programa Gen 5. 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.

4.3.12 Determinação dos GAGs

Para a determinação de GAGs no LS 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 (4 mg/ml Tris HCl 0,05 M) e incubados em banho-maria a 50°C , *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram fervidas durante 15 minutos e centrifugadas¹⁴ 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 vácuo¹⁵ por pelo menos 2 horas a 45°C . As amostras foram ressuspensas em 25 μl de água destilada.

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

As lâminas foram escaneadas¹⁶ e as imagens editadas¹⁷ para análise das bandas metacromáticas e obtenção das unidades densitométricas¹⁸.

¹⁴ Centrífuga 5418 - Eppendorf

¹⁵ Vacufuge vaccum concentrator - Eppendorf®

¹⁶ Epson Expression 1680®

¹⁷ Laund Silver Fast Epson IT8®

¹⁸ Lauch VisionWorksLS®

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram avaliados segundo a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov; em seguida utilizou-se modelo de análise de variância (ANOVA) para verificar o efeito de grupos e momentos, seguido pelo teste de Tukey-Kramer.

Parâmetros subjetivos, para os quais se atribuíram escores numéricos, foram estudados empregando-se a análise de variância não paramétrica, utilizando-se o teste de Friedman. Para comparação entre grupos, foi utilizado o teste T pareado ou Wilcoxon.

O grau de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO FÍSICA ARTICULAR

Os dados referentes à avaliação física articular dos animais em ambos os tratamentos encontram-se nos apêndices A, B, C, D e E.

Durante o experimento nenhum animal apresentou alteração anatômica ou postural decorrente de dor ou desconforto. À palpação, todos os animais tiveram hipertermia local nos momentos 24 e 48 horas em ambos os tratamentos. Sensibilidade articular foi positiva no momento 24 horas nos dois grupos, sendo que três animais (1, 3 e 9) mantiveram-se sensíveis no momento 48 horas do tratamento com ACP. Não houve alteração de consistência articular no período avaliado.

A avaliação subjetiva da claudicação mostrou que apenas um animal (3) apresentou claudicação grau 1 nos momentos 24 e 48 horas do tratamento com ACP. A avaliação feita pelo aparelho Lameness Locator® acusou a presença de claudicação no mesmo animal nos momentos 24 (0,76), 48 (0,51) e 168 (0,58) horas do mesmo tratamento.

O teste de flexão articular subjetiva durante o tratamento com ACP foi positivo em três animais (1, 3 e 4) às 24 (grau 1, grau 2 e grau 1) e 48 horas (grau 1, grau 1 e grau 1). No grupo controle, o animal 4 apresentou claudicação grau 1 às 24 e 48 horas, e o animal 8 apresentou claudicação grau 1 em todos os momentos. A avaliação realizada com o aparelho Lameness Locator® acusou presença de claudicação no animal 1 às 24 (0,54), 48 (0,68) e 168 (0,57) horas, e em três animais (3, 4 e 6) às 24 (0,97; 0,52 e 0,55) e 48 horas (0,62; 0,59 e 0,53) do tratamento com ACP. O animal 4 apresentou claudicação às 24 (0,62) e 48 (0,69) horas, e o animal 8 foi positivo para todos os momentos do tratamento controle (0,58; 0,62; 0,60; 0,56).

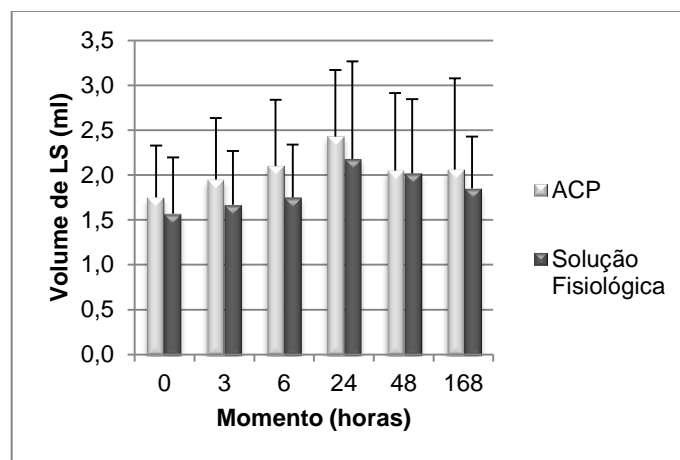
5.2 LS

5.2.1 Coleta

As coletas de LS das articulações metacarpofalangeanas provocaram algumas alterações locais em virtude do curto intervalo de tempo entre as artrocenteses. O local escolhido foi de fácil manipulação e ocasionou pouca contaminação sanguínea das amostras.

Os dados referentes ao volume de LS coletado nos diferentes momentos dos tratamentos encontram-se no Apêndice F, não havendo diferença estatística significativa entre os grupos ($P>0,05$). Também não houve diferença estatística significativa no volume de LS coletado entre os diferentes momentos de um mesmo tratamento (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Volume médio de LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos durante os tratamentos com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013



5.2.2 Análise Física

5.2.2.1 Cor

Os dados referentes à cor das amostras coletadas de LS encontram-se no Apêndice G.

A administração de ACP provocou maior contaminação das amostras ($P < 0,05$) nos momentos 6 e 24 horas em relação ao grupo controle. As articulações tratadas com ACP apresentaram maior contaminação das amostras com sangue às 6 e 24 horas em relação às 168 horas. Durante a coleta de LS prévia à aplicação de ACP, houve necessidade de reposicionamento da agulha em três animais, o que levou à contaminação iatrogênica das amostras, alterando as informações iniciais. Vinte e uma amostras (36,2%) foram classificadas com cor amarelo palha, 17 amostras (29,3%) com cor amarelo ouro e 20 amostras (34,5%) com cor vermelha (Gráfico 2).

Não foram observadas alterações significativas dentro do grupo controle, que apresentou LS de cor amarelo palha em 47 amostras (78,3%), cor amarelo ouro em sete amostras (11,7%) e cor vermelha em seis amostras (10%) (Gráfico 3).

Gráfico 2 – Cor do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos do tratamento com ACP – São Paulo – 2013

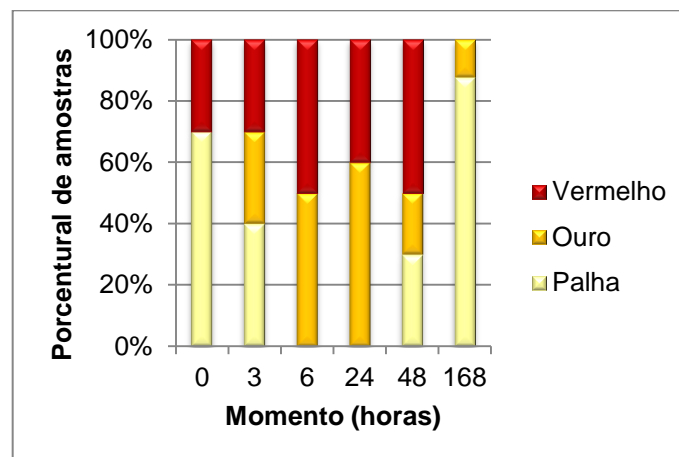
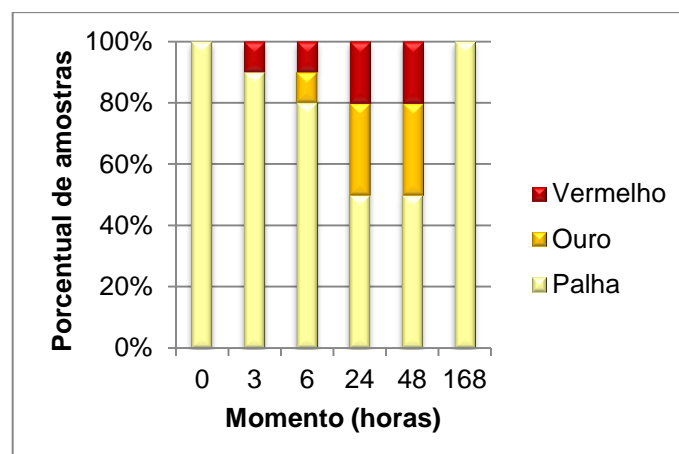


Gráfico 3 – Cor do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos do tratamento com solução fisiológica – São Paulo – 2013



5.2.2.2 Aspecto

Os dados referentes ao aspecto das amostras coletadas de LS encontram-se no Apêndice G.

Não foram encontradas diferenças significativas no aspecto das amostras coletadas entre o tratamento com ACP e o grupo controle. O LS proveniente da administração de ACP apresentou aspecto límpido em 50 amostras (86,2%), aspecto semi turvo em seis amostras (10,3%) e aspecto turvo em duas amostras (3,5%) (Gráfico 4). O tratamento controle apresentou 56 amostras de aspecto límpido (93,4%) e quatro amostras com aspecto semi turvo (6,6%) (Gráfico 5).

Gráfico 4 – Aspecto do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos do tratamento com ACP – São Paulo – 2013

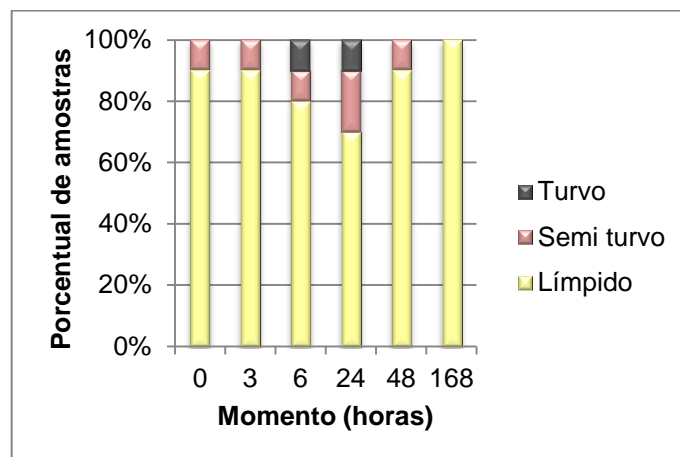
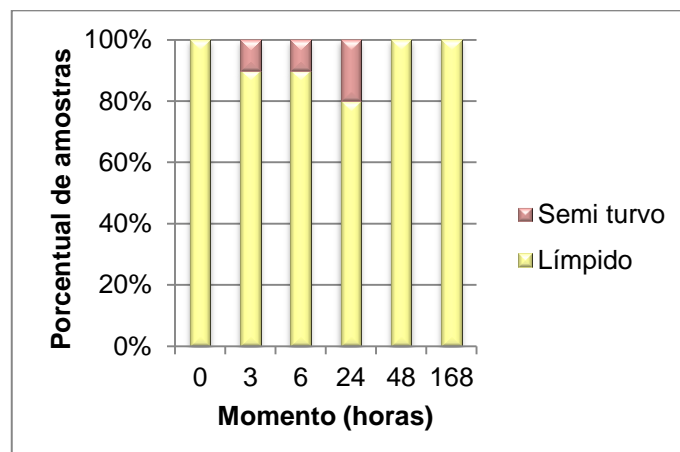


Gráfico 5 – Aspecto do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas nos diferentes momentos do tratamento com solução fisiológica – São Paulo – 2013



5.2.2.3 Viscosidade

Os dados referentes à viscosidade das amostras de LS encontram-se no Apêndice H.

Não houve diferença significativa na viscosidade das amostras entre os diferentes grupos. A aplicação de ACP diminuiu a viscosidade ($P < 0,05$) às 6 horas em relação às características iniciais, apresentando 20 amostras de LS com viscosidade boa (>5) (34,5%) e 38 amostras com viscosidade regular (2 a 5) (65,5%). O grupo controle teve piora da viscosidade ($P < 0,05$) às 6 horas em relação às características iniciais, e apresentou 28 amostras com viscosidade >5 (46,7%) e 32 amostras com viscosidade de 2 a 5 (53,3%) (Gráficos 6 e 7).

Gráfico 6 – Viscosidade do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP – São Paulo – 2013

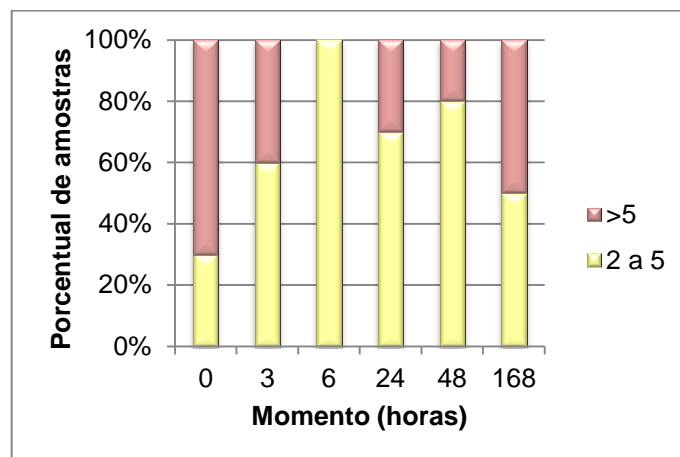
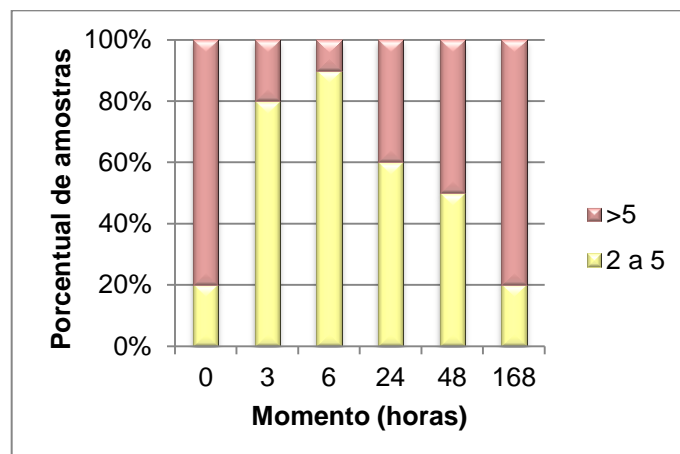


Gráfico 7 – Viscosidade do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com solução fisiológica – São Paulo – 2013



5.2.3 Teste do Precipitado de Mucina

Os dados referentes à qualidade do precipitado de mucina de LS encontram-se no Apêndice H.

Não houve diferença significativa na qualidade do precipitado de mucina entre os tratamentos, com a maioria dos animais apresentando formação de um grumo de boa qualidade (Gráficos 8 e 9).

Gráfico 8 – Qualidade do precipitado de mucina do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP – São Paulo – 2013

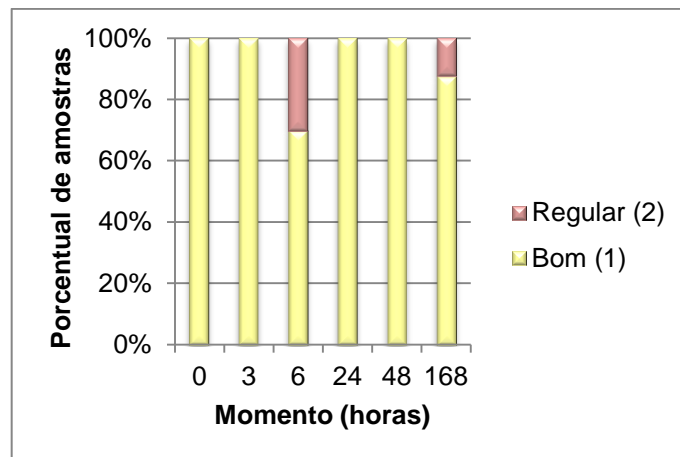
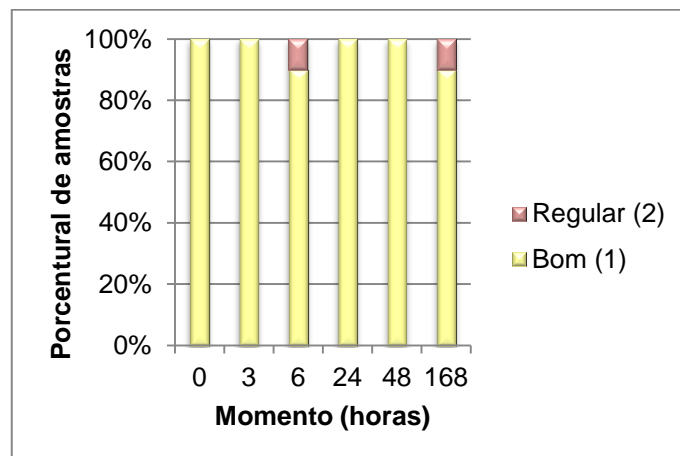


Gráfico 9 – Qualidade do precipitado de mucina do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com solução fisiológica – São Paulo – 2013



5.2.4 Contagem Total e Diferencial das Células

Os dados referentes à contagem total (células/ μ l) e diferencial das células do LS encontram-se nos apêndices I, J e L.

O grupo que recebeu ACP apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) na contagem total de células nucleadas nos momentos 3, 6, 24 e 48 horas quando comparado com o grupo controle. Em relação aos diferentes momentos de um mesmo grupo, o tratamento com ACP apresentou um aumento significativo ($P < 0,05$) no momento 6 horas em relação aos valores iniciais. Já o grupo controle apresentou aumento significativo em relação aos valores iniciais nos momentos 24 e 48 horas ($P < 0,05$) (Gráfico 10).

A comparação entre os tratamentos mostrou queda significativa ($P < 0,05$) no valor médio relativo (%) das células mononucleares nos momentos 3 e 6 horas do grupo tratado com ACP em relação ao grupo controle. Ao mesmo tempo houve aumento significativo ($P < 0,05$) dos valores médios relativos (%) de polimorfonucleares deste mesmo grupo, no mesmo intervalo de tempo, em relação ao grupo controle.

Durante o tratamento com ACP o valor médio relativo (%) de células mononucleares diminuiu significativamente ($P < 0,05$) no momento 3 horas e voltou a aumentar a partir do momento 48 horas. No grupo controle a queda no valor médio relativo (%) ocorreu no momento 6 horas, com retomada dos valores basais a partir das 48 horas (Gráfico 11).

O valor médio relativo (%) de células polimorfonucleares aumentou significativamente ($P < 0,05$) no momento 3 horas dentro do grupo que recebeu ACP, e no momento 6 horas dentro do grupo controle, retomando os valores basais a partir do momento 48 horas em ambos os tratamentos (Gráfico 12).

Gráfico 10 – Média da contagem total de células nucleadas presentes no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

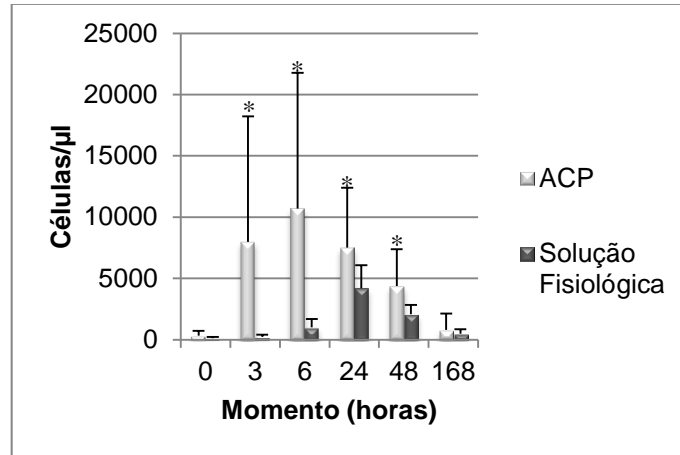


Gráfico 11 – Valor médio relativo de leucócitos mononucleares presentes no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

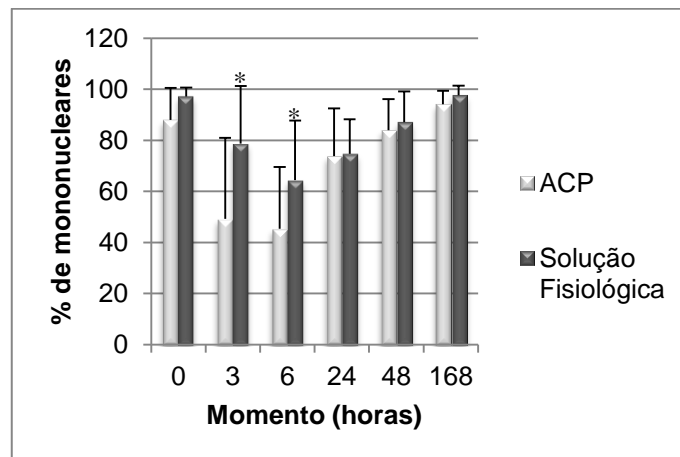
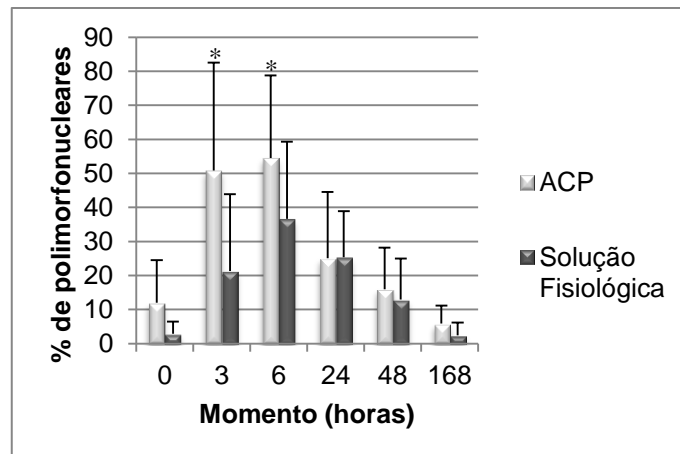


Gráfico 12 – Valor médio relativo de leucócitos polimorfonucleares presentes no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

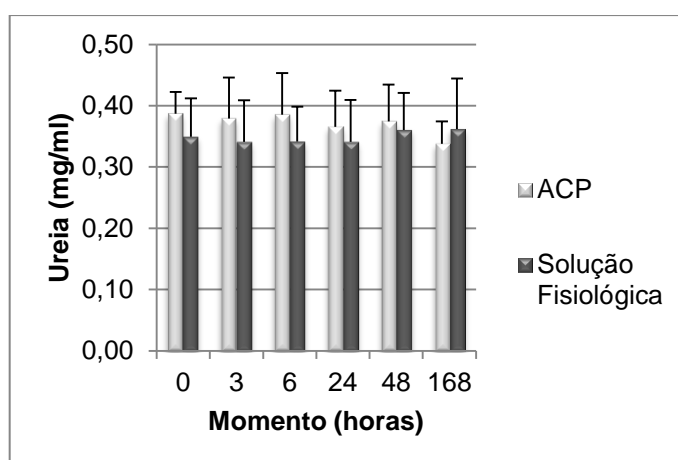


5.2.5 Determinação da Ureia

Os dados referentes à ureia (mg/dl) do LS encontram-se no apêndice M.

Não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$) nos valores médios de ureia entre os grupos, nem entre os diferentes momentos dentro de cada tratamento (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Concentração média de ureia (mg/ml) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com plasma autólogo condicionado e solução fisiológica – São Paulo – 2013

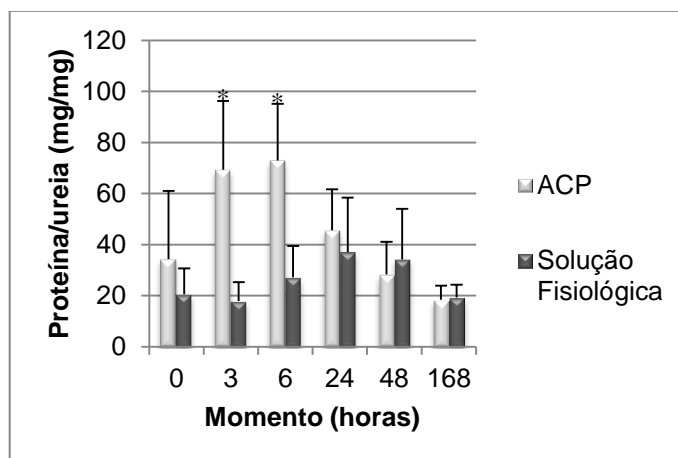


5.2.6 Determinação da Proteína Total

Os dados referentes à proteína total (g/dl) e proteína/ureia (mg/mg) do LS encontram-se nos apêndices N e N' respectivamente.

O grupo tratado com ACP teve aumento significativo ($P<0,05$) nos valores médios de proteína total durante os momentos 3 e 6 horas em relação ao grupo controle. O tratamento com ACP provocou aumento significativo ($P<0,05$) nos valores médios da proteína total nos momentos 3 e 6 horas em relação aos valores iniciais. Por outro lado, o grupo controle apresentou aumento significativo nos valores médios de proteína total no momento 24 horas em relação ao momento anterior, 3 horas (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Concentração média da proteína/ureia (mg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

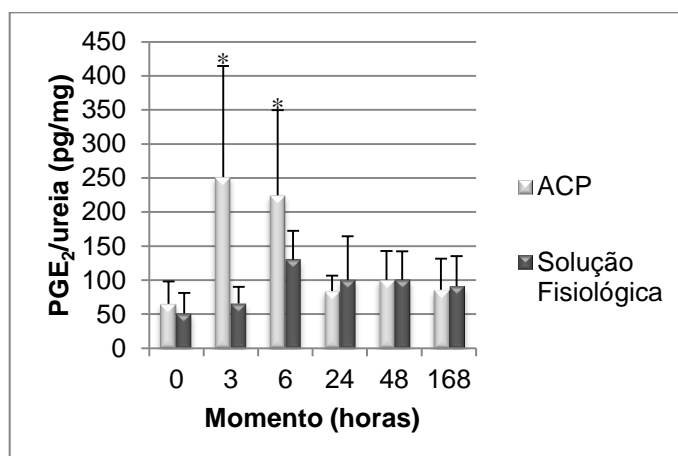


5.2.7 Determinação da PGE₂

Os dados referentes aos valores de PGE₂ (pg/ml) e PGE₂/ureia (pg/mg) do LS encontram-se nos apêndices O e O' respectivamente.

Houve aumento significativo ($P < 0,05$) na média dos valores de PGE₂ em relação ao grupo controle nos momentos 3 e 6 horas do grupo tratado com ACP. Quando se comparou os diferentes momentos do mesmo tratamento, o ACP apresentou aumento significativo na média dos valores de PGE₂ ($P < 0,05$) nos momentos 3 e 6 horas, retornando aos valores iniciais a partir do momento 24 horas. O grupo controle apresentou aumento significativo ($P < 0,05$) dos valores médios apenas no momento 6 horas em relação aos valores iniciais (Gráfico 15).

Gráfico 15 – Concentração média de PGE₂/ureia (pg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

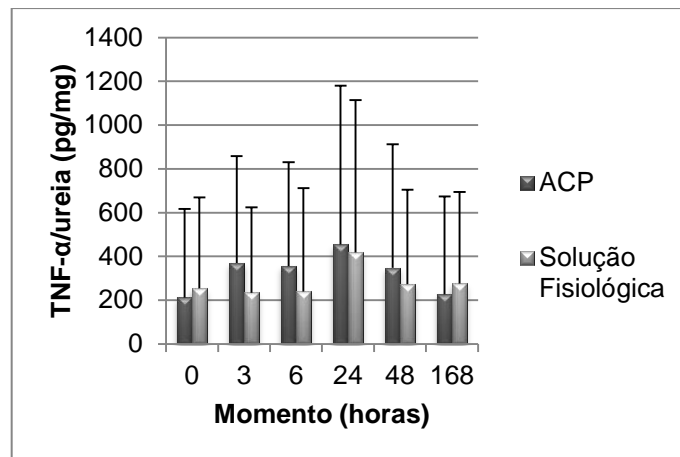


5.2.8 Determinação do TNF- α

Os dados referentes aos valores de TNF- α (pg/ml) e TNF- α /ureia (pg/mg) do LS encontram-se nos apêndices P e P' respectivamente.

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre a média dos valores de TNF- α do grupo controle e do grupo tratado com ACP. As articulações tratadas com ACP mostraram tendência à maiores concentrações de TNF- α a partir do momento 3 horas, enquanto no grupo controle a mesma tendência ocorreu no momento 24 horas (Gráfico 16).

Gráfico 16 – Concentração média de TNF- α /ureia (pg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013



5.2.9 Determinação da IL-1 β

Os dados referentes aos valores de IL-1 β (pg/ml) e IL-1 β /ureia (pg/mg) do LS encontram-se nos apêndices Q e Q' respectivamente.

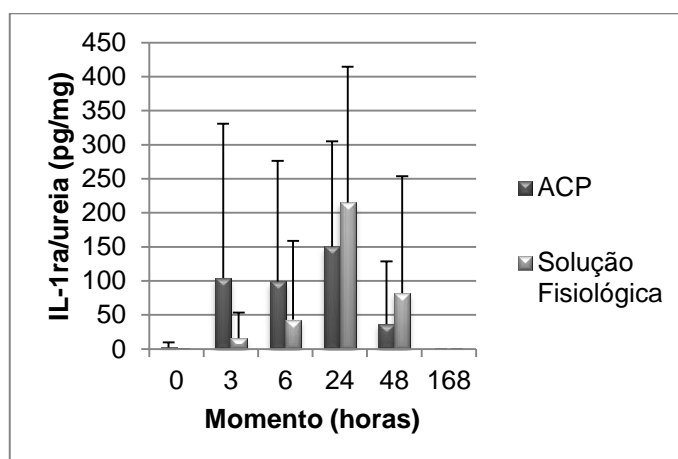
Apenas em quatro animais as concentrações de IL-1 β foram detectáveis. O animal dois (23,53 pg/mg de ureia) às 6 horas, o animal cinco (287,88 pg/mg de ureia) às 24 horas e os animais um (3,62 pg/mg de ureia) e 10 (27,32 pg/mg de ureia) às 48 horas do tratamento com ACP, enquanto não foram encontrados valores detectáveis em nenhum animal do grupo controle.

5.2.10 Determinação do IL-1ra

Os dados referentes aos valores de IL-1ra (pg/ml) e IL-1ra/ureia (pg/mg) do LS encontram-se nos apêndices R e R' respectivamente.

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre a média dos valores de IL-1ra do grupo controle e do grupo tratado com ACP. A análise entre os diferentes momentos dentro de um mesmo grupo revelou aumento significativo ($P<0,05$) das concentrações de IL-1ra às 24 horas em relação os valores iniciais tanto nas articulações tratadas com ACP quanto no grupo controle (Gráfico 17).

Gráfico 17 – Concentração média de IL-1ra/ureia (pg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013



5.2.11 Determinação dos GAGs

A identificação de GAGs no LS das articulações tratadas com ACP e solução fisiológica foi realizada por eletroforese em gel de agarose, tampão PDA, como descrito em Métodos. As figuras 3 e 4 mostram géis representativos.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs do LS coletado de articulação metacarpofalangeana durante os momentos 0, 3, 6, 24, 48 e 168 horas do tratamento com solução fisiológica. CS: CS padrão, 5 µg; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo – 2013

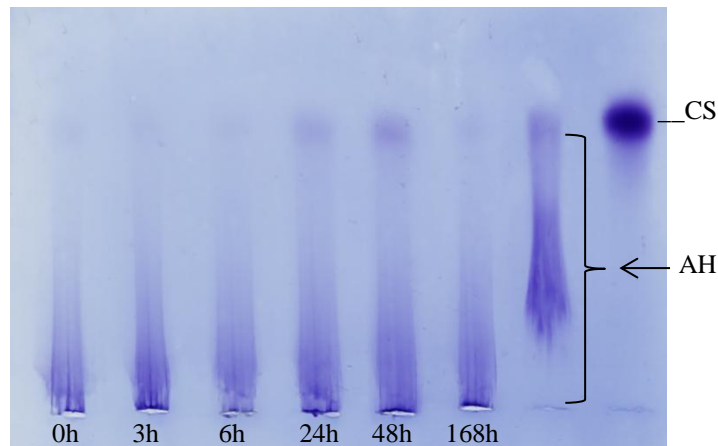
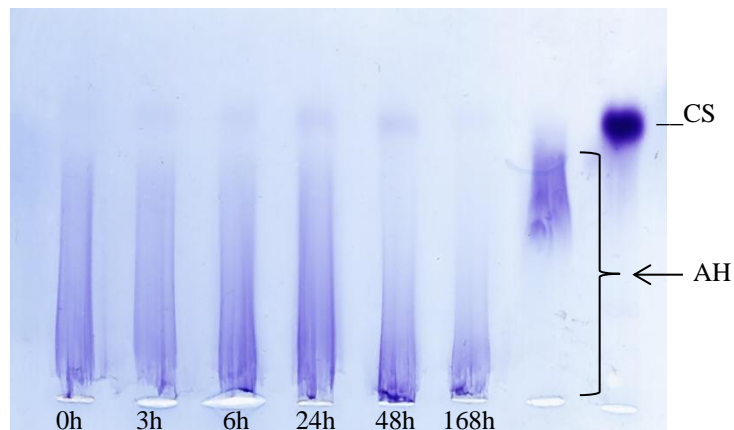


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose de GAGs do LS coletado de articulação metacarpofalangeana durante os momentos 0, 3, 6, 24, 48 e 168 horas do tratamento com ACP. CS: CS padrão, 5 µg; AH: AH padrão, 5 µg – São Paulo – 2013



Os dados referentes aos valores de AH ($\mu\text{g/ml}$), AH/ureia (mg/mg), CS ($\mu\text{g/ml}$) e CS/ureia (mg/mg) do LS encontram-se nos apêndices S, S', T e T' respectivamente.

Não houve diferença estatística significativa na média dos valores de AH entre os grupos ($P > 0,05$). Também não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os diferentes momentos de um mesmo tratamento (Gráfico 18).

Embora os valores médios de CS ($\mu\text{g/ml}$) tenham sido estatisticamente maiores ($P < 0,05$) nos momentos 3, 6 e 24 horas do grupo tratado com ACP em relação ao grupo controle, a correção com ureia (CS/ureia) acusou diferença estatística entre os tratamentos

somente às 24 horas. Dentro do grupo tratado com ACP, os valores médios de CS aumentaram significativamente ($P < 0,05$) no momento 24 horas em relação aos valores basais, retornando aos valores iniciais no momento 168 horas. O grupo controle apresentou valores médios de CS significativamente maiores ($P < 0,05$) em relação aos valores basais nos momentos 24 e 48 horas, retornando aos valores iniciais no momento 168 horas (Gráfico 19).

Gráfico 18 – Concentração média de AH/ureia (mg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

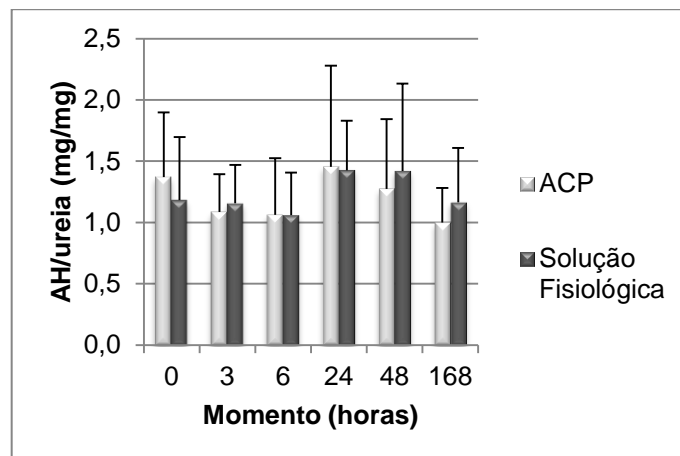
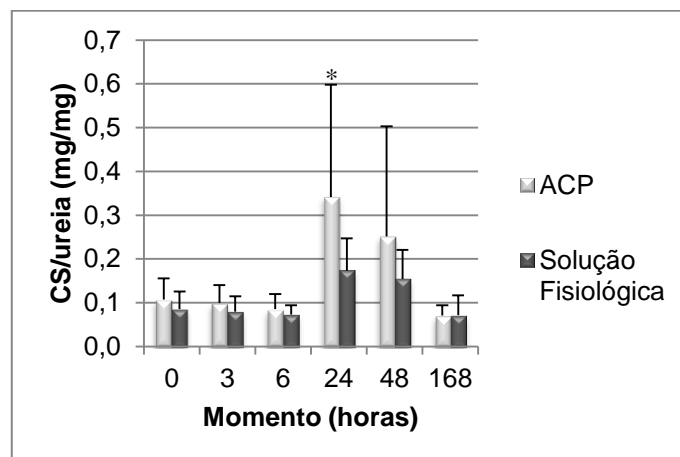


Gráfico 19 – Concentração média de CS/ureia (mg/mg) presente no LS coletado das articulações metacarpofalangeanas durante o tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013



6 DISCUSSÃO

A relevância e a frequência das osteoartropatias, bem como o prejuízo financeiro por elas ocasionado, têm estimulado o desenvolvimento de terapias cada vez mais eficientes. O uso das hemoterapias para o tratamento de doenças ortopédicas vem aumentando e se popularizando por sua eficácia e baixo custo. Diferente dos tratamentos convencionais paliativos, as hemoterapias visam a modulação do catabolismo através do bloqueio de mediadores inflamatórios nocivos, e a regeneração das estruturas lesionadas com o uso de fatores de crescimento. O ACS é um soro enriquecido obtido por métodos físico-químicos que contém citocinas anti-inflamatórias, alguns fatores de crescimento e, principalmente, o antagonista natural de IL-1, o IL-1ra (FRISBIE et al., 2007; WEHLING et al., 2007).

O caráter competitivo do IL-1ra em ocupar os receptores de IL-1 de forma dose-dependente confere a este peptídeo a capacidade de inibir especificamente as atividades desta citocina (SECKINGER et al., 1987; TEXTOR, 2011). O emprego do ACS na terapia de doenças ortopédicas humanas promove analgesia e a melhora clínica dos pacientes (SCHIFF, 2000; YANG et al., 2008; BALTZER et al., 2009; MOSER et al., 2009; DARABOS, et al., 2011; KRAUS et al., 2012), diminuindo os efeitos da sinovite (BRESNIHAN; CUNNANE, 1998) e induzindo uma resposta cicatricial (WEHLING; MOSER; REINECKE, 2009). Da mesma forma em equinos, o ACS demonstrou melhorar os parâmetros clínicos da OA pela diminuição da claudicação e das alterações na membrana sinovial (FRISBIE et al., 2007), e ainda auxiliou na regeneração de lesões musculares (WEHLING et al., 2007).

Recentemente, Hraha et al. (2011) compararam dois métodos comerciais para obtenção de ACS utilizando sangue equino, verificando que a adição de heparina antes da incubação do sangue fez aumentar a produção de IL-1ra em 1,5 vezes. Procurando maximizar a obtenção de IL-1ra no hemoderivado a ser empregado terapeuticamente, utilizamos em nosso estudo o ACP, e não o soro como a maioria dos trabalhos descritos pela literatura.

Existem poucos relatos descrevendo o potencial terapêutico do plasma, e seus efeitos benéficos têm sido atribuídos à sua atividade antioxidante e capacidade de incrementar a fagocitose pelos neutrófilos (GRÖNDAHL; JOHANNISSON; JENSEN-WAERN, 1997; SARBAN et al., 2005). Diferente do ACS, que possui essencialmente citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento (FRISBIE et al., 2007; WEHLING; MOSER; REINECKE, 2009), o plasma contém, ainda, várias imunoglobulinas e nove fatores de complemento (SWENSON, 1996; REECE, 2008), além do SLPI, componente importante da

resposta anti-inflamatória sistêmica e mediador do reparo tecidual e da cicatrização (SONG et al., 1999; GROBMYER et al., 2000; SANO, 2000).

Com o objetivo principal de acompanhar o perfil das citocinas inflamatórias em resposta à única aplicação de ACP, a coleta de LS deste estudo foi realizada através de repetidas artrocenteses em um curto intervalo de tempo. A punção articular age como estímulo mecânico ao perfurar a membrana sinovial, e provoca uma reação local pela ruptura celular que é tanto mais grave quanto menor o intervalo de tempo entre as coletas, demonstrando um efeito cumulativo do procedimento em curto prazo (VAN DEN BOOM et al., 2004). Conseqüentemente, ocorre liberação ou ativação de diversos biomarcadores envolvidos na degradação da cartilagem, alterando a composição do LS (VAN DEN BOOM et al., 2005). Por esta razão, as articulações contralaterais de cada animal foram utilizadas como controle, na tentativa de reduzir ou eliminar a interferência do procedimento durante a interpretação dos resultados (FULLER et al., 2001).

Na inflamação articular equina, nem sempre a gravidade dos sinais está relacionada com a severidade da lesão. As principais manifestações clínicas são alteração postural, como forma de poupar o membro acometido; efusão articular, acompanhada ou não de edema; hipertermia e claudicação (MCILWRAITH et al., 1979; TULAMO; BRAMLAGE; GABEL, 1989; WELCH et al., 1991; SAARI et al., 1992; HAWKINS et al., 1993; FRISBIE et al., 2008; DE GRAUW; VAN DE LEST; VAN WEEREN, 2009; ROSS et al., 2012). A avaliação convencional da dor por meio do exame de claudicação e da resposta ao teste de flexão articular consiste em uma técnica subjetiva, que muitas vezes fornece resultados clínicos e estatísticos diferentes. Visando a padronização e objetividade dos nossos resultados, utilizamos o Lameness Locator®, técnica na qual três sensores colocados sobre o animal durante a avaliação dinâmica indicam a presença, o membro de origem, a natureza e a gravidade da claudicação.

Durante nosso período experimental, tanto o grupo tratado com ACP quanto o grupo controle tiveram aumento de temperatura local acompanhado de sensibilidade à palpação, evidenciando um efeito inflamatório comum, provavelmente causado pelas artrocenteses seriadas. No entanto, a claudicação foi observada com maior frequência nas articulações que receberam ACP, conferindo um caráter mais irritante para este tratamento. As técnicas empregadas para avaliação da claudicação demonstraram semelhança e sobreposição de resultados, embora o aparelho Lameness Locator® tenha acusado a presença de claudicação leve em quatro momentos em que a avaliação subjetiva foi negativa, demonstrando a maior sensibilidade desta técnica.

O LS desempenha um papel essencial nas articulações diartrodiais, sendo responsável pela nutrição e lubrificação da cartilagem articular (STEEL, 2008). A análise físico-química do LS é capaz de fornecer informações sobre o microambiente intra-articular e, por esta razão, torna-se uma ferramenta importante no diagnóstico, tratamento e prognóstico das artropatias (VAN PELT, 1962, 1974; TEW; HOTCHKISS, 1981; ROSE; FRAUENFELDER, 1982). Em geral, as alterações no LS são decorrentes de enfermidades que modificam a permeabilidade da membrana sinovial e comprometem suas funções secretoras (TEW; HOTCHKISS, 1981; PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; STEEL, 2008).

Diversos trabalhos (VAN PELT, 1962, 1974; ROSE; FRAUENFELDER, 1982; MISHEFF; STOVER, 1991) sugerem que a coleta de LS seja realizada em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e heparina. O tubo com EDTA é indicado para evitar a formação de coágulos e preservar melhor as células, principalmente os leucócitos, enquanto o tubo com heparina é destinado à análise bioquímica do LS (STEEL, 2008). No entanto, sais de EDTA inibem a atividade de algumas enzimas e afetam a polimerização do AH, diminuindo a viscosidade e qualidade do precipitado de mucina do LS (VAN PELT, 1974). Pela disponibilidade e facilidade de acesso aos laboratórios não houve a necessidade do uso de quaisquer tipos de tubos neste estudo, e o LS foi coletado diretamente em seringa estéril de 10 ml, sendo processado e analisado imediatamente após cada coleta.

O volume de LS é diretamente proporcional ao tamanho da articulação, e pequenas variações podem existir entre membros contralaterais (VAN PELT, 1962, 1967, 1974). Articulações metacarpofalangeanas são consideradas pequenas e possuem aproximadamente 3 ml de LS (VAN PELT, 1962; VAN DEN BOOM et al., 2004; VAN DEN BOOM et al., 2005). Condições inflamatórias estimulam maiores concentrações de GAGs, aumentando a retenção de líquido intra-articular e provocando efusão (SAARI et al., 1992; ROSS et al., 2012). Embora o ACP tenha provocado maior sensibilidade articular, confirmada pela presença de claudicação, o seu caráter irritante não foi capaz de interferir no volume de LS das articulações tratadas, e a média coletada foi semelhante à média obtida por Misheff e Stover (1991) em articulações metacarpofalangeanas saudáveis.

O LS normal apresenta cor amarelo palha e aspecto límpido (VAN PELT, 1967; MCILWRAITH et al., 1979; ROSE; FRAUENFELDER, 1982; MISHEFF; STOVER, 1991; STEEL, 2008). Van Pelt (1962) analisou 83 articulações saudáveis e constatou uniformidade na cor amarelo palha e no aspecto límpido do LS. Ocasionalmente, as amostras podem apresentar uma opacidade sutil e contaminação com sangue no momento da coleta, recuperando as características originais após a centrifugação. Variações na cor do LS podem

ser observadas em casos inflamatórios e infecciosos (TULAMO; BRAMLAGE; GABEL, 1989), e a turbidez pode ocorrer pelo aumento da celularidade, geralmente associada à inflamação (STEEL, 2008).

A aplicação de ACP forneceu, em sua grande maioria, amostras de aspecto límpido e de cor amarelo ouro e vermelha. A cor amarelo ouro ocorre frente à lise dos eritrócitos e subsequente formação de bilirrubina não conjugada, e está associada com trauma crônico ou hemorragia antecedente à coleta. O LS vermelho indica a presença de sangue, consequente de hemorragia antes da aspiração ou resultado da ruptura dos capilares no momento da artrocentese (VAN PELT, 1974; STEEL, 2008). Uma vez que o grupo controle tenha apresentado cor amarelo palha na maioria de suas amostras, podemos minimizar a interferência da artrocentese e sugerir a hemorragia como consequência de uma sinovite (MCILWRAITH et al., 1979) provocada pela aplicação de ACP.

O LS normal geralmente não coagula, embora algumas amostras de articulações pequenas possam sofrer tixotropia devido à grande proporção de AH no plasma (VAN PELT, 1962, 1974; STEEL, 2008). A contaminação iatrogênica com sangue, quadros de hemartrose ou, ainda, alta concentração de proteína total no LS podem provocar a coagulação da amostra (MCILWRAITH et al., 1979; STEEL, 2008). Van Pelt (1967) observou tixotropia em amostras de animais saudáveis que foram resfriadas a 5°C, retornando ao seu estado inicial após ligeira homogeneização, semelhante aos resultados do nosso estudo, no qual algumas amostras coagularam após centrifugação a 4°C, retornando ao estado líquido mediante agitação suave.

A viscosidade do LS é característica da presença de AH, e sua qualidade esta diretamente relacionada à concentração e estrutura deste componente (KORENEK et al., 1992; TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1995). A avaliação subjetiva da viscosidade ocorre pela observação do comprimento do fio formado a partir de uma gota colocada entre o polegar e o indicador. Normalmente, o fio tem de 2,5 a 5 cm de comprimento antes de quebrar (STEEL, 2008). Mensurações menores podem ocorrer em quadros de efusão - pela diluição, ou sinovite, pela redução da síntese ou polimerização incompleta do AH (MCILWRAITH et al., 1979; TEW; HOTCHKISS, 1981; STEEL, 2008). O teste da qualidade do precipitado de mucina reflete o índice de polimerização do AH e fornece uma análise qualitativa de sua concentração no LS (VAN PELT, 1962). A qualidade do coágulo formado pode ser alterada por processos inflamatórios e sépticos (VAN PELT, 1962, 1974; MCILWRAITH et al., 1979; TEW; HOTCHKISS, 1981; TULAMO; BRAMLAGE; GABEL, 1989).

A viscosidade e a qualidade do precipitado de mucina variam de maneira inversamente proporcional ao tamanho da articulação e ao volume de LS (VAN PELT, 1962, 1967). No entanto, teorias mais recentes defendem a ideia de que não existem diferenças entre as articulações, e que apenas a tensão de cisalhamento pode alterar a viscosidade do LS (KORENEK et al., 1992; LUMSDEN et al., 1996). Em condições patológicas, a presença de material celular e cartilaginoso pode influenciar a viscosidade, e por esta razão, é indicado centrifugar a amostra antes de qualquer avaliação (VAN PELT, 1967; TEW; HOTCHKISS, 1981; LUMSDEN et al., 1996). Tendo nosso estudo utilizado animais clinicamente saudáveis, a avaliação da viscosidade foi realizada de forma subjetiva com o LS *in natura*, enquanto o teste do precipitado de mucina foi realizado com o sobrenadante das amostras após centrifugação. Não foram observadas alterações significativas na viscosidade e na qualidade dos grumos durante os tratamentos, sugerindo que tanto a artrocentese quanto o ACP não foram capazes de afetar a concentração e a estrutura do AH sinovial. Ao contrário do que sugeriu Van Pelt (1967), não houve relação entre a diminuição da viscosidade e a piora na qualidade do precipitado de mucina em nosso experimento.

A contagem total de leucócitos no LS normal em equinos não ultrapassa 500 células/ μ l, sendo 90% mononucleares e 10% polimorfonucleares (VAN PELT, 1962; KORENEK et al., 1992; MCILWRAITH; TROTTER, 1996; CÉLESTE et al., 2005; STEEL, 2008). A concentração de leucócitos é variável entre as diferentes articulações (ADAIR et al., 1991), e especificamente na metacarpofalangeana, a média é de 390 células/ μ l (LIBERG; MAGNUSSON; SCHOUGAARD, 1977). Doenças articulares de origem inflamatória ou infecciosa provocam aumento na contagem de leucócitos totais e no número relativo de polimorfonucleares do LS (TEW; HOTCHKISS, 1981; TULAMO; BRAMLAGE; GABEL, 1989; WELCH et al., 1991; HAWKINS et al., 1993; FRISBIE et al., 2007). Ainda, foi observado que em articulações inflamadas a atividade física também incrementa a contagem leucocitária (BILLINGHURST; FRETZ; GORDON, 1995). Contraditoriamente, o aumento do número de leucócitos totais nas articulações inflamadas observada por Gibson, Hodge e Whitem (1996) e Mcilwraith et al. (1979) não foi estatisticamente significativa, e por esta razão estes autores consideram esta, uma análise de pouco significado, exceto para casos suspeitos de artrite séptica ou neoplasia.

Durante as primeiras oito horas, o LS de uma articulação inflamada apresenta valores máximos de leucócitos e polimorfonucleares acompanhados de picos nas concentrações de PGE₂, substância P e bradicinina, bem como aumento na atividade das MMPs (DE GRAUW; VAN DE LEST; VAN WEEREN, 2009; ROSS et al., 2012) e de IL-6 (HAWKINS et al.,

1993). O incremento no número de leucócitos totais e no percentual de polimorfonucleares observado em modelos de OAE induzida experimentalmente também ocorreu em nosso estudo, no LS das articulações tratadas com ACP em relação ao grupo controle.

A artrocentese e coleta de LS são utilizadas tanto para o diagnóstico quanto para a medicação e acompanhamento da resposta ao tratamento. Em equinos, a artrocentese é um procedimento relativamente simples, no qual a assepsia é imprescindível para evitar a contaminação, tanto da articulação quanto da amostra (STEEL, 2008). Em situações nas quais a coleta de LS é dificultada, é comum a injeção de solução fisiológica para recuperar o conteúdo intra-articular. A presença de efusão articular, por outro lado, facilita a coleta, embora a diluição dela decorrente deva ser considerada durante a análise da amostra.

Nos casos onde haja diluição do LS, seja ela fisiológica ou iatrogênica, a concentração de ureia da amostra pode ser usada como fator de correção. A ureia é uma molécula pequena que se difunde facilmente entre os fluidos corporais, e por esta razão sua concentração no LS é semelhante à sua concentração no soro, e a mesma para as diferentes articulações de um mesmo indivíduo (GOUGH; MUNROE; MAYHEW, 2002). Os valores médios de ureia obtidos em nosso estudo foram inferiores aos descritos por Gough, Munroe e Mayhew (2002), porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Os valores de ureia foram utilizados em nosso experimento para a correção dos valores de proteína total, PGE₂, TNF- α , IL-1, IL-1ra, AH e CS.

A quantidade de proteína total influencia diretamente a viscosidade do LS. A concentração de proteína no LS corresponde aproximadamente a 30% da concentração de proteína plasmática (STEEL, 2008), e em cavalos saudáveis, valores até 25 mg/ml são considerados normais para a espécie (VAN PELT, 1974; LIBERG; MAGNUSSON; SCHOUGAARD, 1977; TEW; HOTCHKISS, 1981; MISHEFF; STOVER, 1991; KORENEK et al., 1992; CÉLESTE et al., 2005). No entanto, diversos estudos (MCILWRAITH et al., 1979; TULAMO; BRAMLAGE; GABEL, 1989; WELCH et al., 1991; SAARI et al., 1992; HAWKINS et al., 1993; PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; FRISBIE et al., 2007; FRISBIE et al., 2008; STEEL, 2008; DE GRAUW; VAN DE LEST; VAN WEEREN, 2009; CARMALT et al., 2011; ROSS et al., 2012) têm relatado aumento na concentração total de proteína sinovial mediante enfermidades inflamatórias, infecciosas ou traumáticas, e tal fato ocorre devido ao aumento da permeabilidade capilar, que permite a passagem de proteínas de alto peso molecular para o espaço intra-articular (VAN PELT, 1967; BILLINGHURST; FRETZ; GORDON, 1995; STEEL, 2008). Uma vez que os valores de proteína total podem ser alterados por diversas enfermidades e pela presença de eritrócitos (GIBSON; HODGE;

WHITTEM, 1996; STEEL, 2008; SANCHEZ TERAN et al., 2012), os resultados devem ser avaliados juntamente com outros parâmetros, a fim de determinar a etiologia da doença (TULAMO; BRAMLAGE; GABEL, 1989).

O plasma, como dito anteriormente, é composto entre outros fatores por frações proteicas, sendo o incremento das concentrações fisiológicas após sua utilização nas transfusões sanguíneas um fato documentado (MCTAGGART; PENHALE; RAIDAL, 2005). Assim, como esperado, as articulações que receberam ACP apresentaram aumento significativo, porém transitório, da proteína no LS em relação ao grupo controle, atingindo valores médios semelhantes aos descritos em doenças inflamatórias agudas graves (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; STEEL, 2008). A mesma média de valores também foi descrita por Tulamo, Bramlage e Gabel (1989) em um modelo de artrite séptica induzida experimentalmente. Por outro lado, os valores de proteína descritos por Gibson, Hodge e Whitem (1996) para doenças articulares foram semelhantes aos valores médios do grupo controle do nosso estudo. Um estudo realizado por Carmalt et al. (2011), entretanto, apresentou resultados contraditórios ao descrever maiores concentrações de proteínas sinoviais nas articulações metacarpofalangeanas do grupo controle, e não do grupo inflamado como era o esperado.

O metabolismo normal de uma articulação saudável é baseado no equilíbrio entre anabolismo e catabolismo de todos os seus componentes. Os mediadores envolvidos e os produtos gerados a partir da solicitação de todos os componentes articulares servem como indicadores, tanto de processos fisiológicos, quanto de eventos que possam ter sede na articulação. Estes marcadores e produtos são utilizados para diagnóstico, acompanhamento e tratamento das diversas enfermidades ortopédicas. Podem ser classificados em biomarcadores diretos, quando originados dos componentes articulares, ou indiretos, quando influenciam o metabolismo tecidual e integridade da matriz (MCILWRAITH, 2005).

A PGE_2 é considerada o mediador inflamatório mais importante encontrado em exsudatos inflamatórios, e é classificada como um biomarcador indireto (MCILWRAITH, 2005). No LS, a PGE_2 é produzida principalmente pela membrana sinovial e atua depressindo a síntese de PGs pelos condrócitos e acelerando a perda de GAGs pela cartilagem articular, aumentando a destruição e diminuindo a reparação da cartilagem (GIBSON; HODGE; WHITTEM, 1996). Segundo a literatura, traumas, inflamação e doenças degenerativas levam a um aumento nas concentrações de PGE_2 do LS, diretamente proporcional à extensão da lesão (HAWKINS et al., 1993; GIBSON; HODGE; WHITTEM, 1996; KIRKER-HEAD et

al., 2000; FRISBIE et al., 2007; FRISBIE et al., 2008; DE GRAUW; VAN DE LEST; VAN WEEREN, 2009; ROSS et al., 2012).

As articulações que receberam ACP apresentaram aumento significativo nos valores médios de PGE₂ em relação ao grupo controle. Modelos de sinovite e OAE induzidas experimentalmente têm demonstrado o aumento nas concentrações de PGE₂ em relação ao grupo controle durante as primeiras 24 horas (HAWKINS et al., 1993; ROSS et al., 2012), mimetizando o comportamento dos eicosanóides nas doenças articulares (GIBSON; HODGE; WHITTEM, 1996). Aumento das concentrações de substância P ocorre simultaneamente ao aumento dos valores médios de PGE₂ (KIRKER-HEAD et al., 2000; DE GRAUW; VAN DE LEST; VAN WEEREN, 2009), contribuindo para o agravamento da inflamação local. Frisbie et al. (2008) relataram, ainda, um aumento de PGE₂ em resposta ao exercício, confirmando a teoria de que no cavalo atleta valores superiores aos dos animais sedentários são comuns (CANTLEY et al., 1999; SCHLUETER; ORTH, 2004a; BOLAM et al., 2006; KAWCAK et al., 2008).

A membrana sinovial é uma importante fonte de liberação direta de substâncias nocivas à cartilagem, entre elas, citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1, e quando inflamada, contribui para a degradação da matriz da cartilagem (SCANZELLO; GOLDRING, 2012). Enquanto a atividade física não é capaz de exercer qualquer tipo de influência nos valores de TNF- α do LS de articulações normais (VAN DEN BOOM et al., 2004), cavalos atletas com doenças articulares apresentam maiores concentrações desta citocina nas primeiras 12 horas após o exercício, destacando o papel deste mediador nas respostas inflamatórias agudas (BILLINGHURST; FRETZ; GORDON, 1995).

A análise individual de cada enfermidade articular demonstra que a efusão presente em quadros de sinovite é capaz de reduzir as concentrações de TNF- α por efeito da diluição, mas não interfere na relação positiva entre a citocina e a quantidade de leucócitos (BILLINGHURST; FRETZ; GORDON 1995). Já os modelos de sinovites induzidas experimentalmente por Hawkins et al. (1993); Hawkins et al. (1995) e Carmalt et al. (2011) apontaram o TNF- α como uma das primeiras citocinas a ser secretada, atingindo valores máximos poucas horas depois do insulto, seguido por aumento nas concentrações de IL-6 e IL-1, respectivamente. De forma semelhante, nosso trabalho apresentou tendência a maiores concentrações de TNF- α nas articulações que receberam ACP após 3 horas de sua aplicação. O grupo controle também apresentou tendência ao aumento de TNF- α mas de forma mais tardia, às 24 horas, provavelmente em resposta ao efeito inflamatório das artrocenteses seriadas.

Curiosamente, a análise comparativa entre o LS de articulações saudáveis e doentes realizada por Billingham, Fretz e Gordon (1995) não apontou diferença significativa nas concentrações de TNF- α , embora as amostras doentes tenham apresentado maiores valores de proteína total e leucócitos. Assim, a presença de TNF- α no LS de articulações com OA nem sempre está relacionada com a extensão da lesão, evidenciando a baixa especificidade deste biomarcador (JOUGLIN et al., 2000; LEY et al., 2007).

Os diferentes padrões de lesões teciduais observados nas mais diversas doenças articulares indicam que inúmeros mediadores estão envolvidos na evolução de cada enfermidade (ALWAN et al., 1991b). Na OAE, a principal citocina a induzir a síntese de enzimas e mediadores inflamatórios é a IL-1 β (MCILWRAITH, 2010), detectada em altas concentrações no LS das articulações doentes (MORRIS et al., 1990; ALWAN et al., 1991b; FENTON et al., 2002). Devido à extrema afinidade da IL-1 β pelos seus receptores de membrana, apenas uma pequena quantidade da citocina é necessária para o desencadeamento de uma resposta, sendo sua atividade máxima observada com menos de 5% dos receptores ocupados (AREND, 1990; AREND et al., 1990; AREND, 1991; DINARELLO, 1996; BRESNIHAN; AREND et al., 1998; CUNNANE, 1998; AREND; GUTHRIDGE, 2000).

A IL-1 β modula a expressão de várias citocinas pro-inflamatórias como IL-6 e interleucina 8 (IL-8), além da própria IL-1 β (DAVID et al., 2007). Participa na degradação da MEC da cartilagem articular através da ativação de MMP e agreganases, além de estimular a liberação de PGE₂ e NO e diminuir a expressão de agregam e colágeno tipo I e II (FENTON et al., 2002; GREGG et al., 2006; MCILWRAITH 2010; LEY et al., 2011). Ainda, é capaz de degradar cerca de 51% dos GAGs presentes na cartilagem (FENTON et al., 2002; DECHANT et al., 2005), aumentando sua concentração média no LS dentro de 96 horas (GREGG et al., 2006). Em nosso estudo, o fato da maioria dos animais terem apresentado concentrações abaixo da capacidade de detecção pelo teste pode ser devido às baixas quantidades desta citocina em articulações normais, mesmo após infiltração com ACP ou solução fisiológica. Algumas articulações, no entanto, apresentaram valores detectáveis de IL-1 β no LS durante o tratamento com ACP.

O equilíbrio entre a produção de IL-1 e seu antagonista IL-1ra é fundamental para a limitação de doenças. A ocorrência fisiológica de IL-1ra demonstra que o organismo monta sua própria resposta de defesa, e a síntese deste peptídeo é parte natural deste processo (ALWAN et al., 1991b; DINARELLO; THOMPSON, 1991; FISCHER et a., 1992; AREND et al., 1998; AREND; GUTHRIDGE, 2000; HORAI et al., 2000).

O IL-1ra é uma proteína de fase aguda produzida por alguns tecidos durante enfermidades infecciosas ou inflamatórias, agudas ou crônicas (AREND, 1990; GRANOWITZ et al., 1991; AREND et al., 1998; MEIJER et al., 2003; WEHLING; MOSER; REINECKE, 2009). Granowitz et al. (1991) induziram a toxemia em pacientes humanos e observaram que o pico de IL-1ra foi cerca de 100 vezes maior que o pico de IL-1 β . No estudo, a concentração de IL-1 β começou subir 1 hora depois do estímulo e atingiu seu pico às 2 horas, retornando aos valores iniciais entre 6 e 12 horas. Já as concentrações de IL-1ra começaram aumentar 2 horas após o estímulo, atingiram valores máximos no intervalo de tempo entre as 3 e 6 horas e permaneceram detectáveis até 24 horas depois, sugerindo que sua produção é estimulada pela citocina pró-inflamatória IL-1. De acordo com Fischer et al. (1992), a produção do antagonista IL-1ra plasmático é diretamente proporcional a magnitude da inflamação ou infecção.

O estudo na espécie equina realizado por Hawkins et al. (1995) forneceu resultados similares aos encontrados em humanos (GRANOWITZ et al., 1991) e primatas (FISCHER et al., 1992) ao descrever a atividade máxima de IL-1ra após 24 horas da injeção intra-articular de toxina, em um modelo de sinovite induzida experimentalmente. Da mesma forma, em nosso trabalho, notamos aumento significativo do IL-1ra às 24 horas em relação aos valores iniciais, tanto no LS das articulações tratadas com ACP quanto no grupo controle. Nossos resultados confirmam a teoria de que este antagonista natural aumenta frente aos estímulos inflamatórios, que neste caso, podem ser atribuídos às várias artrocenteses seriadas realizadas em curto intervalo de tempo.

Curiosamente, as articulações que receberam o ACP demonstraram tendência a maiores concentrações de IL-1ra em relação aos valores iniciais imediatamente após sua aplicação, às 3 horas, ao contrário da resposta fisiológica do organismo, observada no grupo controle às 24 horas. O aparecimento precoce de maiores concentrações de IL-1ra no LS destas articulações pode ser explicado pelos resultados de Hraha et al. (2011). Estes autores demonstraram que a incubação do sangue a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas fez aumentar as concentrações de IL-1ra no soro, mais intensamente com adição de heparina antes da incubação. Este anticoagulante cresceu em 1,5 vezes a concentração de IL1ra, tornando o ACP uma fonte exógena desta proteína antagonista mais potente que o ACS.

Os GAGs são considerados biomarcadores diretos do metabolismo da cartilagem articular (MCILWRAITH, 2005). O AH é um GAG não sulfatado de alto peso molecular, normalmente presente na matriz da cartilagem articular e no LS. Segundo Tulamo, Heiskanen

e Salonen (1995) a concentração de AH diminui apenas em doenças infecciosas e degenerativas. Fuller et al. (2001) descreveram menores concentrações de AH no LS de articulações equinas com OA, mas não observaram nenhuma relação entre sua concentração e os danos na cartilagem articular. De acordo com Tew e Hotchkiss (1981) menores concentrações de AH induzem piora no teste de qualidade do precipitado de mucina em casos de sinovite aguda. A redução nas concentrações de AH refletem a presença de hialuronidase ou EROs, mas também podem indicar menor produção pelos sinoviócitos (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995).

Aumento nas concentrações de AH foi descrito por Welch et al. (1991) em resposta à sinovite induzida quimicamente, porem os autores não observaram diferença significativa entre o grupo inflamado e o grupo controle. Tulamo, Heiskanen e Salonen (1995) não observaram diferença entre as concentrações de AH no LS de articulações saudáveis e doentes. Também não relacionaram a concentração de AH com as variáveis inflamatórias, como proteína e leucócitos totais, ou presença de claudicação. Da mesma forma, Palmer, Bertone e McClain (1995) não relataram diferença entre as concentrações de AH no LS de articulações com OA e articulações normais, nem encontraram relação entre a concentração de AH e a qualidade do precipitado de mucina. À semelhança de tais resultados, nosso estudo também não apresentou diferença estatística significativa nas concentrações de AH entre os tratamentos, assim como não houve qualquer relação entre valores de AH e qualidade do precipitado de mucina, ainda que alguns animais tenham apresentado menor concentração de AH ao mesmo tempo em que houve piora na qualidade do grumo.

Durante a inflamação, a redução da síntese da macromolécula de AH e aumento da secreção de um AH polimerizado parcialmente ocorrem devido à presença de EROs, liberadas por leucócitos polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos, durante o *burst* respiratório (TULAMO; HEISKANEN; SALONEN, 1995). Desta forma, ocorre uma diminuição da função do AH sem que haja alteração em sua concentração (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995). Apesar do ACP não ter demonstrado qualquer influencia sobre o AH, como visto pela boa qualidade do precipitado de mucina, manutenção da viscosidade e de sua concentração no LS, este GAG, aparentemente, não é o melhor marcador para o diagnóstico de doenças articulares.

Maiores concentrações de GAGs podem ocorrer tanto por estímulo da síntese quanto por estímulo da degradação, cabendo aos biomarcadores específicos de cada processo auxiliar a determinação da causa certa (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995; MCILWRAITH, 2005; ROSS et al., 2012). O CS é o principal contribuinte para o aumento das concentrações

de GAGs sulfatados em doenças articulares, e sua dosagem é utilizada para diagnósticos precoces, nos quais ainda não existam alterações radiográficas (PALMER; BERTONE; MCCLAIN, 1995). A capacidade que o CS tem em inibir o NFκ-β diminui, conseqüentemente, a produção de peptídeos pró-inflamatórios, quimiocinas, PGE₂, MMPs e NO (DAVID et al., 2007), atribuindo a este peptídeo uma ação anti-inflamatória (VOLPI, 2011).

O método de DMB, que quantifica GAGs, é um dos métodos mais difundidos para avaliação da degradação da MEC da cartilagem (FRISBIE et al., 2008). Empregando este método, Alwan et al. (1991a); Palmer, Bertone e McClain (1995); Frisbie et al. (2007); Frisbie et al. (2008) e Ross et al. (2012) relataram o aumento na concentração de GAGs totais no LS de cavalos com OA. Ainda, De Grauw, Van De Lest e Van Weeren (2009) observaram que o aumento nos valores de GAG em articulações inflamadas é acompanhado por maiores concentrações de proteína total, PGE₂, substância P, bradicinina e MMPs. Sob efeito do ACP, foi observado aumento nas concentrações de CS às 24 horas em relação ao grupo controle. A avaliação individual de cada grupo revelou que ambos responderam rapidamente aumentando as concentrações de CS às 24 horas. Dado o curto intervalo de tempo, acreditamos se tratar de um processo catabólico e não anabólico, com a destruição da MEC por ação das MMPs, provavelmente decorrente da inflamação provocada pelas artrocenteses.

A aplicação intra-articular de diferentes princípios anti-inflamatórios como dimetilsulfóxido (DMSO) o tem sido relatada em articulações híidas para melhor entendimento de sua atividade na fisiologia articular. O DMSO é capaz de eliminar os radicais livres e suprimir a produção de prostaglandinas. Sua aplicação em articulações saudáveis aumentou a concentração de proteína e a contagem de leucócitos, predominantemente de neutrófilos, no LS. Ainda, provocou discreta hiperplasia e infiltrado inflamatório na membrana sinovial (WELCH; DEBOWES; LIEPOLD, 1989; ADAIR et al., 1991). O bufexamaco é um anti-inflamatório que inibe a conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas e tromboxanos, e quando aplicado em articulações normais provocou efusão transitória, variação na cor e aspecto das amostras coletadas e aumento de proteínas e leucócitos totais, principalmente neutrófilos, no LS. Assim como o DMSO, também provocou um discreto infiltrado inflamatório na membrana sinovial (SUOMINEN et al., 2001). A orgoteína, denominação genérica da enzima superóxido desmutase sintética/ exógena (SOD), tem como função catalisar a neutralização de radicais livres, tendo um efeito anti-inflamatório sobre as células. Sua administração nas articulações equinas híidas provocou efusão e

claudicação transitórias, alterou a cor e aparência de algumas amostras e aumentou a quantidade de proteína e neutrófilos (WAGNER; MCILWRAITH; MARTIN, 1982).

Em relação a outros produtos testados para uso intra-articular, Bertone et al. (1986) observaram que a lavagem articular com iodopovidona e clorexidine em diferentes diluições provocou sinovite, mais grave quanto mais concentrada a solução, sugerindo que o potencial irritante destas substâncias varia de maneira diretamente proporcional à sua osmolalidade. Uma vez que o incremento do antagonista IL-1ra e das citocinas anti-inflamatórias aumentam a osmolalidade do ACP em relação ao LS, podemos sugerir que sua administração em articulações hígidas promova irritação local transitória, da mesma forma que os anti-sépticos citados anteriormente.

7 CONCLUSÃO

O ACP possui efeito pró-inflamatório transitório em articulações hígidas caracterizado por claudicação, aumento de proteína total, células nucleadas, PGE₂ e CS no LS.

A análise física do LS e as concentrações de AH não são capazes de identificar a resposta inflamatória induzida pelo ACP.

REFERÊNCIAS

ADAIR, H. S.; GOBLE, D. O.; VANHOOSER, S.; BLACKFORD, J. T. Evaluation of use of dimethylsulfoxide for intra-articular lavage in clinically normal horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 2, p. 333-336, 1991.

ALWAN, W. H.; CARTER, S. D.; BENNETT, D.; EDWARDS, G. B. Glycosaminoglycans in horses with osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 1, p. 44-47, 1991a.

ALWAN, W. H.; CARTER, S. D.; DIXON, J. B.; BENNETT, D.; MAY, S. A.; EDWARDS, G. B. Interleukin-1like activity in synovial fluids and sera of horses with arthritis. **Research in Veterinary Science**, v. 51, n. 1, p. 72-77, 1991b.

ARAI, K.; MISUMI, K.; CARTER, S. D.; SHINBARA, S.; FUJIKI, M.; SAKAMOTO, H. Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) degradation and synthesis in equine joint disease. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 1, p. 31-36, 2005.

ARAI, K.; TAGAMI, M.; HATAZOE, T.; NISHIMATSU, E.; SHIMIZU, Y.; FUJIKI, M.; MISUMI, K. Analysis of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in synovial fluid, serum and urine from 51 racehorses with carpal bone fracture. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 70, n. 9, p. 915-921, 2008.

AREND, W. P.; JOSLIN, F. G.; THOMPSON, R. C.; HANNUM, C. An IL-1 inhibitor from human monocytes. Production and characterization of biologic properties. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 6, p. 1851-1858, 1989.

AREND, W. P.; WELGUS, H. G.; THOMPSON, R. C.; EISENBERG, S. P. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. **Journal clinical Invest**, v. 85, n. 5, p. 1684-1697, 1990.

AREND, W. P. Interleukin-1 receptor antagonist: Discovery, structure and properties. **Progress in growth factor research**, v. 2, n. 4, p. 193-205, 1990.

AREND, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist: a new member of the interleukin 1 family. **The journal of clinical investigation**, v. 88, n. 5, p. 1445-1451, 1991.

AREND, W. P.; MALYAK, M.; GUTHRIDGE, C. J.; GABAY, C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. **Annual review of immunology**, v. 16, p. 27-55, 1998.

AREND, W. P.; GUTHRIDGE, C. J. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 59, p. 60-64, 2000. Supplement, 1.

ARDEN, N.; COOPER, C. **Osteoarthritis handbook**. Abingdon: Taylor & Francis, 2006.

ASBURY, A. C. Uterine defense mechanisms in the mare: the use of intrauterine plasma in the management of endometritis. **Theriogenology**, v. 21, n. 2, p. 387-393, 1984.

BALAVOINE, J. F.; ROCHEMONTEIX, B.; WILLIAMSON, K.; SECKINGER, P.; CRUCHAUD, A.; DAYER, J. M. Prostaglandin E₂ and collagenase production by fibroblasts and synovial cells is regulated by urine-derived human interleukin 1 and inhibitor(s). **Journal of clinical investigation**, v. 78, n. 4, p. 1120-1124, 1986.

BALTZER, A. W. A.; MOSER, C.; JANSEN, S. A.; KRAUSPE, R. Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n. 2, p. 152-160, 2009.

BERTONE, A. L.; MCILWRAITH, C. W.; POWERS, B. E.; RADIN, JUDITH RADIN, M. Effect of four antimicrobial lavage solutions on the tarsocrural joint of horses. **Veterinary Surgery**, v. 15, n. 4, p. 305-315, 1986.

BILLINGHURST, R. C.; FRETZ, P. B.; GORDON, J. R. Induction of intra-articular tumor necrosis factor during acute inflammatory responses in equine arthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 27, n. 3, p. 208-216, 1995.

BOLAM, C. J.; HURTING, M. B.; CUZ, A.; MCEWEN, J. E. Characterization of experimentally induced post-traumatic osteoarthritis in the medial femorotibial joint of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 3, p. 433-447, 2006.

BONNET, C. S.; WALSH, D. A. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. **Rheumatology**, v. 44, n. 1, p. 7-16, 2005.

BRAMA, P. A. J.; TEKOPPELE, J. M.; BEEKMAN, B.; VAN WEEREN, P. R.; BARNEVELD, A. Matrix metalloproteinase activity in equine synovial fluid: influence of age, osteoarthritis, and osteochondrosis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 57, p. 697-699, 1998.

BRAMA, P. A. J.; BOOM, R.; DEGROOT, J.; KIERS, G. H.; VAN WEEREN, P. R. Collagenase-1 (MMP-1) activity in equine synovial fluid: influence of age, joint pathology, exercise and repeated arthrocentesis. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 1, p. 34-40, 2004.

BRESNIHAN, B.; CUNNANE, G. Interleukin-1 receptor antagonist. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 24, n. 3, p. 615-628, 1998.

BROMMER, H.; LAASANEN, M. S.; BRAMA, P. A. J.; VAN WEEREN, P. R.; HELMINEN, H. J.; JURVELIN, J. S. Functional consequences of cartilage degeneration in the equine metacarpophalangeal joint: quantitative assessment of cartilage stiffness. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 5, p. 462-467, 2005.

BROSSI, P. M.; BACCARIN, R.; Y.; A.; MASSOCO, C. O. Os componentes do sangue afetam a produção de (ERO) pelas células sinoviais de equinos in vitro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1355-1360, 2012.

CANTLEY, C. E. L.; 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.

CARMALT, J. L.; BELL, C. D.; TATARNIUK, D. M.; SURI, S. S.; SINGH, B.; WALDNER, C. Comparison of the response to experimentally induced short-term inflammation in the temporomandibular and metacarpophalangeal joints of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 12, p. 1586-1591, 2011.

CARON, J. P. Osteoarthritis. In: ROSS, M. W.; DYSON, S. J. **Diagnosis and management of lameness in the horse**. Philadelphia: Saunders Company, 2003. p. 572-594.

CARTER, D. B.; DEIBEL JR, M. R.; DUNN, C. J.; TOMICH, C. S. C.; LABORDE, A. L.; SLIGHTOM, J. L.; BERGER, A. E.; BIENKOWSKI, M. J.; SUN, F. F.; MCEWAN, R. N.; HARRIS, P. K.; W.; YEM, A. W.; WASZAK, G. A.; CHOSAY, J. G.; SIEU, L. C.; HARDEE, M. M.; ZURCHER-NEELY, H. A.; REARDON, I. M.; HEINRIKSON, R. L.; TRUESDELL, S. E.; SHELLY, J. A.; EESSALU, T. E.; TAYLOR, B. M.; TRACEY, D. E. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. **Nature**, v. 344, n. 6267, p. 633-639, 1990.

CASSATELLA, M. A.; MEDA, L.; GASPERINI, S.; CALZETTI, F.; BONORA, S. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 5, p. 1695-1699, 1994.

CATTERALL, J. B.; HSUEH, M. F.; STABLER, T. V.; MCCUDDEN, C. R.; BOLOGNESI, M.; ZURA, R.; JORDAN, J. M.; RENNER, J. B.; FENG, S.; KRAUS, V. B. Protein modification by deamidation indicates variations in joint extracellular matrix turnover. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4640-4651, 2012.

CÉLESTE, C.; IONESCU, M.; POOLE, A. R.; LAVERTY, S. Repeated intraarticular injections of triamcinolone acetonide alter cartilage matrix metabolism measured by biomarkers in synovial fluid. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 23, n. 3, p. 602-610, 2005.

CHIARADIA, E.; PEPE, M.; TARTAGLIA, M.; SCOPPETTA, F.; D'AMBROSIO, C.; RENZONE, G.; AVELLINI, L.; MORICONI, F.; GAITI, A.; BERTUGLIA, A.; BECCATI, F.; SCALONI, A. Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4478-4493, 2012.

CLUTTERBUCK, A. L.; HARRIS, P.; ALLAWAY, D.; MOBASHERI, A. Matrix metalloproteinases in inflammatory pathologies of the horse. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 1, p. 27-38, 2010.

DARABOS, N.; HASPL, M.; MOSER, C.; DARABOS, A.; BARTOLEK, D. Intraarticular application of autologous conditioned serum (ACS) reduces bone tunnel widening after ACL reconstructive surgery in a randomized controlled trial. **Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy**, v. 19, p. 36-46, 2011. Supplement, 1.

DAVID, F.; FARLEY, J.; HUANG, H.; LAVOIE, J. P.; LAVERTY, S. Cytokine and chemokine gene expression of IL-1 β stimulated equine articular chondrocytes. **Veterinary Surgery**, v. 36, n. 3, p. 221-227, 2007.

DECHANT, J. E.; BAXTER, G. M.; FRISBIE, D. D.; TROTTER, G. W.; MCILWRAITH, C. W. Effects of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulphate, alone and in combination, on normal and interleukin-1 conditioned equine articular cartilage explant metabolism. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 227-231, 2005.

DE GRAUW, J. C.; VAN DE LEST, C. HA; VAN WEEREN, P. R. Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after a single inflammatory insult: a longitudinal experimental study. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 2, p. 1-8, 2009.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. C. Electrophoretic behavior of acid mucopolysaccharides in diamine buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

DINARELLO, C. A.; THOMPSON, R. C. Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*. **Immunology Today**, v. 12, n. 11, p. 404-410, 1991.

DINARELLO, C. A.; WOLFF, S. M. The role of interleukin-1 in disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 2, p. 106-113, 1993.

DINARELLO, C. A. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. **The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 8, n. 15, p. 1314-1325, 1994.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DINARELLO, . The role of the interleukin-1 receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 10, p. 732-734, 2000.

FENTON, J. I.; CHLEBEK-BROWN, K. A.; CARON, J. P.; ORTH, M. W. Effect of glucosamine on interleukin-1-conditioned articular cartilage. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 219-223, 2002. Supplement.

FISCHER, E.; VAN ZEE, K. J.; MARANO, M. A.; ROCK, C. S.; KENNEY, J. S.; POUTSIKA, D. D.; DINARELLO, C. A.; LOWRY, S. F.; MOLDAWER, L. L. Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and human disease. **Blood**, v. 79, n. 9, p. 2196-2200, 1992.

FORTIER, L. A.; SCHNAEL, L. V.; MOHAMMED, H. O.; MAYR, K. G. Assessment of cartilage degradation effects of matrix metalloproteinase-13 in equine cartilage cocultured with synoviocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 4, p. 379-384, 2007.

FRISBIE, D. D.; KAWCAK, C. E.; WERPY, N. M.; PARK, R. D.; MCILWRAITH, C. W. Clinical, biochemical, and histologic effects of intra-articular administration of autologous conditioned serum in horses with experimentally induced osteoarthritis. **American Journal Veterinary Research**, v. 68, n. 3, p. 290-296, 2007.

FRISBIE, D. D.; AL-SOBAYIL, F.; BILLINGHURST, R. C.; KAWCAK, C. E.; MCLLWRAITH, C. W. Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 10, p. 1196-1204, 2008.

FULLER, C. J.; BARR, A. R.; SHARIF, M.; DIEPPE, P. A. Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. **OsteoArthritis and Cartilage**, v. 9, n. 1, p. 49-55, 2001.

GAMBHIR, J. K.; LALI, P.; JAIN, A. K. Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 351-355, 1997.

GIBSON, K. T.; HODGE, H.; WHITTEM, T. Inflammatory mediators in equine synovial fluid. **Australian Veterinary Journal**, v. 73, n. 4, p. 148-151, 1996.

GOLDRING, S. R.; GOLDRING, M. B. Clinical aspects, pathology and pathophysiology of osteoarthritis. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 6, n. 4, p. 376-378, 2006.

GOUGH, M. R.; MUNROE, G. A.; MAYHEW, I. G. Urea as measure of dilution of equine synovial fluid. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 1, p. 76-79, 2002.

GRANOWITZ, E. V.; SANTOS, A. A.; POUTSIAKA, D. D.; CANNON, J. G.; WILMORE, D. W.; WOLFF, S. M.; DINARELLO, C. A. Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. **The Lancet**, v. 338, n. 8780, p. 1423-1424, 1991.

GREGG, A. J.; FORTIER, L. A.; MOHAMMED, H. O.; MAYR, K. G.; MILLER, B. J.; HAUPT, J. L. Assessment of the catabolic effects of interleukin-1 β on proteoglycan metabolism in equine cartilage cocultured with synoviocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 6, p. 957-962, 2006.

GROBMYER, S. R.; BARIE, P. S.; NATHAN, C. F.; FUORTES, M.; LIN, E.; LOWRY, S. F.; WRIGHT, C. D.; WEYANT, M. J.; HYDO, L.; REEVES, F.; SHILOH, M.; DING, A. Secretory leukocyte protease inhibitor, an inhibitor of neutrophil activation, is elevated in serum in human sepsis and experimental endotoxemia. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 5, p. 1276-1282, 2000.

GRÖNDAHL, G.; JOHANNISSON, A.; JENSEN-WAERN, M. Opsonic effect of equine plasma from different donors. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 227-235, 1997.

GÜRTLER, H.; KOLB, E.; SCHRÖDER, L.; KETZ, H-A.; SEIDEL, H. **Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro:Guanabara, 1984.

HANNUM, C. H.; WILCOX, C. J.; AREND, W. P.; JOSLIN, F. G.; DRIPPS, D. J.; HEIMDAL, P. L.; ARMES, L. G.; SOMMER, A.; EISENBERG, A. P.; THOMPSON, R. C. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. **Nature**, v. 343, n. 6256, p. 336-340, 1990.

HARTOG, S. M.; BACK, W.; BROMMER, H.; WEEREN, P. R. *In vitro* evaluation of metacarpophalangeal joint loading during simulated walk. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 3, p. 214-217, 2009.

HASEEB, A.; HAQQI, T. M. Immunopathogenesis of osteoarthritis. **Clinical Immunology**, v. 146, n. 3, p. 185-196, 2013.

HASKILL, S.; MARTIN, G.; VAN LE, L.; MORRIS, J.; PEACE, A.; BIGLER, C. F.; JAFFE, G. J.; HAMMERBERG, C.; SPORN, S. A.; FONG, S.; AREND, W. P.; RALPH, P. cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 9, p. 3681-3685, 1991.

HAWKINS, D. L.; MACKAY, R. J.; GUM, G. G.; COLAHAN, P. T.; MEYER, J. Effects of intra-articularly administered endotoxin on clinical signs of disease and synovial fluid tumor necrosis factor, interleukin 6, and prostaglandin E₂ values in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 379-386, 1993.

HAWKINS, D. L.; CARGILE, J. L.; MACKAY, R. J.; BROOME, T. A.; SKELLEY, L. A. Effect of tumor necrosis factor antibody on synovial fluid cytokine activities in equine antebrachiocarpal joints injected with endotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 10, p. 1292-1299, 1995.

HORAI, R.; SAIJO, S.; TANIOKA, H.; NAKAE, S.; SUDO, K.; OKAHARA, A.; IKUSE, T.; ASANO, M.; IWAKURA, Y. Development of chronic inflammatory arthropaty resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist – deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 2, p. 313-320, 2000.

HRAHA, T. H.; DOREMUS, K. M.; MCILWRAITH, C. W.; FRISBIE, D. D. Autologous conditioned sérum: The comparative cytokine profiles of two comercial methods (IRAP and IRAP II) using equine blood. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, n. 5, p. 516-521, 2011.

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.

HUSER, C. A. M.; DAVIES, M. E. Validation of an in vitro single-impact load model of the initiation of osteoarthritis-like changes in articular cartilage. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 4, p. 725-732, 2006.

ISSA, R. I.; GRIFFIN, T. M. Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. **Pathobiology of Aging & Age Related Diseases**, v. 9, n. 2, 2012.

JAQUES, L. B.; BALLIEUX, R. E.; DIETRICH, C. P.; KAVANAGH, L. W. A microelectrophoresis method for heparin. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 351-360, 1968.

JOUGLIN, M.; ROBERT, C.; VALETTE, J-P.; GAVARD, F.; QUINTIN-COLONNA, F.; DENOIX, J-M. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. **Veterinary Research**, v. 31, n. 5, p. 507-515, 2000.

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

KAMM, J. L.; FRISBIE, D. D.; MCCILWRAITH, C. W.; ORR, K. E. Biomarkers in peripheral white blood cells of horses with experimentally induced osteoarthritis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 74, n. 1, p. 115-121, 2013.

KATO, H.; OHASHI, T.; MATSUSHIRO, H.; WATARI, T.; GOITSUKA, R.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Molecular cloning and functional expression of equine interleukin-1 receptor antagonist. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 221-231, 1996.

KAWCAK, C. E.; FRISBIE, D. D.; WERPY, N. M.; PARK, R. D.; MCLLWRAITH, C. W. Effects of exercise vs experimental osteoarthritis on imaging outcomes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 12, p. 1519-1525, 2008.

KIM, D. Y.; TAYLOR, H. W.; MOORE, R. M.; PAULSEN, D. B.; CHO, D.-Y. Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, v. 166, n. 1, p. 52-57, 2003.

KIRKER-HEAD, C. A.; CHANDNA, V. K.; AGARWAL, R. K.; MORRIS, E. A.; TIDWELL, A.; O'CALLAGHAN, W. O.; RAND, W.; KUMAR, M. S.A. Concentrations of substance P and prostaglandin E₂ in synovial fluid of normal and abnormal joints of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 6, p. 714-718, 2000.

KORENEK, N. L.; ANDREWS, F. M.; MADDUX, J. M.; SANDERS, W. L.; FAULK, D. L. Determination of total protein concentration and viscosity of synovial fluid from the tibiotarsal joints of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 5, p. 781-784, 1992.

KRAUS, V. B.; BIRMINGHAM, J.; STABLER, T. V.; FENG, S.; TAYLOR, D. C.; MOORMAN, C. T.; GARRET, W. E.; TOTH, A. P. Effects of intraarticular IL1-Ra for acute anterior cruciate ligament knee injury: a randomized controlled pilot trial. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 4, p. 271-278, 2012.

KUMAR, V. K.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Pathologic basis of disease**. Philadelphia: Saunders, 2005.

LACOURT, M.; GAO, C.; LI, A.; GIRARG, C.; BEAUCHAMP, G.; HENDERSON, J. E.; LAVERTY, S. Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 20, n. 6, p. 572-583, 2012.

LAMACCHIA, C.; RODRIGUEZ, E.; PALMER, G.; VIGNE, S.; MARTIN, P.; AYER, D. T.; SEEMAYER, C. A.; GABAY, C. Articular inflammation is controlled by myeloid cell-derived interleukin 1 receptor antagonist during the acute phase of arthritis in mice. **Annals of the Rheumatic Disease**, v. 71, n. 2, p. 281-287, 2012.

LARRICK, J. W. Native interleukin 1 inhibitors. **Immunology Today**, v. 10, n. 2, p. 61-66, 1989.

LEY, C.; EKMAN, S.; ELMÉN, A.; NILSSON, G.; ELORANTA, M. L. Interleukin-6 and tumor necrosis factor in synovial fluid from horses with carpal joint pathology. **Journal Veterinary Medical Association**, v. 54, n. 7, p. 346-351, 2007.

LEY, C.; EKMAN, S.; RONÉUS, B.; ELORANTA, M. L. Interleukin-6 and high mobility group box protein-1 in synovial membranes and osteochondral fragments in equine osteoarthritis. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 3, p. 490-497, 2009.

LEY, C.; SVALA, E.; NILTON, A.; LINDAHL, A.; ELORANTA, M-L.; EKMAN, S.; SKIÖLDEBRAND, E. Effects of high mobility group box protein-1, interleukin-1 β , and interleukin-6 on cartilage matrix metabolism in three-dimensional equine chondrocyte cultures. **Connective Tissue Research**, v. 52, n. 4, p. 290-300, 2011.

LIBERG, P.; MAGNUSSON, L-E.; SCHOUGAARD, H. Studies on the synovia in healthy horses with particular reference to the protein composition. **Equine Veterinary Journal**, v. 9, n. 2, p. 87-91, 1977.

LITTLE, C. B.; FLANNERY, C. R.; HUGHES, C. E.; GOODSHIP, A.; CATERSON, B. Cytokine induced metalloproteinase expression and activity does not correlate with focal susceptibility of articular cartilage to degeneration. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 13, n. 2, p. 162-170, 2005.

LUMSDEN, J. M.; CARON, J. P.; STEFFE, J. F.; BRIGGS, J. L.; ARNOCKY, S. P. Apparent viscosity of the synovial fluid from mid-carpal, tibiotarsal, and distal interphalangeal joints of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 6, p. 879-883, 1996.

MAY, S. A.; HOOKE, R. E.; LEES, P. Inhibition of interleukin-1 activity by equine synovial fluid. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 2, p. 99-102, 1992.

MCILWRAITH, C. W.; FESSLER, J. F.; BLEVINS, W. E.; PAGE, E. H.; REBAR, A. H.; VAN SICKLE, D. C.; COPPOC, G. L. Experimentally induced arthritis of the equine carpus: clinical determinations. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 1, p. 11-20, 1979.

MCILWRAITH, C. W.; TROTTER, G. W. **Joint disease in the horse**. Philadelphia: Saunders, 1996.

MCILWRAITH, C. W. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 5, p. 473-482, 2005.

MCILWRAITH, C. W. Recent advances in diagnosis of equine joint disease. In: KENTUCKY EQUINE RESEARCH – NUTRITION CONFERENCE, 17., 2010, Lexington. **Anais...** Lexington: Feeding and Veterinary Management of the Sport Horse, 2010. p. 23.

MCTAGGART, C.; PENHALE, J.; RAIDAL, S. L. Effect of plasma transfusion on neutrophil function in healthy and septic foals. **Australian Veterinary Journal**, v. 83, n. 8, p. 499-505, 2005.

MEIJER, H.; REINECKE, J.; BECKER, C.; THOLEN, G.; WEHLING, P. The production of antiinflammatory cytokines in whole blood by physic-chemical induction. **Inflammation Research**, v. 52, n. 10, p. 1-4, 2003.

MISHEFF, M. M.; STOVER, S. M. A comparison of two techniques for arthrocentesis of the equine metacarpophalangeal joint. **Equine Veterinary Journal**, v. 23, n. 4, p. 273-276, 1991.

MISUMI, K.; VILIM, V.; HATAZOE, T.; MURATA, T.; FUJIKI, M.; OKA, T.; SAKAMOTO, H.; CARTER, S. D. Serum level of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine osteoarthritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 6, p. 602-608, 2002.

MOBASHERI, A.; HENROTIN, Y. Identification, validation and qualification of biomarkers for osteoarthritis in human and companion animals: mission for the next decade. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 2, p. 97-97, 2010.

MORTELLARO, C. M. Pathophysiology of Osteoarthritis. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 75-78, 2003. Supplement, 1.

MORRIS, E. A.; MCDONALD, B. S.; WEBB, A. C.; ROSENWASSER, L. J. Identification of interleukin-1 in equine osteoarthritic joint effusions. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 1, p. 59-64, 1990.

MOSER, C.; BALTZER, A. W. A.; JANSEN, S. A.; KRAUSPE, R. Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n. 2, p. 152-160, 2009.

MURRAY, R. C.; SMITH, R. K.; HENSON, F. M. D.; GOODSHIP, A. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in equine carpal articular cartilage and its variation with exercise and cartilage deterioration. **The Veterinary Journal**, v. 162, n. 2, p. 121-128, 2001.

NASJLETI, C. E.; CAFFESSE, R. G.; CASTELLI, W. A.; SMITH, B. A.; LOPATIN, D. E.; KOWALSKI, C. J. Effect of citric acid and lyophilized autologous plasma on healing following periodontal flap surgery in monkeys. **Journal of Periodontology**, v. 58, n. 11, p. 770-779, 1987.

NICHOLSON, A. M.; TRUMBLE, T. N.; MERRITT, K. A.; BROWN, M. P. Associations of horse age, joint type, and osteochondral injury with serum and synovial fluid concentrations of type II collagen biomarkers in Thoroughbreds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 7, p. 741-749, 2010.

PALMER, J. L.; BERTONE, A. L.; MCCLAIN, H. Assessment of glycosaminoglycan concentration in equine synovial fluids as a marker of joint disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 3, p. 205-212, 1995.

PALMER, G.; GUERNE, P. A.; MEZIN, F.; MARET, M.; GUICHEUX, J.; GOLDRING, M. B.; GABAY, C. Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. **Arthritis Research**, v. 4, n. 3, p. 226-231, 2002.

PANIZZI, L.; BARBER, S. M.; LANG, H. M.; CARMALT, J. L. Carpometacarpal osteoarthritis in thirty-three horses. **Veterinary Surgery**, v. 38, n. 8, p. 998-1005, 2009.

POOLE, A. R. An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 662-670, 1999.

REECE, W. O. Sangue e suas funções. In: _____. **Anatomia funcional e fisiologia dos animais domésticos**. São Paulo: Roca, 2008. p. 38-67.

RICKEY, E. J.; CRUZ, A. M.; TROUT, D. R.; MCEWEN, B. J.; HURTIG, M. B. Evaluation of experimental impact injury for inducing post-traumatic osteoarthritis in the metacarpophalangeal joints of horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 10, p. 1540-1552, 2012.

ROACH, H. I.; AIGNER, T.; KOURI, J. B. Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes? **Apoptosis**, v. 9, n. 3, p. 265-277, 2004.

ROSE, E. J.; FRAUENFELDER, H. C. Arthrocentesis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 14, n. 2, p. 173-177, 1982.

ROSS, T. N.; KISIDAY, J. D.; HESS, T.; MCCILWRAITH, 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.

ROUSSEAU, J. C.; GARNERO, P. Biological markers in osteoarthritis. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 265-277, 2012.

RUTGERS, M.; SARIS, D. B. F.; DHERT, W. J. A.; CREEMERS, L. B. Cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, *in vitro* effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 3, p. 1-11, 2010.

SAARI, H.; TULAMO, R.-M.; KONTTINEN, Y. T.; SORSA, T. Methylprednisolone acetate induced release of cartilage proteoglycans: determination by High performance liquid chromatography. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 51, n. 2, p. 214-219, 1992.

SANCHEZ TERAN, A. F.; RUBIO MARTINEZ, L. M.; VILLARINO, N. F.; SANZ, M. G. Effects of repeated intra-articular administration of amikacin on serum amyloid A, total protein and nucleated cell count in synovial fluid from healthy horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, p. 12-16, 2012. Supplement.

SANO, C.; SHIMIZU, T.; SATO, K.; KAWAUCHI, H.; TOMIOKA, H. Effects of secretory leucocyte protease inhibitor on the production of the anti-inflammatory cytokines, IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF- β), by lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 121, n. 1, p. 77-85, 2000.

SARBAN, S.; KOCYIGIT, A.; YAZAR, M.; ISIKAN, U. E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 981-986, 2005.

SCANZELLO, C. R.; PLAAS, A.; CROW, M. K. Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound? **Current Opinion in Rheumatology**, v. 20, p. 565-572, 2008.

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

SCHIFF, M. H. Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Disease**, v. 59, p. 103-108, 2000. Supplement, 1.

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. SCHLUETER; ORTH, 2004a.

SCHLUETER, A. E.; ORTH, M. W. Further studies on the ability of glucosamine and chondroitin sulphate to regulate catabolic mediators *in vitro*. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 7, p. 634-636, 2004b.

SECKINGER, P.; LOWENTHAL, J. W.; WILLIAMSON, K.; DAYER, J. M.; MacDONALD, R. A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding. **The journal of immunology**, v. 139, n. 5, p. 1546-1549, 1987.

SMITH, J. J.; ROSS, M. W.; SMITH, R. K. W. Anabolic effects of acellular bone marrow, platelet rich plasma, and serum on equine suspensory ligament fibroblasts *in vitro*. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 19, n. 1, p. 43-47, 2006.

SONG, X.; ZENG, L.; JIN, W.; THOMPSON, J.; MIZEL, DE.; LEI, K.; BILLINGHURST, R. C.; POOLE, A. R.; WAHL, S. M. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 4, p. 535-542, 1999.

STASHAK, T. S. Examination for lameness. In:_____. **Adam's lameness in horses**. Philadelphia: Saunders Company, 2002.

STEEL, C. M. Equine synovial fluid analysis. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 24, n. 2, p. 437-454, 2008.

SUOMINEN, M. M.; TULAMO, R-M.; ANTTILA, M. O.; SANKARI, S. M.; KIRÁLY, K.; LAPVETELÄINEN, T.; HELMINEN, H. J. Effects of intra-articular injections of buprenorphine suspension in healthy horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 10, p. 1629-1635, 2001.

SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P.; GENT, T.; FREEMAN, S.; FOSTER, N.; BARRETT-JOLLEY, R.; MOBASHERI, A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 10-24, 2009.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. TITULO DO CAPITULO. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.

SWIFT, A. Osteoarthritis 1: physiology, risk factors and causes of pain. **Nursing Times**, v. 108, n. 7, p. 12-15, 2012.

TAYLOR, S. E.; WEAVER, M. P.; PITSILLIDES, A.; WHEELER, B. T.; WHEELER-JONES, C. P. D.; SHAW, D. J.; SMITH, R. K. W. Cartilage oligomeric matrix protein and hyaluronan levels in synovial fluid from horses with osteoarthritis of the tarsometatarsal joint compared to a control population. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 6, p. 502-507, 2006.

TEW, W. P.; HOTCHKISS, R. M. Synovial fluid analysis and equine joint disorders. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 1, n. 5, p. 163-170, 1981.

TEXTOR, J. Autologous biologic treatment for equine musculoskeletal injuries: platelet-rich-plasma and IL-1 receptor antagonist protein. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 275-298, 2011.

THOMAS, C. M.; FULLER, C. J.; WHITTLES, C. E.; SHARIF, M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 15, n. 1, p. 27-34, 2007.

THOMAS, C. M.; FULLER, C. J.; WHITTLES, C. E.; SHARIF, M. Chondrocyte death by apoptosis is associated with the initiation and severity of articular cartilage degradation. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 14, n. 2, p. 191-198, 2011a.

THOMAS, C. M.; WHITTLES, C. E.; FULLER, C. J.; SHARIF, M. Variations in chondrocyte apoptosis may explain the increased prevalence of osteoarthritis in some joints. **Rheumatology International**, v. 31, n. 10, p. 1341-1348, 2011b.

THOMAS, C. M.; MURRAY, R.; SHARIF, M. Chondrocyte apoptosis determined by caspase-3 expression varies with fibronectin distribution in equine articular cartilage. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 14, n. 3, p. 290-297, 2011.

THOMPSON, C. C. M.; CLEGG, P. D.; CARTER, S. D. Differential regulation of gelatinases by transforming growth factor beta-1 in normal equine chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, n. 4, p. 325-331, 2001.

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

TULAMO, R-M.; HEISKANEN, T.; SALONEN, M. Concentration and molecular weight distribution of hyaluronate in synovial fluid from clinically normal horses and horses with disease joints. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 5, p. 710-715, 1995.

VAN DEN BOOM, R.; BRAMA, P. A. J.; KIERS, G. H.; DEGROOT, J.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R. The influence of repeated arthrocentesis and exercise on matrix metalloproteinases and tumor necrosis factor α activities in normal equine joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 36, n. 2, p. 155-159, 2004.

VAN DEN BOOM, R.; VAN DE LEST, C. H. A.; BULL, S.; BRAMA, P. A. J.; VAN WEEREN, P. R., BARNEVELD, A. Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E₂ and glycosaminoglycans in healthy equine joints. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p. 250-256, 2005.

VAN PELT, R. W. Properties of equine synovial fluid. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 141, n. 9, p. 1051-1061, 1962.

VAN PELT, R. W. Characteristics of normal equine tarsal synovial fluid. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 31, n. 12, p. 342-347, 1967.

VAN PELT, R. W. Interpretation of synovial fluid findings in the horse. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 165, n. 1, p. 91-95, 1974.

VINARDELL, T.; DEJICA, V.; POOLE, A. R.; MORT, J. S.; RICHARD TECHNICAL ASSISTANT, H.; LAVERTY, S. Evidence to suggest that cathepsin K degrades articular cartilage in naturally occurring equine osteoarthritis. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n. 3, p. 375-383, 2009.

VOLPI, N. Anti-inflammatory activity of chondroitin sulphate: new functions from and old natural macromolecule. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 6, p. 299-306, 2011.

VUOLTEENAHO, K.; KOSKINEN, A.; MOILANEN, T.; MOILANEN, E. Leptin levels are increased and its negative regulators, SOCS-3 e sOb-R are decreased in obese patients with osteoarthritis: a link between obesity and osteoarthritis. **Annals of the rheumatic disease**, v. 71, n. 11, p. 1912-1913, 2012.

WAGNER, A. E.; MCILWRAITH, C. W.; MARTIN, G. S. Effect of intra-articular injection of orgotein and saline solution on equine synovia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 4, p. 594-597, 1982.

WASSERMAN, R. H.; KALLFELZ, F. A.; LUST, G. Ossos, articulações e líquido sinovial. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 488-520.

WEHLING, P.; REINECKE, J.; MEIJER, H. Epidural injections with interleukin-1-receptor-antagonist-protein (IRAP) in lumbar radicular compression: pathophysiological background, safety and clinical results. In: INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF THE LUMBAR SPINE, 24., 1998, Brussels. **Anais...** Brussels: ISSLS, 1998. p. 16.

WEHLING, P.; MOSER, C.; FRISBIE, D.; MCILWRAITH, C. W.; KAWCAK, C. E.; KRAUSPE, R.; REINECKE, J. A. Autologous conditioned serum in the treatment of orthopedic disease – The Orthokine® Therapy. **Biodrugs**, v. 25, n. 5, p. 323-332, 2007.

WEHLING, P.; MOSER, C.; REINECKE, J. Use of autologous conditioned cell-free serum (Orthokine®) in treating osteoarthritis and sciatic back pain. **European Musculoskeletal Review**, v. 4, n. 1, p. 8-10, 2009.

WELCH, R. D.; DEBOWES, R. M.; LIEPOLD, H. W. Evaluation of the effects of intra-articular injection of dimethylsulfoxide on normal equine articular tissues. **American Journal of Veterinary Research**, v. 50, n. 7, p. 1180-1182, 1989.

WELCH, R. D.; WATKINS, J. P.; DEBOWES, R. M.; LEIPOLD, H. W. Effects of intra-articular administration of dimethylsulfoxide on chemically induced synovitis in immature horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 6, p. 934-939, 1991.

YAMANOKUCHI, K.; TAGAMI, M.; NISHIMATSU, E.; SHIMIZU, Y.; HIROSE, Y.; KOMATSU, K.; MISUMI, K. Sandwich ELISA system for cartilage oligomeric matrix protein in equine synovial fluid and serum. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 41-46, 2009.

YANG, K. G. A.; RAIJMAKERS, N. J. H.; ARKEL, E. R. A.; CARON, J. J.; RIJK, P.C.; WILLEMS, W. J.; ZIJL, J. A. C.; VERBOUT, A. J.; DHERT, W. J. A.; SARIS, D. B. F. Autologous interleukin-1 receptor antagonist improves function and symptoms in osteoarthritis when compared to placebo in a prospective randomized controlled trial. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 16, n. 4, p. 498-505, 2008.

APÊNDICE B

Consistência do aumento de volume das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Presença (+) ou ausência (-) de calor nas articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
2	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
3	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
4	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
5	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
6	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
7	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
8	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
9	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
10	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-

APÊNDICE C

Presença (+) ou ausência (-) de dor nas articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
7	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
9	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-

APÊNDICE D

Presença ou ausência (-) e grau de claudicação dos membros torácicos dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica, segundo Stashak (2002) – São Paulo – 2013

Animal	ACP				Solução Fisiológica			
	0h	24h	48h	168h	0h	24h	48h	168h
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	1	1	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-

Deteção de claudicação dos membros torácicos dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica, pelo aparelho Lameness Locator® – São Paulo – 2013

Animal	ACP				Solução Fisiológica			
	0h	24h	48h	168h	0h	24h	48h	168h
1	0,43	0,48	0,47	0,46	0,02	0,00	0,33	0,17
2	0,13	0,28	0,08	0,17	0,34	0,22	0,34	0,30
3	0,46	0,76	0,51	0,58	0,07	0,00	0,22	0,12
4	0,17	0,00	0,08	0,2	0,07	0,03	0,03	0,05
5	0,31	0,24	0,50	0,35	0,16	0,24	0,25	0,22
6	0,40	0,44	0,46	0,43	0,02	0,00	0,07	0,04
7	0,12	0,42	0,42	0,38	0,08	0,05	0,04	0,06
8	0,29	0,47	0,30	0,36	0,24	0,3	0,17	0,10
9	0,31	0,42	0,47	0,40	0,42	0,37	0,16	0,28
10	0,19	0,27	0,34	0,20	0,28	0,17	0,32	0,30

Valores acima de 0,50 indicam claudicação.

APÊNDICE E

Presença ou ausência (-) e grau de claudicação dos membros torácicos em resposta ao teste de flexão da articulação metacarpofalangeana dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica, segundo Stashak (2002) – São Paulo – 2013

Animal	ACP				Solução Fisiológica			
	0h	24h	48h	168h	0h	24h	48h	168h
1	-	1	1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	2	1	-	-	-	-	-
4	-	1	1	-	-	1	1	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	1	1	1	1
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-

Detecção de claudicação dos membros torácicos em resposta ao teste de flexão da articulação metacarpofalangeana dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica, pelo aparelho Lameness Locator® – São Paulo – 2013

Animal	ACP				Solução Fisiológica			
	0h	24h	48h	168h	0h	24h	48h	168h
1	0,48	0,54	0,68	0,57	0,30	0,38	0,32	0,29
2	0,25	0,37	0,46	0,31	0,28	0,27	0,39	0,48
3	0,46	0,97	0,62	0,49	0,39	0,43	0,29	0,18
4	0,21	0,52	0,59	0,37	0,28	0,62	0,69	0,29
5	0,34	0,37	0,46	0,28	0,36	0,35	0,48	0,40
6	0,45	0,55	0,53	0,42	0,43	0,39	0,47	0,36
7	0,17	0,40	0,47	0,36	0,20	0,17	0,30	0,28
8	0,36	0,43	0,45	0,38	0,58	0,62	0,6	0,56
9	0,43	0,41	0,48	0,32	0,45	0,36	0,39	0,27
10	0,29	0,37	0,45	0,49	0,18	0,22	0,19	0,27

Valores acima de 0,50 indicam claudicação.

APÊNDICE F

Valores médios e desvio padrão (DP) do volume (ml) de LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	1,2	2,0	1,0	3,5	1,5	*	1,2	2,0	2,5	2,0	2,5	2,0
2	2,5	1,5	3,0	2,5	3,0	4,0	2,5	2,2	2,0	3,0	3,0	2,0
3	2,0	3,0	3,0	3,0	2,5	2,0	2,0	2,0	1,5	1,0	1,5	1,5
4	2,0	3,0	2,0	1,8	3,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,5	1,2	2,0
5	2,0	2,0	3,0	3,0	2,5	3,0	1,5	1,0	1,0	3,0	3,0	2,0
6	1,3	1,0	2,0	3,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0
7	2,0	2,0	2,0	2,5	2,0	1,0	1,0	2,0	2,0	3,0	2,0	2,0
8	2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	2,0	2,0	2,0	2,0	4,0	3,0	3,0
9	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	1,5	0,5	1,0	2,0	0,8	1,0	1,0
10	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	*	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0
Média	1,75	1,95	2,10	2,43	2,05	2,06	1,57	1,67	1,75	2,18	2,02	1,85
DP	0,58	0,69	0,74	0,74	0,86	1,02	0,63	0,60	0,59	1,09	0,83	0,58

*: amostra insuficiente para análise. Não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$).

APÊNDICE G

Coloração do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	1	1	2	3	3	*	1	1	1	1	1	1
2	3	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	3	3	3	1	1	1	1	1	3	1
4	1	1	2	2	3	1	1	1	1	1	1	1
5	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1
6	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2	1
7	1	2	2	2	2	1	1	1	1	3	2	1
8	1	1	3	2	2	1	1	1	2	2	V	1
9	3	3	3	3	3	1	1	3	3	3	2	1
10	3	3	3	3	3	*	1	1	1	1	1	1
Mediana	1ab	2ab	2a	2a	2ab	1b	1	1	1	1	1	1

Palha = 1; Ouro = 2; Vermelho = 3; *: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$

Aspecto do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	1	1	1	2	2	*	1	2	2	2	1	1
2	2	2	3	2	1	1	1	1	1	2	1	1
3	1	1	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mediana	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Límpido = 1; semi turvo = 2; turvo = 3; *: amostra insuficiente para análise.

APÊNDICE H

Viscosidade do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	3	3	2	3	2	*	2	2	2	3	3	3
2	3	3	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3
3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2
4	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2
5	3	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	3
6	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3
7	3	2	2	2	2	3	3	2	2	2	3	3
8	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2	2	3
9	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3
10	2	2	2	2	2	*	3	3	3	3	3	3
Mediana	3a	2ab	2b	2ab	2ab	2ab	3a	2ab	2b	2ab	2ab	3ab

< 2 = 1, 2 a 5 = 2, >5= 3; *: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível P<0,05

Qualidade do precipitado de mucina do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	1	1	2	1	1	*	1	1	2	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	*	1	1	1	1	1	1
Mediana	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1: bom; 2: regular; *: amostra insuficiente para análise.

APÊNDICE I

Valores médios e desvio padrão (DP) da contagem total de células nucleadas (células/ μ l) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	133	3000	4500	7500	9275	*	140	185	750	1368	2123	388
2	200	200	1600	2333	1033	263	28	115	688	3413	928	450
3	1318	13800	26555	12000	6200	480	228	280	2000	7150	2700	1400
4	50	150	950	5400	8800	4050	265	120	325	3200	3380	290
5	230	1850	8650	8150	3950	650	255	175	850	4850	1848	640
6	115	26950	29825	5275	954	98	80	140	875	5125	1675	170
7	240	1675	22100	865	3625	385	95	290	2425	6725	1910	263
8	43	50	1450	8675	2375	225	43	56	790	3850	2800	273
9	550	24200	6400	6800	2000	315	35	700	1025	1700	1175	275
10	550	8100	4950	18100	5600	*	143	203	275	4525	2300	670
Média	343a	7998abA	10698bA	7510abA	4381abA	808a	131a	226aB	1000abB	4191cB	2084bB	482a
DP	388	10240	11079	4887	3013	1321	91	181	688	1900	748	362

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$. Letras maiúsculas distintas na mesma linha entre os tratamentos diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$ para o mesmo momento.

APÊNDICE J

Valores médios e desvio padrão (DP) do número relativo (%) de células mononucleares do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	100	27	14	40	70	*	97	35	20	59	86	96
2	100	97	76	90	89	90	100	100	90	82	85	89
3	72	16	24	65	89	90	94	60	83	71	87	*
4	100	81	77	82	97	89	100	80	80	63	90	100
5	93	68	61	52	74	88	90	89	65	61	93	100
6	97	59	30	87	96	98	100	87	72	92	93	98
7	94	24	32	95	90	100	95	94	87	92	100	100
8	72	83	73	86	83	98	100	100	65	65	55	98
9	80	12	24	58	60	100	100	50	37	87	90	100
10	72	25	43	83	92	*	95	92	45	*	92	*
Média	88a	49bcA	45bA	74ac	84a	94a	97a	79abB	64bB	75bc	87ac	98a
DP	12	32	24	19	12	5	4	23	23	14	12	4

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$. Letras maiúsculas distintas na mesma linha entre os tratamentos diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$ para o mesmo momento.

APÊNDICE L

Valores médios e desvio padrão (DP) do número relativo (%) de células polimorfonucleares do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	0	73	86	60	30	*	3	65	80	41	14	4
2	0	3	24	10	11	10	0	0	10	18	15	11
3	28	84	76	35	11	10	6	40	27	29	13	*
4	0	19	23	8	3	11	0	20	20	37	10	0
5	7	32	38	48	26	12	10	11	35	39	7	0
6	3	41	70	13	4	2	0	13	28	8	7	2
7	6	76	68	5	10	0	5	6	13	8	0	0
8	28	17	27	14	17	2	0	0	35	35	45	2
9	20	88	76	42	40	0	0	50	63	13	10	0
10	28	75	57	16	8	*	5	8	55	*	8	*
Média	12a	51bcA	55bA	25ac	16a	6a	3a	21abB	37bB	25bc	13ac	2a
DP	12	32	24	19	12	5	4	23	23	14	12	4

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$. Letras maiúsculas distintas na mesma linha entre os tratamentos diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$ para o mesmo momento.

APÊNDICE M

Valores médios e desvio padrão (DP) da ureia (mg/dl) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	37,70	32,20	35,30	39,00	27,90	*	26,6	27,2	27,50	26,10	25,60	23,00
2	35,50	47,60	37,50	34,70	34,50	33,60	31,60	33,50	33,10	30,70	37,70	38,60
3	35,30	31,90	33,20	29,50	34,10	33,00	36,50	34,40	32,60	32,90	39,10	35,10
4	44,50	43,80	40,20	41,90	38,10	39,10	42,80	41,80	39,50	42,60	41,50	46,00
5	39,50	37,30	44,80	36,80	43,20	38,40	38,50	34,50	36,60	36,20	38,90	45,90
6	38,10	36,30	35,10	36,20	36,50	32,70	33,80	31,80	31,20	31,20	31,60	32,60
7	40,30	31,50	37,60	34,50	41,30	29,20	30,80	28,10	26,50	26,20	34,70	27,30
8	43,90	49,40	54,70	49,10	49,20	34,90	45,70	47,30	45,90	47,70	46,30	46,90
9	38,60	36,60	35,40	35,00	37,20	29,20	35,90	37,40	35,90	36,16	35,50	36,10
10	33,40	32,40	31,70	28,60	32,30	*	27,20	24,90	32,90	31,10	29,40	30,40
Média	38,68	37,90	38,55	36,53	37,43	33,76	34,94	34,09	34,17	34,09	36,03	36,19
DP	3,58	6,71	6,77	5,92	6,01	3,68	6,26	6,82	5,70	6,85	6,06	8,24

*: amostra insuficiente para análise. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

APÊNDICE N

Valores médios e desvio padrão (DP) da proteína total (g/dl) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	3,15	2,24	2,74	2,82	1,51	*	1,19	0,98	1,64	1,29	0,96	0,48
2	0,59	1,21	1,35	0,96	0,46	0,63	0,49	0,46	0,73	0,86	0,64	0,67
3	1,06	3,16	2,85	1,72	0,85	0,41	0,51	0,38	0,63	0,52	0,87	0,66
4	0,85	2,08	1,80	1,45	0,94	0,71	0,65	0,49	0,69	1,27	1,10	1,09
5	1,18	2,86	3,01	1,84	1,26	1,03	1,24	0,70	0,88	2,73	1,90	1,19
6	0,56	2,11	2,80	1,83	0,63	0,86	0,58	0,50	0,89	1,48	1,01	0,68
7	0,68	2,85	3,44	1,01	1,56	0,43	0,42	0,44	0,73	1,11	1,21	0,44
8	0,67	2,07	2,81	1,43	0,72	0,43	0,66	0,63	0,99	2,56	3,85	1,15
9	3,19	2,61	3,49	1,36	0,97	0,50	0,60	0,79	1,16	*	0,67	0,34
10	1,17	3,66	3,06	1,87	1,32	*	0,60	0,50	0,63	0,91	0,62	0,47
Média	1,31ab	2,48cA	2,73cA	1,63a	1,02ab	0,63b	0,69ab	0,59aB	0,90abB	1,41b	1,28ab	0,72ab
DP	1,01	0,69	0,67	0,53	0,38	0,23	0,28	0,19	0,31	0,75	0,97	0,32

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$. Letras maiúsculas distintas na mesma linha entre os tratamentos diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$ para o mesmo momento.

APÊNDICE N'

Valores médios e desvio padrão (DP) da proteína total (proteína/ureia) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	83,58	69,41	77,68	72,38	54,12	*	44,66	36,18	59,56	49,43	37,54	20,70
2	16,48	25,46	36,05	27,72	13,19	18,84	15,41	13,82	22,08	27,92	17,03	17,33
3	29,92	98,97	85,72	58,20	24,84	12,36	13,92	11,02	19,20	15,71	22,25	18,72
4	19,12	47,44	44,85	34,65	24,72	18,11	15,21	11,60	17,44	29,81	26,58	23,65
5	29,90	76,73	67,12	50,08	29,17	26,74	32,08	20,14	24,07	75,36	48,71	25,99
6	14,78	58,21	79,74	50,47	17,15	26,42	17,19	15,79	28,53	47,28	31,93	20,74
7	16,85	90,32	91,36	29,25	37,77	14,83	13,47	15,55	27,70	42,44	34,81	16,23
8	15,31	41,84	51,37	29,14	14,72	12,35	14,38	13,21	21,46	53,75	83,05	24,43
9	82,56	71,17	98,67	38,80	25,94	17,02	16,69	21,15	32,34	*	18,99	9,34
10	35,03	112,87	96,40	65,28	40,87	*	22,17	20,24	19,00	29,23	21,12	15,33
Média	34,35a	69,24bcA	72,90bA	45,60ac	28,25a	18,33a	20,52ab	17,87aB	27,14abB	37,09b	34,20ab	19,25ab
DP	26,65	26,99	22,19	16,09	12,84	5,63	10,17	7,38	12,34	21,23	19,75	4,98

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$. Letras maiúsculas distintas na mesma linha entre os tratamentos diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$ para o mesmo momento.

APÊNDICE O

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de PGE₂ (pg/ml) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1												
2	19,73	50,73	45,55	28,96	23,74	20,27	17,93	22,32	30,07	27,67	16,82	13,83
3	13,72	90,92	80,92	22,70	31,48	20,29	28,17	34,65	57,56	30,35	51,06	44,70
4	60,00	59,90	50,18	39,47	51,50	72,23	6,50	28,53	43,90	18,15	26,57	68,64
5	23,81	88,62	102,12	42,83	26,75	20,29	42,73	29,68	51,88	58,09	54,63	28,52
6	14,02	78,88	64,41	31,34	50,51	24,99	9,87	14,00	28,68	23,49	20,12	19,44
7	22,14	193,56	86,55	34,58	69,91	30,07	20,66	14,94	53,18	62,81	46,14	24,51
8	13,46	28,41	32,22	16,04	20,02	15,09	17,26	14,65	69,74	40,97	51,08	36,54
9	36,90	123,59	134,66	30,76	44,25	30,46	8,13	16,62	26,50	9,03	21,53	19,76
10	26,07	86,92	142,62	22,05	26,07	*	11,28	24,03	43,18	27,37	45,92	48,91
Média	25,54a	89,06bA	82,14bA	29,86a	38,25a	29,21a	18,06a	22,16aB	44,97bB	33,10ab	37,10ab	33,87ab
DP	14,93	47,73	38,74	8,59	16,71	18,16	11,53	7,60	14,66	17,80	15,45	17,62

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível P<0,05. Letras maiúsculas distintas na mesma linha entre os tratamentos diferem estatisticamente em nível P<0,05 para o mesmo momento.

APÊNDICE O'

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de PGE₂ (pg/mg de ureia) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1												
2	55,58	106,58	121,45	83,46	68,82	60,32	56,74	66,63	90,85	90,13	44,62	35,82
3	38,87	285,01	243,73	76,95	92,31	61,48	77,17	100,71	176,56	92,26	130,59	127,35
4	134,82	136,75	124,82	94,20	135,17	184,73	15,19	68,25	111,13	42,60	64,02	149,22
5	60,27	237,58	227,94	116,39	61,92	52,83	110,98	86,04	141,76	160,47	140,43	62,13
6	36,79	217,31	183,52	86,59	138,38	76,43	29,20	44,03	91,94	75,27	63,67	59,64
7	54,94	614,49	230,17	100,23	169,28	102,98	67,09	53,17	200,69	239,73	132,98	89,78
8	30,67	57,51	58,90	32,67	40,68	43,24	37,76	30,97	151,94	85,88	110,33	77,91
9	95,59	337,68	380,40	87,89	118,94	104,31	22,65	44,45	73,83	24,97	60,64	54,73
10	78,04	268,27	449,92	77,08	80,73	*	41,47	96,50	131,26	88,00	156,19	160,89
Média	65,06a	251,24bA	224,54bA	83,94a	100,69ab	85,79a	50,92a	65,64aB	129,99bB	99,92ab	100,39ab	90,83ab
DP	33,26	163,46	125,09	22,83	42,18	45,75	30,42	24,70	42,25	64,44	42,06	44,64

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível P<0,05. Letras maiúsculas distintas na mesma linha entre os tratamentos diferem estatisticamente em nível P<0,05 para o mesmo momento.

APÊNDICE P

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de TNF- α (pg/ml) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	1049,22	1049,22	1049,22	1049,22	1049,22	1049,22	1049,22	1049,22	1049,22	1049,22	1049,22	1049,22
2	277,50	486,05	347,93	691,89	321,90	329,61	238,44	241,69	362,42	589,29	295,47	306,23
3	26,80	165,72	157,88	53,92	11,97	1,86	1,23	9,16	4,06	0,44	24,71	16,74
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	22,96	24,63	6,60	0,00	2,43	0,00	0,00	0,00	19,14	0,00	*
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	*	1049,22	1049,22	371,78	469,40	*	198,40	134,87	*	358,38	246,11	180,22
Média	150,39	277,32	262,89	217,34	185,25	153,68	148,73	143,49	157,30	201,65	161,55	172,49
DP	349,11	434,22	429,11	372,44	346,70	353,01	329,29	328,57	355,24	360,60	331,39	346,34

*: amostra insuficiente para análise. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

APÊNDICE P'

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de TNF- α (pg/mg de ureia) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	2783,08	3258,45	2972,29	2690,31	3760,65	*	3944,44	3857,43	3815,35	4020,00	4098,52	4561,83
2	781,69	1021,12	927,82	1993,93	933,05	980,97	754,56	721,47	1094,92	1919,50	783,73	793,35
3	75,93	519,51	475,56	182,79	35,10	5,63	3,36	26,64	12,47	1,33	63,19	47,69
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	61,56	54,97	17,94	0,00	6,33	0,00	0,00	0,00	52,87	0,00	*
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	*	3238,33	3309,84	1299,94	1453,24	*	729,43	541,63	*	1152,35	837,12	592,83
Média	404,52	809,90	774,05	618,49	618,20	124,12	543,18	514,72	546,97	714,61	578,26	666,19
DP	928,01	1327,54	1286,17	1006,19	1215,84	346,23	1234,22	1203,93	1277,85	1336,21	1281,19	1491,61

*: amostra insuficiente para análise. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

APÊNDICE Q

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de IL-1 β (pg/ml) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	0,00	0,00	0,00	0,00	1,01	*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	8,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	105,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	8,82	*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média	0,00	0,00	0,88	10,59	0,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DP	0,00	0,00	2,79	33,50	2,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*: amostra insuficiente para análise. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

APÊNDICE Q'

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de IL-1 β (pg/mg de ureia) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	0,00	0,00	0,00	0,00	3,62	*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	23,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0,00	0,00	0,00	287,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	27,32	*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média	0,00	0,00	2,35	28,79	3,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DP	0,00	0,00	7,44	91,04	8,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*: amostra insuficiente para análise. Não houve diferença estatística significativa (P>0,05).

APÊNDICE R

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de IL-1ra (pg/ml) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	*	207,64	193,68	154,06	82,29	*	*	31,46	101,13	100,48	36,83	*
2	0,00	0,00	0,00	30,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	52,77	9,55	0,00
3	8,36	0,00	67,03	119,40	9,23	0,00	0,00	0,00	20,59	97,83	34,23	0,00
4	0,00	0,00	0,00	11,53	0,00	0,00	0,00	17,87	0,00	153,67	228,42	0,00
5	0,00	0,00	12,80	56,96	18,32	0,00	0,00	0,00	0,00	65,41	5,66	0,00
6	0,00	0,00	5,66	10,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	124,48	73,53	49,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	159,38	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	*	0,00	0,00	74,17	0,00	*	0,00	0,00	*	46,43	0,00	0,00
Média	1,04a	33,21ab	35,27ab	50,75b	10,98ab	0,00ab	0,00a	4,93ab	13,52ab	67,60b	31,47ab	0,00ab
DP	2,95	72,71	62,51	52,35	25,79	0,00	0,00	10,88	33,55	59,82	70,65	0,00

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$.

APÊNDICE R'

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de IL-1ra (pg/mg de ureia) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

ANIMAL	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	0,00	644,84	548,66	395,02	294,96		0,00	115,64	367,74	384,97	143,87	0,00
2	0,00	0,00	0,00	88,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	171,90	25,34	0,00
3	23,67	0,00	201,90	404,75	27,06	0,00	0,00	0,00	63,17	297,35	87,55	0,00
4	0,00	0,00	0,00	27,52	0,00	0,00	0,00	42,76	0,00	360,72	550,42	0,00
5	0,00	0,00	28,57	154,79	42,41	0,00	0,00	0,00	0,00	180,68	14,54	0,00
6	0,00	0,00	16,11	29,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	395,17	195,55	144,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	608,32	0,00	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00	259,35	0,00		0,00	0,00	0,00	149,29	0,00	0,00
Média	2,37a	104,00ab	99,08ab	150,42b	36,44ab	0ab	0a	15,84ab	43,09ab	215,32b	82,17ab	0ab
DP	7,49	227,01	177,31	154,63	92,04	0	0	37,55	115,78	199,34	171,48	0

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente em nível P<0,05.

APÊNDICE S

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de AH ($\mu\text{g/ml}$) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	487,78	376,48	256,74	435,86	381,82	142,45	*	449,15	224,49	459,25	838,00	515,96
2	677,14	652,36	656,72	874,24	613,67	358,03	471,82	350,78	352,33	379,50	406,15	386,89
3	924,05	515,35	672,59	986,79	889,29	408,07	461,39	379,09	282,87	346,14	359,70	421,91
4	395,00	334,65	308,88	355,71	341,55	273,79	391,21	316,97	286,41	401,01	391,78	309,31
5	585,71	452,77	350,02	351,73	339,59	363,97	677,00	514,60	636,03	706,72	709,65	543,38
6	452,47	479,11	362,06	512,20	407,18	238,17	352,53	320,65	336,17	358,75	365,32	333,49
7	456,17	337,78	350,39	356,73	437,18	449,16	522,06	394,40	404,75	498,62	469,37	390,69
8	410,11	383,88	381,79	439,74	343,05	275,41	398,67	345,74	282,09	486,98	408,72	324,59
9	396,96	246,37	271,37	363,65	370,56	289,11	536,21	368,04	379,98	678,79	489,23	429,91
10	408,82	289,29	362,08	395,82	459,28	*	351,27	345,38	364,90	426,82	412,75	304,52
Média	519,42	406,80	397,26	507,24	458,32	310,91	462,46	378,48	355,00	474,26	485,07	396,06
DP	169,03	120,36	146,69	230,26	172,40	93,79	105,30	61,42	112,94	126,14	160,31	83,62

*: amostra insuficiente para análise. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$).

APÊNDICE S'

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de AH (AH/ureia) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	1,29	1,17	0,73	1,12	1,37	*	*	1,65	0,82	1,76	3,27	2,24
2	1,91	1,37	1,75	2,52	1,78	1,07	1,49	1,05	1,06	1,24	1,08	1,00
3	2,62	1,62	2,03	3,35	2,61	1,24	1,26	1,10	0,87	1,05	0,92	1,20
4	0,89	0,76	0,77	0,85	0,90	0,70	0,91	0,76	0,73	0,94	0,94	0,67
5	1,48	1,21	0,78	0,96	0,79	0,95	1,76	1,49	1,74	1,95	1,82	1,18
6	1,19	1,32	1,03	1,41	1,12	0,73	1,04	1,01	1,08	1,15	1,16	1,02
7	1,13	1,07	0,93	1,03	1,06	1,54	1,70	1,40	1,53	1,90	1,35	1,43
8	0,93	0,78	0,70	0,90	0,70	0,79	0,87	0,73	0,61	1,02	0,88	0,69
9	1,03	0,67	0,77	1,04	1,00	0,99	1,49	0,98	1,06	1,88	1,38	1,19
10	1,22	0,89	1,14	1,38	1,42	*	1,29	1,39	1,11	1,37	1,40	1,00
Média	1,37	1,09	1,06	1,46	1,27	1,00	1,18	1,16	1,06	1,43	1,42	1,16
DV	0,53	0,31	0,46	0,82	0,57	0,28	0,52	0,31	0,35	0,40	0,71	0,44

*: amostra insuficiente para análise. Não houve diferença estatística significativa ($P>0,05$).

APÊNDICE T

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de CS ($\mu\text{g/ml}$) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	66,71	53,72	37,01	228,26	264,61	30,27	*	42,21	29,24	86,02	77,86	29,10
2	21,49	34,09	18,55	33,41	37,77	19,98	42,84	21,89	35,38	39,85	39,16	32,66
3	53,42	47,88	56,09	270,75	68,48	15,20	44,42	37,96	22,42	88,83	53,30	60,48
4	35,86	34,46	28,08	54,12	84,31	45,30	49,62	20,44	24,87	75,04	80,94	23,24
5	71,44	52,77	35,57	127,97	50,18	28,93	27,67	32,78	25,68	51,23	36,68	18,48
6	49,10	41,46	36,93	85,39	37,55	17,04	22,02	26,82	25,90	32,98	34,19	17,02
7	24,63	24,21	27,96	42,93	72,57	19,81	31,06	17,43	18,95	48,49	74,26	18,65
8	37,08	36,67	39,89	134,54	61,27	19,20	23,39	14,82	18,64	80,94	72,66	13,83
9	35,55	24,14	23,38	78,82	97,63	27,29	35,45	23,14	24,26	34,98	36,52	16,54
10	19,20	15,93	19,48	136,98	80,68	*	25,58	20,11	17,50	38,39	37,11	14,32
Média	41,45ab	36,53abA	32,29abA	119,32cA	85,51ac	24,78b	33,56a	25,76aB	24,28aB	57,67bB	54,27b	24,43a
DV	18,26	12,70	11,29	78,65	65,93	9,39	10,04	9,07	5,40	22,50	19,88	14,11

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$. Letras maiúsculas distintas na mesma linha entre os tratamentos diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$ para o mesmo momento.

APÊNDICE T'

Valores médios e desvio padrão (DP) da concentração de CS (CS/ureia) do LS coletado das articulações metacarpofalangeanas dos animais durante os diferentes momentos do tratamento com ACP e solução fisiológica – São Paulo – 2013

Animal	ACP						Solução Fisiológica					
	0h	3h	6h	24h	48h	168h	0h	3h	6h	24h	48h	168h
1	0,18	0,17	0,10	0,59	0,95	*	*	0,16	0,11	0,33	0,30	0,13
2	0,06	0,07	0,05	0,10	0,11	0,06	0,14	0,07	0,11	0,13	0,10	0,08
3	0,15	0,15	0,17	0,92	0,20	0,05	0,12	0,11	0,07	0,27	0,14	0,17
4	0,08	0,08	0,07	0,13	0,22	0,12	0,12	0,05	0,06	0,18	0,20	0,05
5	0,18	0,14	0,08	0,35	0,12	0,08	0,07	0,10	0,07	0,14	0,09	0,04
6	0,13	0,11	0,11	0,24	0,10	0,05	0,07	0,08	0,08	0,11	0,11	0,05
7	0,06	0,08	0,07	0,12	0,18	0,07	0,10	0,06	0,07	0,19	0,21	0,07
8	0,08	0,07	0,07	0,27	0,12	0,06	0,05	0,03	0,04	0,17	0,16	0,03
9	0,09	0,07	0,07	0,23	0,26	0,09	0,10	0,06	0,07	0,10	0,10	0,05
10	0,06	0,05	0,06	0,48	0,25	*	0,09	0,08	0,05	0,12	0,13	0,05
Média	0,11a	0,10a	0,09a	0,34bA	0,25ab	0,07a	0,09a	0,08a	0,07a	0,17bB	0,15b	0,07a
DV	0,05	0,04	0,03	0,26	0,25	0,02	0,04	0,03	0,02	0,07	0,07	0,04

*: amostra insuficiente para análise. Letras minúsculas distintas na mesma linha dentro de cada tratamento diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$. Letras maiúsculas distintas na mesma linha entre os tratamentos diferem estatisticamente em nível $P < 0,05$ para o mesmo momento.